

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E  
SURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp. ISOLADOS  
DE PUBA**

**KARLA JOSEANE PEREZ**

Belo Horizonte  
2014

KARLA JOSEANE PEREZ

**CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E  
SURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp. ISOLADOS  
DE PUBA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

**Orientadora:**

Profa. Dra. Regina Nardi Drummond (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)

**Co-Orientador:**

Prof. Dr. Adriano Brandelli (Departamento de Ciência dos Alimentos, ICTA/UFRGS)

**Colaboradores:**

Prof. Dr. Jaques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG)

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro (Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Dr. Daniel Santos (Núcleo de Biomoléculas do ICB/UFMG)

Belo Horizonte  
2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Aplicada e no Laboratório de Ecologia e Fisiologia Microbiana (LEFM) do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, Belo Horizonte, MG e no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (Laboratório 218) do Departamento de Ciência dos Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFRGS, Porto Alegre, RS.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado ao longo dessa caminhada. Especialmente à minha família representada pela minha mãe Orlanda, minhas irmãs Karine e Karen e meu esposo Robson.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as muitas pessoas que tornaram possível esta conquista.

Primeiramente, à minha orientadora profa. Regina Nardi Drummond pela orientação, amizade, alegria, oportunidade e incentivos dispensados para a realização deste trabalho, pelo auxílio em todos os momentos sem medir esforços e, sobretudo, pelo exemplo de pessoa humana e beleza interior maravilhosa, a quem devo total gratidão e com quem muito aprendi, ultrapassando os conhecimentos apresentados nesta tese. Levarei, para sempre, esses ensinamentos de vida e de grandeza humana que me transmitistes. Igualmente ao meu co-orientador prof. Adriano Brandelli pelo exemplo de profissionalismo, determinação e dignidade, por todo auxílio e sugestões durante o caminho e por ter me acolhido, tranquilamente, como sua co-orientada em seu laboratório.

Ao Prof. Jaques Nicoli pelo exemplo de ser humano, professor e pesquisador, pela disponibilidade de sempre, por ter me recebido, desde o mestrado, em seu laboratório como se fosse um de seus orientados e por ter me apresentado à profa. Regina.

Ao Prof. Marcelo Santoro pela simplicidade e humildade e pelo incansável auxílio com a interpretação dos resultados das análises bioquímicas deste trabalho e colaboração, até mesmo com a indicação de ótimos profissionais que me auxiliaram na execução de diversos experimentos desta tese, bem como pela permissão para utilização de seu laboratório sempre que fosse necessário.

Ao Daniel Santos pela colaboração e valioso auxílio com a execução das muitas análises em pouco tempo e interpretação dos resultados obtidos no espectômetro de massas.

Ao Jamil Oliveira pelo exemplo de trabalho e ajuda incansável, desde o início do doutorado, na execução das diversas análises cromatográficas efetuadas, muitas vezes ficando até mais tarde e jamais negando seu auxílio para a realização dos experimentos de purificação realizados.

Ao Jaime Viana por ter sido um precioso e dedicado bolsista na UFMG que, literalmente, “caiu do céu” no momento em que eu mais precisei de ajuda devido ao volume de experimentos e de que tudo desse certo. Às Lívias, que foram igualmente bolsistas e auxiliaram na execução de muitos experimentos realizados na UFRGS.

À colega Sílvia Crispim por ter isolado e me cedido as duas linhagens de *Bacillus* que foram material de trabalho desta tese, bem como as amostras das pubas e as linhagens de bactérias lácticas utilizadas. Agradeço pela disponibilidade e pela parceria de sempre.

Ao prof. Marcos Rogério Tótola e ao bioquímico Karlos Henrique Martins Kalks do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa pela colaboração para a realização das análises de perfil de ácidos graxos das amostras de *Bacillus*.

Aos queridos amigos e colegas dos laboratórios tanto do Lefm - UFMG quanto do 218 da UFRGS pela feliz convivência, pela auxílio sempre que necessário, pelas companhias agradáveis na bancada e pela parceria. Em especial, à Ariane, Bianca, Bárbara, Éricka, Elisa, Fabiana, Quésia, Marcela, Tássia, Sílvia, Silvinha, Karine, Glauciane, Luciana, Alines, Rafaela, Flávia, Flaviano, Samir, Mário, Leonardo, Rafaéis, Adriano, Spencer e Flávio da UFMG. E às Fernandas, Ana Paula, Ana, Patrícia, Jamile, Stela, Juliana, Michele, Julise, Lisianne, Evelise, Amanda, Cássia, Indjara, Renata, Roberta, Simone, Florência, Virgínia, Juliana, Voltaire, Daniel, Carlos, Kendi e Flávio da UFRGS. Também aos muitos colegas e amigos espalhados em diversos laboratórios, das duas Universidades, que me auxiliaram ou compartilharam momentos importantes durante esta busca.

A todos os professores do ICB da UFMG e do ICTA da UFRGS por todo conhecimento compartilhado e auxílio desde o curso das disciplinas até às dúvidas e discussões na bancada e até mesmo empréstimo de meios de cultura, materiais e reagentes, em especial às professoras Dodora, Verinha, Silvinha, Elisabeth, Paula, Maria Auxiliadora, Simone, Patrícia, Viviane e aos professores Luiz Macêdo, Luiz Simeão, Luiz Rosa, Carlos Rosa, Ary e Flávio. Jamais esqueçerei de cada um de vocês em minha vida profissional, são todos meus exemplos. Igualmente aos professores do ICTA, em especial aos profs. Erna (*in memoriam*) e Eduardo, orientadores e incentivadores desde o mestrado.

Aos professores que fizeram parte da minha defesa de projeto e de qualificação, profas. Andréia Marçal Silva, Andréa Maria Amaral Nascimento e prof. Luiz Macêdo e ao pesquisador Luiz Guilherme Heneine pelas sugestões e por todas as contribuições para que eu chegasse até aqui. Também à profa. Andrea de Souza Monteiro pelas sugestões e pelas indicações de artigos científicos durante o transcurso do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de ter sido discente deste Programa. Deste modo, à UFMG e a UFRGS pela formação acadêmica.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

À técnica de laboratório Clélia por toda a ajuda com a lavagem e estelização dos materiais além da alegria e companhia nas noites no Lefm/UFMG. Igualmente ao Roberval do Lab. 205 do ICTA pelos reagentes e materiais e pela prestatividade. Aos demais funcionários do Depto. de Microbiologia da UFMG e do ICTA da UFRGS que sempre estiveram disponíveis para qualquer necessidade.

À Cristhine pela hospitalidade ao ter me hospedado por algumas vezes em BH em sua casa e à colega e amiga Bianca pela indicação e companhia. Também aos funcionários da Fump que trabalham na Moradia Universitária e que propiciaram as minhas agradáveis estadias. Por fim, ao “povo mineiro” que sempre me recebeu e me tratou com tamanha hospitalidade e carinho.

Aos professores e à Chefia do Depto. de Microbiologia da UFRGS e à direção e professores da FASURGS/Passo Fundopelo apoio e incentivo para a conclusão do doutorado. Também aos alunos queridos que foram grandes propulsores e motivadores para a conclusão desta fase.

Às minhas amigas de perto e de longe pelo apoio, palavras e incentivo em momentos difíceis e pela amizade, em especial à Eliandra, à Patrícia, à Cátia, à Francine, à Clarissa, à Gislaine, à Eliane, à Luciana, à Laís, à Aline e à Sabrina. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos meus familiares pelo carinho, força, compreensão nas minhas ausências e exemplos de vida, perseverança, amor e caráter. Em especial, à Orlanda, minha mãe amada e eterna lutadora e às minhas queridas irmãs, Karine e Karen, por torcerem por mim e por me apoiarem e incentivarem em todos os momentos e decisões.

Ao meu amado Robson pelo incentivo, compreensão, paciência nos momentos de sufoco, apoio, carinho, exemplo e integridade, pelas madrugadas em claro me auxiliando, pela companhia em muitos experimentos à noite e em finais-de-semana, enfim, por todos os momentos difíceis em que estive ao meu lado, por acreditar em mim, pela companhia de vida nestes 8 anos e por me fazer feliz.

Enfim, agradeço a todos os familiares, amigos e colegas que podem não ter sido diretamente aqui mencionados mas que são igualmente especiais e que participaram, direta ou indiretamente, da construção e realização deste sonho.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”  
*Louis Pasteur*

## SUMÁRIO

	<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>21</b>
5	<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>24</b>
	2.1 ALIMENTOS NATURALMENTE FERMENTADOS.....	24
	2.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Bacillus</i> E TAXONOMIA.....	25
	2.3 BACTERIOCINAS E PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .....	30
10	<b>2.3.1 Peptídeos antimicrobianos produzidos por espécies de <i>Bacillus</i> e classificação de bacteriocinas de <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>32</b>
	2.3.1.1 <i>Subtilina</i> .....	36
	2.3.1.2 <i>Subtilosina A</i> .....	37
	2.4 BIOSÍNTESE E DIVERSIDADE DAS BACTERIOCINAS.....	38
	2.5 MECANISMO DE AÇÃO .....	39
15	2.6 INDUÇÃO/ESTÍMULO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	40
	2.7 PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS .....	41
	2.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	42
	2.9 BIOSURFACTANTES .....	45
	<b>2.9.1 Biossurfactantes e bioemulsificantes.....</b>	<b>46</b>
20	<b>2.9.2 Biossíntese e produção de biossurfactantes.....</b>	<b>48</b>
	<b>2.9.3 Classificação dos biossurfactantes e bioemulsificantes .....</b>	<b>49</b>
	<b>2.9.4 Lipopeptídeos .....</b>	<b>50</b>
	2.9.4.1 <i>Surfactina</i> .....	51
	2.9.4.2 <i>Iturinas</i> .....	53
25	2.9.4.2.1 <i>Micosubtilina</i> .....	55
	2.9.4.2 <i>Bacilomicina</i> .....	56
	2.9.4.3 <i>Fengicina</i> .....	57
	<b>2.9.5 Métodos de detecção de biossurfactantes .....</b>	<b>59</b>
	<b>2.9.6 Mecanismos de ação dos lipopeptídeos.....</b>	<b>60</b>
30	2.10 APLICAÇÕES DE BACTERIOCINAS E LIPOPTÍDEOS .....	61
	<b>2.10.1 Aplicações em alimentos .....</b>	<b>61</b>
	<b>2.10.2 Aplicações em saúde humana .....</b>	<b>65</b>
	<b>2.10.3 Aplicações em saúde animal .....</b>	<b>68</b>
	<b>2.10.4 Aplicações ambientais e como agentes de biocontrole .....</b>	<b>70</b>
35	2.11 DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA A BACTERIOCINAS.....	71
	2.12 TOXICIDADE DAS BACTERIOCINAS .....	72
	<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>74</b>
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	74
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	74
40	<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>76</b>
	4.1 MICRO-ORGANISMOS .....	76
	4.2 MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	77
	4.3 QUANTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Bacillus</i> sp. RECUPERADOS DE PUBA.....	77
45	<b>4.3.1 Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica de <i>Bacillus</i> sp. ....</b>	<b>77</b>
	4.3.1.1 <i>Fermentação da glicose em anaerobiose</i> .....	78
	4.3.1.2 <i>Resistência à lisozima</i> .....	78
	4.3.1.3 <i>Redução de nitrato</i> .....	78
	4.3.1.4 <i>Verificação de crescimento rizoide</i> .....	78

	4.3.1.5 Atividade hemolítica .....	79
	4.3.1.6 Motilidade.....	79
	4.3.1.7 Voges-Proskauer (VP).....	79
	4.3.1.8 Detecção de produção de cristais de toxina protéica .....	79
5	4.3.1.9 Identificação por meio dos testes bioquímicos e fisiológicos com Kits API 50 CHB e API 20E .....	80
	<b>4.3.2 Análise Quimiotaxonômica .....</b>	<b>80</b>
	4.3.2.1 Protocolo da Análise de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) - Sistema Sherlock® - Microbial Identification System (MIDI).....	80
10	<b>4.3.3 Análise Filogenética .....</b>	<b>81</b>
	4.3.2.1 Protocolo de extração de DNA.....	81
	4.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	81
	4.3.2.3 Purificação das amostras de PCR.....	82
	<b>4.3.4 Caracterização da atividade antimicrobiana .....</b>	<b>83</b>
15	4.3.4.1 Obtenção do extrato bruto da cultura .....	83
	4.3.4.1.1 Preparação do pré-inóculo .....	83
	4.3.4.1.2 Obtenção do inóculo.....	83
	4.3.4.1.2.1 Espectro de ação .....	83
	4.3.4.1.2.2 Outras condições de cultivo.....	83
20	4.3.4.1.2.3 Detecção da atividade antifúngica.....	85
	<b>4.3.5 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes .....</b>	<b>86</b>
	4.3.5.1 Verificação da atividade hemolítica em placas de Ágar sangue.....	86
	4.3.5.2 Índice de emulsificação (E <sub>24</sub> ) .....	86
	4.3.5.3 Tensão superficial .....	87
	<b>4.3.6 Pesquisa de genes de lipopeptídeos (surfactina, iturina A, fengicina) e de bacteriocinas (subtilosina A e subtilina).....</b>	<b>87</b>
25	4.3.6.1 Extração de DNA.....	87
	4.3.6.2 Condições da PCR.....	87
	4.3.6.3 Métodos de sequenciamento.....	88
	<b>4.3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana e de biossurfactante ao longo da Curva de crescimento.....</b>	<b>89</b>
30	4.3.7.1 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro .....	89
	4.3.7.2 Outras análises realizadas durante a curva de crescimento.....	89
	<b>4.3.8 Efeito antimicrobiano do sobrenadante da cultura de <i>Bacillus</i> sp. P5 sobre <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>B. cereus</i> ATCC 14579 durante seu crescimento (Curva dose-resposta).....</b>	<b>90</b>
35	<b>4.3.9 Indução/ativação da produção de substâncias antimicrobianas .....</b>	<b>90</b>
	4.3.9.1 Preparo das culturas indicadoras .....	91
	4.3.9.2 Cultivo e produção da substâncias antimicrobianas .....	92
	4.3.9.3 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro .....	93
	4.3.9.4 Determinação das unidades arbitrárias por mililitro .....	93
40	<b>4.3.10 Purificação de bacteriocinas e lipopeptídeos.....</b>	<b>93</b>
	4.3.10.1 Crescimento da cultura e obtenção do sobrenadante .....	93
	4.3.10.2 Titulação do extrato bruto.....	94
	4.3.10.3 Técnicas de extração empregadas para a purificação de bacteriocinas .....	94
	4.3.10.3.1 Extração dos lipopeptídeos e bacteriocinas por precipitação ácida ou por butanol ....	94
45	4.3.10.3.2 Extração com butanol do sobrenadante da cultura .....	94
	4.3.10.3.2.1 Extração ácida do sobrenadante da cultura.....	95
	4.3.10.3.2.2 Extração dos lipopeptídeos com butanol da matriz alimentar Puba (Lote E) .....	95

	4.3.3.10.3.2 Cromatografia de fase reversa .....	96
	4.3.3.10.3.3 Prepararo das amostras de puba para espectrometria de massas .....	96
	4.3.3.10.3.4 Análise dos eluatos por espectrometria de massas MALDI-TOF .....	97
	4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	97
5	<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>98</b>
	5.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>Bacillus</i> sp. ISOLADOS DE PUBA.....	98
	<b>5.1.1 Caracterização bioquímica e fisiológica</b> .....	<b>98</b>
	<b>5.1.2 Análise quimiotaxonômica</b> .....	<b>101</b>
	<b>5.1.3 Análise filogenética</b> .....	<b>103</b>
10	5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	104
	<b>5.2.1 Espectro de ação</b> .....	<b>104</b>
	5.2.1.1 Atividade antibacteriana em diferentes condições.....	106
	5.2.1.2 Atividade antifúngica.....	106
	<b>5.2.2 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes</b> .....	<b>108</b>
15	5.2.2.1 Verificação da atividade biossurfactante em placas de Ágar sangue.....	108
	5.2.2.2 Índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) .....	109
	5.2.2.3 Medição da tensão superficial.....	110
	<b>5.2.3 Pesquisa de genes de surfactina, iturina A, fengicina, subtilosina A e subtilina</b> .....	<b>111</b>
	<b>5.2.4 Curva de crescimento e produção de substâncias antimicrobianas</b> .....	<b>112</b>
	5.2.4.1 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro.....	112
20	5.2.4.2 Determinação da atividade antibacteriana.....	113
	5.2.4.3 Determinação da atividade antifúngica .....	113
	5.2.4.4 Determinação da atividade emulsificante .....	114
	5.2.4.5 Determinação do pH .....	115
	<b>5.2.5 Efeito do sobrenadante da cultura de <i>Bacillus</i> sp. P5 sobre <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>B. cereus</i> ATCC 14579 durante seu crescimento (Curva dose-resposta)</b> .....	<b>115</b>
25	<b>5.2.6 Produção da substância antimicrobiana avaliando a ativação e/ou estímulo para a sua produção</b> .....	<b>117</b>
	5.3 OBTENÇÃO DOS LIPOPEPTÍDEOS .....	122
	<b>5.3.1 Purificação de lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus</i> sp. P5 em meio de cultura</b> .....	<b>122</b>
30	5.3.1.1 Análises por espectrometria de massas MALDI-TOF de lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus</i> sp. P5 em meio de cultura e na matriz alimentar de puba.....	137
	<u>5.3.1.1.1 Detecção de lipopeptídeos na matriz alimentar puba</u> .....	146
	<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>151</b>
	<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>176</b>
35	<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>178</b>
	<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>179</b>
	<b>ANEXO</b>	
	<b>ANEXO A - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE LANDY PARA CRESCIMENTO DO <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>214</b>
40		

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma das etapas de produção de puba oriunda de Saco da Raiz, Estância (SE). Ilustrações do processo de pubagem: bombona contendo pedaços de raízes de mandioca submersas em água (A) e (B), aspecto das raízes de mandioca após a fermentação espontânea (C), aspecto das raízes pubadas após o descarte da água (D), tamisação e lavagem da massa (E), separação das partes não pubadas (F), aspecto do líquido obtido após a lavagem da massa (G), massa pubada dentro de um saco de algodão para a retirada manual da água (H), puba dentro do saco de náilon para prensagem (I), prensa de madeira para retirada da água (J), prensa fechada (L), puba pronta para consumo (M)..... 25
- Figura 2.** Estruturas primárias das surfactinas (srf) A, B e C. A srf contém um ácido graxo  $\beta$ -hidroxilado ligado covalentemente por uma ligação amida ao um heptapeptídeo e por uma lactona. O heptapeptídeo é composto por resíduos dos aminoácidos na sequência indicada: ácido glutâmico (Glu), leucina (Leu), leucina (Leu), valina (Val) e ácido aspártico (Asp); o resíduo na posição 7 é variável, sendo Leu, Val ou isoleucina (Ile) para srf A, srf B e srf C, respectivamente. .... 51
- Figura 3.** Estruturas primárias das iturinas (itu) A e C. As itu contém um ácido graxo  $\beta$ -amino ligado covalentemente por uma ligação amida ao heptapeptídeo e por uma ligação lactama. O heptapeptídeo é composto por resíduos dos aminoácidos na sequência e com a mesma quiralidade indicada: posição 1 é variável, podendo conter asparagina (Asn) ou ácido aspártico (Asp), para itu A e itu C, respectivamente, tirosina (Tyr), glutamina (Gln), prolina (Pro) e serina (Ser)..... 54
- Figura 4.** Estrutura primária da micosubtilina (mic) o heptapeptídeo composto por asparagina (Asn), tirosina (Tyr), glutamina (Gln), prolina (Pro) e serina (Ser) ..... 54
- Figura 5.** Estrutura primária das bacilomicinas D, F e L mostra as variações dos resíduos de aminoácidos do heptapeptídeo nas posições 1, 4, 5 e 6. Os resíduos nas posições 2, 3 e 7 são comuns: tirosina (Tyr), asparagina (Asn) e treonina (Thr), respectivamente..... 57
- Figura 6.** Estruturas primárias das fengicinas A e B. Feg são formadas por um ácido graxo  $\beta$ -hidroxilado covalentemente ligado por uma ligação amida a um decapeptídeo que contém um anel lactona interno entre os resíduos 3 e 10. A posição 6 é variável contendo o resíduo Ala ou Val nas fen A e B, respectivamente. A posição 2 encontra-se um resíduo de ornitina e na posição 4 resíduo modificado de treonina ..... 59
- Figura 7.** (A) Coloração de gram de *Bacillus* sp. P5 isolado de puba. (B) Aspecto da colônia de *Bacillus* sp. P5 em Ágar Nutriente (37°C – 24h)..... 98
- Figura 8.** Análises filogenéticas baseadas em sequências do gene rRNA 16S de *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5 utilizando o método de Neighbor-joining (1000 repetições de *Bootstrap*). ..... 104

- Figura 9.** Atividades antifúngicas de *Bacillus* sp. P5 inoculado diretamente sobre a superfície do Ágar BDA contendo o fungo filamentoso indicador. Em (A) atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, em (B) Atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*, em (C) Atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicie* em (D) contra *Aspergillus flavus* 5B1. Todas as placas mostram três inoculações de *Bacillus* sp. P5 no lado esquerdo da foto e de *Bacillus* sp. C3 no lado direito. .... 108
- Figura 10.** Índice de emulsificação. Emulsão obtida com sobrenadante (E<sub>24</sub> de 59 %) (A1) e cultura (E<sub>24</sub> de 57 %, dados não mostrados) (A2) de *Bacillus* sp. P5 e tendo o tolueno como fase orgânica. Emulsão (E<sub>24</sub> de 24 %) (B) de *Bacillus* sp. P5 e tendo o biodiesel de soja como fase orgânica. .... 110
- Figura 11.** Perfil dos produtos dePCR de subtilina - *spaS* (A) e de subtilosina A – *sboA* (B). Em A: 1, Peso Molecular (1kpb); 2, *Bacillus* sp. C3; 3, *Bacillus subtilis* DSM 3258; 4, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e em B: Peso Molecular (1kpb); 2 e 3, *Bacillus* sp. C3; 4, *Bacillus subtilis* DSM 3258; 5, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. .... 111
- Figura 12.** Perfil dos produtos dePCR de (A) iturina D - *ituD*, (B) surfactina - *sfp* e (C) subtilosina A - *sboA*. 1, Peso Molecular; 2, *Bacillus* sp. P5; 3, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 4, *Bacillus subtilis* DSM 3258. .... 112
- Figura 13.** Curva de crescimento e de atividade antibacteriana de *Bacillus* SP. P5, a partir do inóculo (24h a 42 °C em *shaker* com 125 rpm), para determinação do número de UFC/mL (◇) e da atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 (■) realizada em meio BHI, por até 48h. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três repetições. .... 113
- Figura 14.** Curvas de atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* representando as médias dos halos do teste com as células bacterianas (■) e as médias dos halos do teste com o sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 (▲) monitorados durante o crescimento por 48 h com incubação realizada a 42 °C, 125 rpm. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três repetições. .... 114
- Figura 15.** Curva de atividade emulsificante (E<sub>24</sub>, ◇) e de pH (●) de *Bacillus* sp. P5 realizada em meio BHI e medida através de ensaio de E<sub>24</sub> e eletrodo de pH, respectivamente. Incubação realizada a 42 °C, 125 rpm por 48 h. Cada ponto representa a média de três repetições. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três repetições. .... 115
- Figura 16.** Efeito do sobrenadante filtrado de *Bacillus* sp. P5 sobre o número de UFC/mL de células viáveis *B. cereus* ATCC 14579, crescido em meio BHI a 42 °C. A adição do sobrenadante foi realizada após 4h de cultivo. Crescimento de *B. cereus* ATCC 14579, sem adição de sobrenadante (▲) e com a adição de sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 (■). Cada ponto representa a média de duas repetições. .... 116
- Figura 17.** Efeito do sobrenadante filtrado de *Bacillus* sp. P5 sobre o número de UFC/mL de células viáveis de *Listeria monocytogenes* ATCC 6477, crescida em meio BHI a 42 °C. A adição do sobrenadante foi realizada após 4h de cultivo. Crescimento de *Listeria monocytogenes* ATCC 6477, sem adição de sobrenadante (◆) e com a adição de sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 (●). Cada ponto representa a média de duas repetições. .... 117

- Figura 18.** Indução/ativação da atividade antibacteriana, em crescimento de *Bacillus* sp. P5 em co-cultivo com *Corynebacterium fimi* NTCS 7547 (A) e antifúngica, em crescimento de *Bacillus* sp. P5 em co-cultivo com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersic* (B) em meio BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C) contra *B. cereus* ATCC 14579. Título de 12.800 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *Corynebacterium fimi* NTCS 7547 e de 3200 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersic*. ..... 118
- Figura 19.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com bactérias indutoras em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos.....119
- Figura 20.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com fungos filamentosos indutores em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos.....119
- Figura 21.** Indução/ativação da atividade antibacteriana, em crescimento de *Bacillus* sp. P5 em co-cultivo com *L. brevis* E2-248(A) e com *L. fermentum* E4 – 249 (B) em meio BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 6477. Título de 3.200 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *L.brevis* E4-248 e de 3200 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *L. fermentum* E4 – 249. ... .. 120
- Figura 22.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com bactérias lácticas isoladas da puba e indutoras em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos....121
- Figura 23.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de cultivo de *Bacillus* sp. P5 com sobrenadantes dos micro-organismos indutores que mais aumentaram a atividade antimicrobiana, anteriormente testados em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos.....122
- Figura 24.** Corrida cromatográfica nº1: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 6 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior). Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 5 (void da coluna), 21 e 22. .... 123

**Figura 25.** Corrida cromatográfica n°2: Perfil de eluição do precipitado ácido do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 6 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, fase móvel A ; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC14579: 4, 5 e 6 (void da coluna), 26, 27, 33 a 41, 43, 44, 45, 46 a 49 ..... 124

**Figura 26.** Corrida cromatográfica n°3: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%), fase móvel B (acetonitrila - ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, somente fase móvel A; 10-40 min gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 5 (void da coluna), 27 e 28..... 125

**Figura 27.** Corrida cromatográfica n°4: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%), fase móvel B (acetonitrila 100%). Gradiente: 0 a 10 min., somente fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 5 (void da coluna) e 42..... 126

**Figura 28.** Corrida cromatográfica n°5: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., somente fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 5 (void da coluna), 22, 23 e 33..... 127

- Figura 29.** Corrida cromatográfica n°6: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio Landy, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05% ), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 5, 6 (void da coluna), 29 a 42, 45, 46, 48, 50. .... 128
- Figura 30.** Corrida cromatográfica n°7: Perfil de eluição do precipitado ácido do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio Landy, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 5 e 6 (void da coluna), 16, 17, 37 a 41. .... 129
- Figura 31.** Corrida cromatográfica n°8: Perfil de eluição do precipitado ácido do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 36 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 40 a 46. .... 130
- Figura 32.** Corrida cromatográfica n°9: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 36 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05% ), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min. gradiente linear de 20-100% fase móvel B e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 8 (void da coluna), 23 e 24. .... 131

- Figura 33.** Corrida cromatográfica nº10: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 36 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05% ), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4 (*void* da coluna), 24, 25 e 391 ..... 132
- Figura 34.** Espectro MS da fração ativa 38 proveniente da cromatografia de fase reversa C18 HPLC (corrida 6). Atribuição dos picos (*m/z*: Surfactina (Srf) A C<sub>15</sub> (1036,8 [M+H]<sup>+</sup>, 1058,8 [M+Na]<sup>+</sup>, 1074,8 [M+K]<sup>+</sup>); Srf A C<sub>16</sub> (1050,8 [M+H]<sup>+</sup>, 1072,8 [M+Na]<sup>+</sup>, 1088,8 [M+K]<sup>+</sup>) e possivelmente Srf A C<sub>17</sub> (1064,8 [M+H]<sup>+</sup>, 1086,8 [M+Na]<sup>+</sup>, 1102,8 [M+K]<sup>+</sup>) ..... 139
- Figura 35.** Comparação dos perfis de fragmentação MS/MS do íon precursor *m/z* 1030,4 (Srf A C<sub>14</sub> ou Srf B C<sub>15</sub> [M+Na]<sup>+</sup>) de uma fração ativa obtida por cromatografia de fase reversa (A) ao perfil de fragmentação do íon *m/z* 1030,0 do padrão Sigma-Aldrich (B) ..... 140
- Figura 36.** Comparação dos perfis de fragmentação MS/MS do íon precursor *m/z* 1066,3 (iturina C<sub>14</sub> ou [M+Na]<sup>+</sup>) de uma fração ativa obtida por cromatografia de fase reversa (A) ao perfil de fragmentação do íon *m/z* 1066,1 do padrão Sigma-Aldrich (B) ..... 141
- Figura 37.** Espectro MS da fração ativa 24 proveniente da cromatografia de fase reversa C18 HPLC (corrida 8). Atribuição dos picos (*m/z*: 1043,3 (C<sub>14</sub> iturina [M+H]<sup>+</sup> ; 1057,4 (C<sub>15</sub> iturina [M+H]<sup>+</sup>; 1065,3 (C<sub>14</sub> iturina [M+Na]<sup>+</sup>); 1079,3 (C<sub>15</sub> iturina [M+Na]<sup>+</sup>); 1081,3 (C<sub>14</sub> iturina [M+K]<sup>+</sup>); 1095,3 (C<sub>15</sub> iturina [M+K]<sup>+</sup>)..... 141
- Figura 38.** Espectro MS da fração ativa 24 proveniente da cromatografia de fase reversa C18 HPLC (corrida 9). Atribuição dos picos (*m/z*: Surfactina (Srf) A C<sub>13</sub> ou (Srf) B C<sub>14</sub> (1008,3 [M+H]<sup>+</sup>), Bacilomicina (bac) C<sub>14</sub> (1021,3 [M+H]<sup>+</sup>, Micosubtilina (mic) C<sub>18</sub> (1121,3 [M+Na]<sup>+</sup>). Os picos 1167,4; 1321,4; 2081,7 e 3048,9 não possuem atribuições conhecidas. 143
- Figura 39.** Espectro MS da fração ativa 23 proveniente da cromatografia de fase reversa C18 HPLC (corrida 5). Atribuição dos picos (*m/z*: Micosubtilina (mic) C<sub>18</sub> (1121,3 [M+Na]<sup>+</sup>), (mic) C<sub>19</sub> 1135,6 [M+Na]<sup>+</sup> ..... 144
- Figura 40.** Espectro MS da fração ativa 37 de uma cromatografia de fase reversa C18 HPLC. Atribuição dos picos de fengicina *m/z*: 1449,5 C<sub>15</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1463,4 C<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1471,4 C<sub>15</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1477,4 C<sub>17</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1485,4 C<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup> (pico base); 1487,5 C<sub>15</sub> [M+K]<sup>+</sup>; 1491,5 C<sub>16</sub> Val [M+H]<sup>+</sup>; 1499,5 C<sub>17</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1501,4 C<sub>16</sub> [M+K]<sup>+</sup>; 1506,4 C<sub>17</sub> Val [M+H]<sup>+</sup>; 1513,5 C<sub>16</sub> Val [M+Na]<sup>+</sup>; 1515,5 C<sub>17</sub> [M+K]<sup>+</sup>; 1527,5 C<sub>17</sub> Val [M+Na]<sup>+</sup>; 1529,5 C<sub>16</sub> Val [M+K]<sup>+</sup>; 1543,5 C<sub>17</sub> Val [M+K]<sup>+</sup> ..... 145
- Figura 41.** Espectros MS da suspensão aquosa de puba extraída por butanol e concentrada em ZipTip® C18. Atribuições dos picos na faixa de *m/z* – iturina e fengicina ..... 147

	<b>Figura 42.</b> Espectros MS da suspensão aquosa de puba extraída por butanol e concentrada em ZipTip® C18. Atribuições dos picos $m/z$ – Iturina (Itu) C <sub>14</sub> (1043.4 [M+H] <sup>+</sup> , 1065.5 [M+Na] <sup>+</sup> , 1081.5 [M+K] <sup>+</sup> ); Itu C <sub>15</sub> (1057.5 [M+H] <sup>+</sup> ,1079.6 [M+Na] <sup>+</sup> ,1095.5 [M+K] <sup>+</sup> ).....	147
5	<b>Figura 43.</b> Espectros MS da suspensão aquosa de puba extraída por butanol e concentrada em ZipTip® C18. Atribuições dos picos $m/z$ – Fengicina (Fen) C <sub>16</sub> (1463.5 [M+H] <sup>+</sup> , 1477,5 1485.5 [M+Na] <sup>+</sup> , 1501.5 [M+K] <sup>+</sup> ).....	148
10	<b>Figura 44.</b> Perfil de fragmentação MS/MS do íon precursor 1478,5 (C15 fengicina A – presença de Ala na posição 6 do anel peptídico) gerou os íons produtos biomarcadores de fengicina A: $m/z$ 1079,9 e 965,8.....	149
15	<b>Figura 45.</b> Perfil de fragmentação MS/MS do íon precursor 1492,9 (C16 fengicina B – presença de Val na posição 6 do anel peptídico) gerou o íon produto biomarcador de fengicina B: $m/z$ 994,1.....	150
20		
25		
30		
35		
40		
45		

## LISTA DE TABELAS

5	<b>Tabela 1.</b> Classificação proposta para as bacteriocinas de <i>Bacillus</i> em comparação com a classificação proposta para BAL.....	34
	<b>Tabela 2.</b> Condições de crescimento testadas para a produção da(s) substância(s) antimicrobiana(s) em <i>shaker</i> .....	85
10	<b>Tabela 3.</b> Primers específicos para genes funcionais das bacteriocinas .....	88
	<b>Tabela 4.</b> Testes bioquímicos e fisiológicos dos isolados C3 e P5 recuperados dos lotes de puba D e .....	99
15	<b>Tabela 5.</b> Resultados dos testes bioquímicos obtidos através do sistema API 50 CHB.....	100
	<b>Tabela 6.</b> Resultados dos testes bioquímicos obtidos através do sistema 20E.....	100
20	<b>Tabela 7.</b> Perfis de ácidos graxos de <i>Bacillus</i> sp. C3 e P5 determinado por análise FAME-MIDI.....	102
	<b>Tabela 8.</b> Espectro de ação do sobrenadante bruto contra micro-organismos indicadores da atividade antimicrobiana.....	105
25	<b>Tabela 9.</b> Média comparativa dos halos das triplicatas do teste de atividade antifúngica realizada para <i>Bacillus</i> sp. P5 diretamente com as células bacterianas e apenas com o sobrenadante da cultura .....	107
30	<b>Tabela 10.</b> Avaliação da produção de biosurfactantes em sobrenadantes de cultura de <i>Bacillus</i> sp. C3 e de <i>Bacillus</i> sp. C5 por meio da medida do índice de emulsificação (E <sub>24</sub> ) onde foram empregados compostos hidrofóbicos como fase orgânica .....	109
35	<b>Tabela 11.</b> Fracionamentos dos extratos brutos em HPLC: tempo de cultivo e meio, atividade antimicrobiana do extrato bruto contra <i>B. cereus</i> ATCC 14579 (A) e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 6477 (B), tipo de extração, de colunas C18 e de gradientes, frações ativas e atribuição dos lipopeptídeos detectados por espectrometria de massas MADI-TOF .....	133
40	<b>Tabela 12.</b> Atribuição dos lipopeptídeos detectados, por espectrometria de massas MALDI-TOF, no extrato butanólico da matriz alimentar puba e nos extratos butanólicos ou naqueles obtidos por precipitação ácida dos meios de culturas nos tempos de 6, 30 e 36 h.....	138

## RESUMO

Alimentos naturalmente fermentados como a puba constituem uma fonte de micro-organismos produtores de compostos antimicrobianos. Diversos produtos de interesse industrial são produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* e incluem enzimas, antibióticos, aminoácidos, inseticidas, biossurfactantes e bacteriocinas. Neste estudo, caracterizaram-se lipopeptídeos com ação antimicrobiana e biossurfactantes produzidos pelas linhagens *Bacillus* spp. C3 e P5, isoladas da matriz alimentar de Puba, tendo sido escolhido um micro-organismos destes, conforme maior atividade antimicrobiana, para o prosseguimento dos experimentos. A identificação das duas bactérias foi realizada por testes fenotípicos, quimiotaxonômicos e genotípicos indicando que pertencem ao gênero *Bacillus* e *Bacillus* spp. C3 à espécie *B. cereus/B. thuringiensis* e *Bacillus* sp. P5 à espécie *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. O espectro de atividade antimicrobiana foi realizado para ambas as linhagens de *Bacillus* spp. Para os testes de atividade antimicrobiana de *Bacillus* spp. P5 utilizaram-se micro-organismos (45) que incluíram bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e uma levedura, em que foi observada atividade antimicrobiana frente à 62% (28) dos micro-organismos testados, enquanto que *Bacillus* spp. C3 apresentou apenas 15% de atividade antimicrobiana contra as espécies para que foi testado. Um aumento da atividade antimicrobiana foi detectado quando *Bacillus* spp. P5 foi cultivado juntamente com células inativadas de outros micro-organismos mas não quando em contato com o sobrenadante destes, com maiores atividades para *Corynebacterium fimi*, *Aspergillus fumigatus*, *Lactobacillus brevis* E4-248, *Lactobacillus fermentum* E4-249 e *Lactobacillus plantarum* EPF-257. Estes resultados indicam que há interferência de fatores de indução - *quorum sensing*, especialmente quando os micro-organismos são provenientes da microbiota natural deste alimento fermentado, aumentando a produção da(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida por *Bacillus* spp. P5. O sobrenadante bruto de *Bacillus* sp. P5 apresentou ação bacteriostática contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 e contra *Listeria monocytogenes* ATCC 6477. A caracterização da atividade biossurfactante foi detectada pela zona de beta hemólise ao redor da colônia, pelos testes de atividade emulsificante e pela medição da tensão superficial. Foi observada atividade emulsificante do sobrenadante para todos os agentes hidrofóbicos testados (4), com exceção do xileno, sendo este capaz de formar emulsão apenas quando testado o sobrenadante em meio Landy acrescido de glutamato. Também foi observada redução da tensão superficial do meio de cultura, sugerindo a produção de compostos tensoativos pela linhagem de *Bacillus* spp. P5. A técnica de PCR seguida de sequenciamento dos amplicons permitiu identificar genes relacionados à síntese das bacteriocinas subtilosina A e subtilina para *Bacillus* sp. C3, constituindo o primeiro registro da presença destes genes para a espécie *Bacillus thuringiensis/B. cereus*, a qual possivelmente pertence *Bacillus* sp. C3 e de subtilosina A e dos lipopetídeos iturina A e surfactina para *Bacillus* sp. P5. Dentre as técnicas de purificação empregadas neste trabalho as que apresentaram melhores resultados foram a extração como butanol, seguidas por cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada ao HPLC e espectrometria de massas MALDI-TOF para a pesquisa no sobrenadante da cultura. Para a pesquisa das substâncias diretamente na matriz alimentar substituiu-se a cromatografia de fase reversa através de coluna C18 e adaptou-se o método de extração com butanol com a utilização de coluna C4 (zip tip). O isolado *Bacillus* sp. P5 é capaz de co-produzir cinco (5) diferentes tipos de lipopeptídeos (surfactina, fengicina, iturina, micosubtilina e bacilomicina) e, portanto, apresenta diferentes atividade de biocontrole. Além disso, este trabalho demonstrou a elevada produção de diferentes isoformas de surfactina (de C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>), em meio de cultura, incluindo a isoforma C<sub>15</sub>, biologicamente a mais ativa e a isoforma C<sub>17</sub>, raramente descrita, bem como a detecção inédita de lipopeptídeos como fengicina e iturina diretamente na matriz alimentar de puba de mandioca. Este alimento é amplamente consumido por populações no norte e nordeste do Brasil e o conhecimento acerca destas substâncias poderia contribuir para o aumento da segurança alimentar e da vida de prateleira deste tipo de alimento.

## ABSTRACT

Naturally fermented foods like cassava puba are sources of microorganisms able to produce antimicrobial compounds. Several products of industrial interest are produced by *Bacillus* which include enzymes, antibiotics, aminoacids, insecticides, biosurfactants and bacteriocins. In this study biosurfactants and antimicrobial substances produced by *Bacillus* spp. (C3 and P5) isolated from the food matrix Puba were characterized, and the one with higher antimicrobial activity was chosen for further testing. The identification of both bacteria was performed by phenotypic, chemotaxonomic and genotypic tests, and the results indicated that they belong to the genus *Bacillus* and *Bacillus* sp. C3 to *B. cereus*/*B. thuringiensis* and *Bacillus* sp. P5 to the species *Bacillus subtilis*/*amyloliquefaciens*. The spectrum of antimicrobial activity was assessed using microorganisms (45) which included Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and yeasts, and activity against 62% (28) of the test organisms was observed. An increase in antimicrobial activity was detected when *Bacillus* sp. P5 was cultured with inactivated cells of other microorganisms, but not when in contact with the supernatant of these, with higher activities for *Corynebacterium fimi*, *Aspergillus fumigatus*, *Lactobacillus brevis* E4-248, *Lactobacillus fermentum* E4-249 and *Lactobacillus plantarum* EPF-257. These results indicate that there is interference of quorum-sensing inducing factors, especially when the microorganisms were from the natural microbiota of this fermented food, increasing the production of the antimicrobial substance(s) by *Bacillus* sp. P5. The crude supernatant of *Bacillus* sp. P5 showed bacteriostatic action against *Bacillus cereus* ATCC 14579 and against *Listeria monocytogenes* ATCC 6477. The characterization of biosurfactant activity was detected by beta hemolysis zone around the colony, by emulsifying activity tests and the measurement of the surface tension. Emulsifying activity of the supernatant was observed for all the tested substances (4), with the exception of xylene, which is capable of forming emulsion only when tested in the supernatant medium Landy with glutamate. Reduction of the surface tension of the culture medium was also observed, suggesting the production of surface-active compounds by the bacteria. The PCR followed by sequencing of amplicons allowed the identification of genes related to the synthesis of the bacteriocins subtilisin A and subtilin for *Bacillus* sp. C3 constituting the first record of the presence of these genes for *Bacillus thuringiensis*/*B. cereus* species, which possibly belongs to *Bacillus* sp. C3. Regarding *Bacillus* sp. P5, subtilisin A, surfactin and iturin A were identified. Among the techniques employed for purification, the best results were seen with butanol extraction followed by reverse phase chromatography on C18 column and HPLC coupled to MALDI-TOF mass spectrometry for analysing culture supernatant. For analysing the substances directly into the food matrix, by reverse chromatography was replaced by an adapted method of extraction with butanol using a C4 column (zip tip). The isolated *Bacillus* sp. P5 is able to co-produce five (5) different types of lipopeptides (surfactin, fengicin, iturin, microsubtilin and bacilomicin) and therefore presents varied activity of biocontrol. Furthermore, this study demonstrated the high production of different isoforms of surfactin (C13 - C17) in the culture medium, including the C15 isoform, the most biologically active isoform, and C17, rarely described as well as the first detection of lipopeptides as fengicin and iturin directly in manioc food matrix. This food is widely consumed by populations in northern and northeastern Brazil and the knowledge about these substances could contribute to increased food safety and shelf life of this type of food.

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A produção de substâncias antimicrobianas por bactérias constituintes da microbiota presente em um produto alimentício brasileiro denominado de puba ou carimã, obtido por fermentação espontânea de raízes de mandioca (*Manihot esculenta*), é pouco estudada. O gênero *Bacillus* faz parte da microbiota residual deste produto. Este gênero inclui uma variedade de espécies importantes industrialmente e tem um histórico de uso seguro tanto em alimentos quanto na indústria. Os produtos que existem no comércio hoje e que são produzidos por *Bacillus* incluem enzimas, antibióticos, aminoácidos, biossurfactantes, lipopeptídeos e inseticidas além de bacteriocinas, sendo extensivamente pesquisada a subtilina e subtilosina A, produzida por *Bacillus subtilis* (KLEIN, KALETTA, ENTIAN, 1993). As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antibacterianas produzidas por bactérias que matam ou inibem o crescimento de outras bactérias filogeneticamente relacionadas. São produzidas por diferentes grupos bacterianos incluindo muitos membros do gênero *Bacillus*. Os surfactantes de origem microbiana e com alta capacidade emulsificante são denominados biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Estes têm recebido grande interesse, atualmente, como uma fonte alternativa aos surfactantes sintéticos, por possuírem inúmeras vantagens como biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, entre outras (MULLIGAN, 2005). Os biossurfactantes lipoprotéicos são, possivelmente, os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo melhor caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus* sp., incluindo surfactina, fengicina, liquenisina e substâncias da família das iturinas composta por iturina, micosubtilisina e bacilomicina (BARROS et al., 2007). A maioria dessas substâncias produzidas por bactérias é efetiva contra patógenos encontrados em alimentos bem como muitas espécies de outras bactérias deteriorantes Gram-positivas. Em virtude destas características, as bacteriocinas, os biossurfactantes e os lipopeptídeos possuem um elevado valor comercial para a aplicação na área de alimentos, médica e farmacêutica.

Os peptídeos antibacterianos estão ganhando mais atenção como uma alternativa terapêutica, bem como para a prevenção da deterioração e degradação de alimentos entre outros produtos (ANTHONY et al., 2009). A produção de bacteriocinas ou substâncias do tipo bacteriocina foi descrita em muitas espécies do gênero *Bacillus*, incluindo *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* e outros (JACK; TAGG; RAY, 1995; WU et al., 2005).

O uso de novas bacteriocinas na indústria de alimentos tende a aumentar nos próximos anos, à medida que as pesquisas e os esquemas de purificação sejam otimizados, tornando-se essencial a seleção de linhagens com relevância ecológica, pela dominância e habilidades metabólicas tornando-se assim candidatas à utilização como agentes biopreservantes. Portanto, os peptídeos antimicrobianos, dentre os quais as bacteriocinas são candidatas em potencial para a utilização em alimentos pois, embora existam vários métodos de preservação disponíveis, tem-se procurado dar ênfase aos processos que respeitam o princípio de biopreservação.

A natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas (hemolisinas) faz com que essas substâncias sejam degradadas no trato gastrointestinal de homens e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade. Segundo Marugg (1991), estudos realizados com várias bacteriocinas indicaram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos. Até o presente, as únicas bacteriocinas produzidas para conservação de alimentos são a nisina e a pediocina PA-1, vendidas com os nomes comerciais de Nisaplin® e Alta®, respectivamente.

Os biossurfactantes apresentam inúmeras aplicações que incluem tratamento de derrames de óleo no mar ou na terra, remoção de pesticidas do solo e também podem ser utilizados como estabilizadores de espuma, nas indústrias de alimentos, farmacêutica e na produção de sabões e detergentes (COOPER, 1986). Podem ser também utilizados como antimicrobianos (incluindo atividades antifúngica, antibacteriana e antiviral), como antiadesivos prevenindo a formação de biofilme em cateteres e outros dispositivos usados na instrumentação médica, na biorremediação de hidrocarbonetos, de metais, na limpeza de tanques, no controle biológico de patógenos em plantas em substituição aos pesticidas, na mineração, na indústria cosmética, de alimentos, de papel, têxtil, cerâmica e de tintas (MELO; AZEVEDO, 2008). Além disso, já há trabalhos mostrando que os biossurfactantes podem ter aplicações clínicas como uma alternativa aos agentes antimicrobianos sintéticos ou podendo ser incorporados em preparações probióticas para combater as infecções do trato urogenital (VELRAEDS et al., 1996).

Frente a essa realidade, torna-se necessário verificar o potencial antimicrobiano, caracterizar e investigar novas substâncias inibitórias produzidas por bactérias, incluindo as do gênero *Bacillus*. Inúmeras pesquisas mostram que alimentos naturalmente fermentados são fontes de micro-organismos produtores de substâncias antimicrobianas. Nesta pesquisa foram selecionados dois isolados de *Bacillus* sp. recuperados de puba ou carimã, um produto

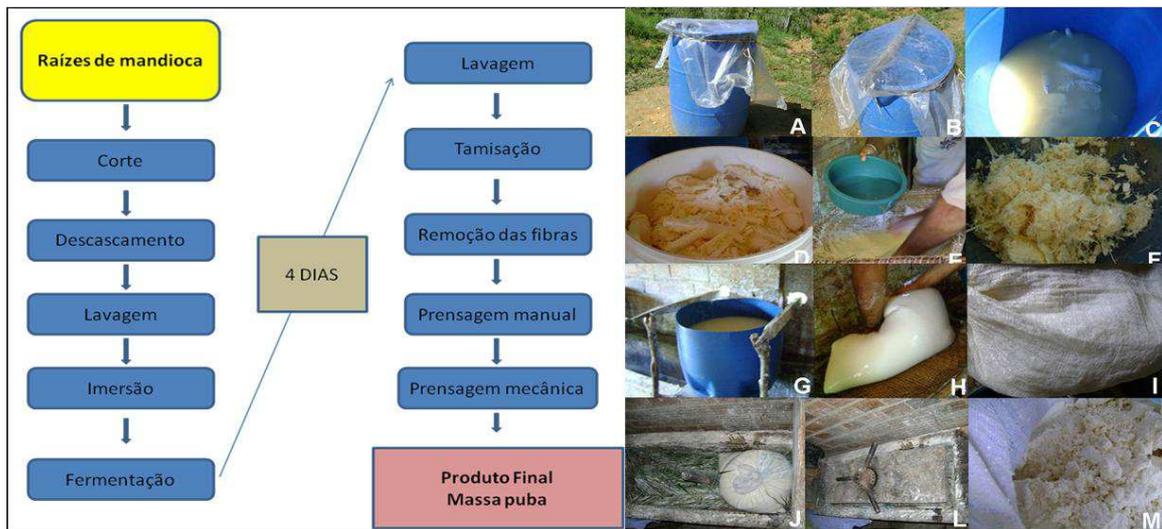
alimentício típico das regiões Norte e Nordeste do Brasil, obtido por meio de fermentação de raízes de mandioca submersas em água. Estes isolados foram pesquisados quanto ao seu potencial biotecnológico para produção de substâncias como bacteriocinas, lipopeptídeos antimicrobianos e biossurfactantes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ALIMENTOS NATURALMENTE FERMENTADOS

Puba ou carimã é um produto alimentício brasileiro de herança cultural indígena. As denominações deste produto são originadas da língua Tupi cujo significado corresponde a podre, fermentada e massa azeda de mandioca, respectivamente (ALMEIDA et al., 1993). A puba é obtida por fermentação espontânea de raízes de mandioca submersas em água. Basicamente, as raízes de mandioca com ou sem a película externa são imersas diretamente em água estagnada, geralmente em recipientes plásticos, ou dentro de um saco mantido em água corrente, como nos igarapésna região Norte do Brasil. Nos dois casos as raízes de mandioca permanecem nestas condições por 3 a 7 dias, período no qual ocorre a fermentação, processo denominado de pubagem, que resulta no amolecimento das raízes. Após o processamento das raízes para a separação das fibras obtem-se uma massa úmida com cheiro característico de produto fermentado (CRISPIM, 2013).

A puba é utilizada na culinária regional das regiões Norte e Nordeste do país, sob a forma de bolos, pés-de-moleque, pamonhas, cuscuz, mingaus e pudins (ALMEIDA et al., 1993). No estado de Sergipe (SE), a puba é preparada seguindo a tradição de origem indígena, quase sempre em pequena escala, sem padronização de matéria prima e sem cuidados específicos com a água ou recipientes utilizados. Portanto, este produto pode apresentar qualidade inconsistente, riscos higiênico-sanitários e pequena vida de prateleira. Além disto, muitas famílias da zona rural deste estado sobrevivem com a renda obtida da produção de puba. Geralmente, estas famílias plantam a mandioca e a processam em domicílio, sendo toda a produção comercializada em feira livre (CRISPIM, 2013). O fluxograma e as etapas de produção da puba são mostrados na figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma das etapas de produção de puba oriunda de Saco da Raiz, Estância (SE). Ilustrações do processo de pubagem: bombona contendo pedaços de raízes de mandioca submersas em água (A) e (B), aspecto das raízes de mandioca após a fermentação espontânea (C), aspecto das raízes pubadas após o descarte da água (D), tamisação e lavagem da massa (E), separação das partes não pubadas (F), aspecto do líquido obtido após a lavagem da massa (G), massa pubada dentro de um saco de algodão para a retirada manual da água (H), puba dentro do saco de náilon para prensagem (I), prensa de madeira para retirada da água (J), prensa fechada (L), puba pronta para consumo (M). Fonte: CRISPIM, 2013. Fotos Dayane Assad.

A microbiota da puba é pouco estudada. Crispim e colaboradores (2013) avaliou a microbiota láctica de 20 amostras de pubas, prontas para consumo, adquiridas em feiras livres de Teresina, Piauí. Nestas amostras foram isolados oito espécies de lactobacilos com predomínio de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus delbrueckii* (CRISPIM et al., 2013). Embora o gênero *Bacillus* não faça parte da microbiota dominante da puba, este foi encontrado como microbiota residual em amostras de pubas produzidas em Saco da Raiz, Estância, SE (CRISPIM et al., 2013).

## 2.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo G+C (Domínio Bacteria; Filo Firmicutes; Classe Bacilli; Ordem Bacillales; Família: Bacillaceae) e é mais estreitamente relacionadas com os gêneros *Listeria*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (WU et al, 2009). Espécies de *Bacillus* são onipresentes na natureza, tendo sido isoladas de ambientes tão diversos como água doce, água salgada, solo, plantas, animais, argilas, pedras, poeira, alimentos, ar e trato gastrointestinal de vários insetos e animais (NICHOLSON, 2002; PIGNATELLI et al., 2009). A diversidade fenotípica englobadas pelos membros do gênero

*Bacillus* é espetacular: altas temperaturas, extrema salinidade, condições ácidas e os sistemas imunológicos de muitos animais representam pouco desafio para alguns membros (KANDLER; WEISS, 1986).

Os membros do gênero *Bacillus* são Gram-positivos, aeróbios, formadores de endósporos e são caracterizados pela morfologia de bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 X 1,2 µm até 2,5 x 10 µm). Geralmente móveis graças aos flagelos peritríquios. *Bacillus anthracis* e *Bacillus mycoides* são imóveis.

Esta capacidade de sobreviver e crescer em diferentes ecossistemas é baseada na produção de seus endósporos robustos e na sua diversidade com relação as suas propriedades fisiológicas e seus requisitos para crescimento. As diferentes espécies de *Bacillus* são fenotipicamente e genotipicamente heterogêneas (SLEPECKY; HEMPHILL, 2006) e, conseqüentemente, eles apresentam propriedades fisiológicas bastante diversificadas, tais como a capacidade de degradar muitos tipos diferentes de substratos derivados de fontes vegetais e animais, incluindo a celulose, amido, proteínas, ágar, hidrocarbonetos e também biocombustíveis. Além disso, algumas espécies de *Bacillus* são nitrificantes heterotróficos, desnitrificantes, fixadores de nitrogênio, precipitadores de ferro, selênio-oxidantes, oxidantes e redutores de manganês, quimiolitotróficos facultativos, acidófilos, alcalófilos, psicrófilos, termofílicos entre outras propriedades. A diversidade nas propriedades fisiológicas permitiu a estas bactérias colonizar uma grande variedade de habitats. Essa capacidade de diversificação ecológica enorme foi então potencializada pela produção de esporos, que são caracterizados por sua notável capacidade de resistência e dormência. A resistência dos esporos ao calor, à desidratação e aos desinfetantes e outros meios de esterilização é de grande relevância para a indústria de alimentos devido ao seu interesse econômico na indústria de transformação (SLEPECKY; HEMPHILL, 2006).

Atualmente (2014), conforme o site “LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature” do pesquisador J.P. Euzéby há citação de 279 espécies e de 7 subespécies no gênero *Bacillus* spp. ([www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html](http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html)). Há efetivamente 172 espécies aceitas (GOMEZ, 2013).

Os membros deste gênero apresentam uma vasta gama de requisitos nutricionais, condições de crescimento, composição de bases do DNA e maior composição de aminoácidos da parede celular. Além da heterogeneidade fenotípica, eles também são filogeneticamente diversos (ASH et al., 1991), com grupos filogeneticamente distintos que emergem de uma análise comparativa da subunidade menor de rRNA. Deste modo, o grupo *Bacillus cereus*

inclui as seguintes espécies estreitamente relacionadas: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. cytotoxicus*, que pode ser dividido em sete grupos filogenéticos (GUINEBRETIERE et al, 2013). A taxonomia do grupo *B. cereus* é complexa e ambígua. Linhagens do grupo I (*B. pseudomycoides*), grupo VI (*B. weihenstephanensis* e *B. mycoides*) e grupo VII (*B. cytotoxicus*) parecem ser espécies diferentes, mas *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* são distribuídos por grupos II, III, IV e V sem formação de “clusters” de acordo com sua “espécie” (GUINEBRETIERE et al, 2013).

Em contraste, grupos genotípicos pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis* foram separados com nas análises de *Southern blot* descritas por Shida (2001), sendo estes *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavenensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* sp. *pizizenii*, *B. vallismortis*, *B. pumilus* e *B. atrophaeus* (GUERRA-CANTERA; RAYMUNDO, 2005).

As espécies do gênero *Bacillus* podem ser classificadas também segundo Gomez, 2013, conforme a morfologia do esporo e do esporângio em três grupos. O grupo I é formado por bacilos Gram positivos, apresentam esporo central ou terminal; esféricos ou ovóides; não deformam a célula. O grupo I é subdividido em outros dois subgrupos:

a) O grupo Ia constituído de bacilos de diâmetro superior a 1 µm, apresentando inclusões de poli-beta-hidroxibutirato (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*); e b) O grupo Ib constituído de bacilos com diâmetro inferior a 1 µm e desprovidos de inclusões de poli-beta-hidroxibutirato (*B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*).

O grupo II é constituído de espécies Gram variáveis; apresenta esporo oval, central ou terminal que deformam a parede celular (*B. circulans*, *B. stearothermophilus*).

O grupo III é caracterizado por bacilos Gram variáveis; apresentam um esporo esférico terminal ou subterminal e, igualmente, deformam a parede celular (*B. globisporus*, *B. insolitus*). *B. thuringiensis*, sintetiza um cristal composto de toxinas letais para insetos. A elaboração desse corpo para-esporo não é único no gênero *Bacillus*, pois o *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus popilliae*, *Brevibacillus laterosporus* e certas linhagens do *Paenibacillus lentimorbus* são capazes de produzir tais cristais (GOMEZ, 2013).

Desta forma, o denominado grupo *Bacillus cereus*, também chamado de *B. cereus latu sensu*, é um grupo taxonomicamente ambíguo que inclui seis espécies

estritamente relacionadas de acordo com a atual taxonomia: *B. cereus* e *B. weihenstephanensis*, que podem ser causadores de intoxicação alimentar; *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* que são espécies comuns e onipresentes no solo; *B. thuringiensis*, como patógeno de insetos e sua toxina amplamente utilizada como bioinseticida e *B. anthracis*, o agente causador do antraz (VILAS-BOAS et al. 2007; MAUGHAN; AUWERA, 2011). Recentemente, foi descrito neste grupo uma nova espécie termotolerante denominada de *Bacillus cytotoxicus* (GUINEBRETIERE et al., 2013).

Comparação utilizando genes *housekeeping* por meio de métodos como tipagem de sequência multilocus (MLST) e eletroforese enzimática multilocus (MEE) indicaram que *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* são uma espécie (HELGASON et al., 2000). Além disso, demonstrou-se que a similaridade de sequência do gene 16S rRNA de *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* é muito elevada (> 99 %) (SACCHI et al., 2002). No entanto, a hibridização DNA-DNA foi observada entre linhagens de diferentes grupos apenas abaixo do limiar de 70% o que indica que são diferentes espécies (NAKAMURA; JACKSON, 1995; GUINEBRETIERE et al., 2013).

*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis* formam colônias de tamanho grande (2 a 7 mm de diâmetro), foscas ou granuladas e de forma variáveis (circulares ou não, bordos regulares ou denteadas ou filamentosas). Já *B. mycoides* e o *B. pseudomycoides* produzem colônias rizóides e aderentes que se espalham por toda a superfície do ágar em 48 h. Algumas espécies ou certas cepas produzem pigmentos quando cultivados em meios especiais (pigmento vermelho para o *B. cereus*, pigmento amarelo para o *B. fastidiosus*, pigmento amarelo, laranja, âmbar, rosa para o *B. subtilis*). As espécies do gênero *Bacillus* esporulam logo que as condições não são favoráveis (um só esporo por célula vegetativa) e estes esporos são frequentemente muito resistentes no meio ambiente. A esporulação depende das condições de cultivo “*in vitro*”. Algumas espécies não esporulam em meios especiais (SNEATH et al., 1986, GOMEZ, 2013).

O perfil de ácidos graxos e lipídeos polares tem destacada importância na quimiotaxonomia do gênero *Bacillus* já que cada micro-organismo possui uma composição particular de lipídeos na membrana, a qual está adaptada à faixa de temperatura particular de crescimento. Estas diferenças também podem ser influenciadas por diferenças filogenéticas, por capacidades metabólicas distintas e por interação lipídeo-proteína específicas de cada bactéria. A formação destas classes de compostos pode ser então fortemente influenciada pelas condições de cultivo, de modo que, para todos os estudos condições de

crescimento altamente padronizadas devem ser empregadas. No entanto, devido à grande diversidade de seus requerimentos nutricionais e físico-químicos, tal padronização não pode ser alcançada para todas as espécies *Bacillus*. A composição de ácidos graxos aloca esses micro-organismos em seis grupos (de A a F). Todos os grupos, com exceção do grupo D, contém uma grande quantidade de cadeias ácidas ramificadas. O grupo E inclui as espécies *Bacillus anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Em contraste aos grupos A-D, pequenas porções (7 a 12%) de ácidos graxos insaturados estão presentes neste grupo. Os ácidos graxos predominantes (19-21%) são do tipo *iso*-C15 com comprimento da cadeia de 12-17 átomos de carbono (SNEATH, 1986; RUSSEL, 2002).

Ao longo do século passado essas seis espécies foram descritas como espécies individuais do gênero *Bacillus* usando testes para identificação baseados na gama de hospedeiros patogênicos, na morfologia das colônias e nas propriedades metabólicas como critérios de distinção, juntamente com testes como motilidade, resistência à penicilina e sensibilidade aos fagos gama. *B. anthracis* foi descrito em relação à patogênese da doença do antraz; *B. cereus* foi descrito como uma bactéria comumente associados com cereais. Durante o mesmo período, *B. mycoides* foi descrito com base na característica morfológica rizoidal das colônias em meios de cultura (MAUGHAN; AUWERA, 2011). Posteriormente, *B. thuringiensis* foi descrito com base em sua produção um cristal para-esporo e suas associadas propriedades entomocidas (BERLINER, 1915). No entanto, o surgimento de técnicas de hibridização de DNA, 16S rDNA e *Multilocus sequence typing* (MLST; <http://mlstoslo.uio.no>) progressivamente revelaram que essas espécies são muito mais estreitamente relacionadas do que seu *status* taxonômico implícito. Ao mesmo tempo, duas espécies adicionais foram descritas como membros do grupo: *B. pseudomycoides* como variedade genética de *B. mycoides* (NAKAMURA, 1989) e *B. weihenstephanensis* como uma variedade psicrotrófica de *B. cereus* *scripto sensu* (LECHNER et al., 1998). Mais recentemente, um *cluster* de cepas termofílicas de origem clínica foram propostas a representar nova espécie denominada de *Bacillus cytotoxicus* (GUINEBRETIERE et al., 2013). Deste modo, estas espécies compartilham muitas propriedades fenotípicas e um alto nível de similaridade de sequência de DNA que dificulta uma identificação adequada, atualmente, tanto por traços bioquímicos como por técnicas moleculares, como sequenciamento gene rRNA. Estudos sobre o genoma do grupo *B. cereus* revelaram que as características contidas nos plasmídeos são os principais responsáveis pela patogenicidade, enquanto que aquelas relacionadas aos cromossomos

apresentam diferenças limitadas no conteúdo genético. Esses achados têm questionado sua inter-relação taxonômica e até mesmo o status dessas espécies como espécies distintas (HELGASON et al 2000; RASKO et al. 2005). Entre os integrantes do grupo *B. cereus*, a espécie *B. cereus* está sendo cada vez mais relatada como implicada em muitos surtos de origem alimentar (Autoridade Européia de Segurança Alimentar 2009; FRICKER et al., 2007). Desta forma a identificação de *Bacillus cereus sensu stricto* constitui um desafio atual também para a indústria de alimentos. No entanto, Rasko et al. (2005) argumenta que vários métodos de tipagem molecular têm sido periodicamente apresentados com a alegação de que eles poderiam diferenciar *B. cereus sensu stricto* de *B. thuringiensis*, mas os resultados dos estudos genômicos têm demonstrado que é quase impossível que estas duas espécies possam ser consideradas geneticamente distintas.

Os membros do grupo *Bacillus* também são considerados bons produtores de substâncias antimicrobianas, incluindo antibióticos peptídicos e lipopeptídicos e bacteriocinas (STEIN, 2005). A produção de substâncias antimicrobianas e a capacidade de esporulação confere às linhagens de *Bacillus* uma dupla vantagem em termos de sua sobrevivência em diferentes habitats. A presença de espécies de *Bacillus* em alimentos nem sempre implica cepas de deterioração ou intoxicação alimentar e, algumas espécies, mesmo quando usadas na produção de alimentos humanos e animais, tais como, por exemplo, *Bacillus subtilis*, os que são usados na produção de *natto*, uma comida asiática fermentada (HOSO; KIUCHI, 2003). Além disso, linhagens específicas de *B. subtilis* são também utilizadas como culturas iniciadoras para fermentar soja no tradicional condimento do oeste africano *dawadawa* ou por fermentação de sementes nas mesquitas africanas para a produção do condimento alimentar nigeriano *okpehe* (OGUNTOYINBO et al., 2007).

### 2.3 BACTERIOCINAS E PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

O estudo de substâncias antibacterianas de natureza protéica começou em 1925, com a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli*. Posteriormente, em 1953, Jacob et al. introduziram o termo genérico bacteriocina, após verificarem que a produção destas substâncias ocorria em diferentes espécies Gram positivas e Gram negativas. No entanto, neste período, os estudos estavam centrados majoritariamente nos micro-organismos Gram-negativos; entretanto, estas bactérias associavam-se negativamente aos alimentos, ou seja, a sua presença não era desejável. Felizmente, o trabalho com colicinas permitiu o

desenvolvimento de métodos de detecção e isolamento de outras classes de bacteriocinas (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991).

As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por várias espécies do domínio *Bacteria* e por algumas cepas do domínio *Archaea* (RILEY; WERTZ, 2002). Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas produzem bacteriocinas que variam quanto às características bioquímicas, mecanismo de ação, massa molecular e codificação genética. As bacteriocinas de baixa massa molecular, por serem estáveis a temperaturas elevadas, possuem maior potencial de aplicação biotecnológica. No entanto, elas são menos freqüentes em bactérias Gram-negativas enquanto as bactérias do ácido láctico (BAL) produzem uma grande variedade de tais compostos (DIEP; NES, 2002). As bacteriocinas apresentam um elevado grau de especificidade de alvo contra bactérias relacionadas, embora muitos têm um maior espectro de atividade (JACK; TAGG; RAY, 1995). Sua natureza protéica implica numa suposta degradação no trato gastrointestinal de seres humanos e animais, sugerindo seu uso como conservante natural em alimentos (CLEVELAND et al., 2001). A maioria desses peptídeos tem como alvo a membrana citoplasmática das células e, além disso, são catiônicos sob condições fisiológicas e assumem estrutura de hélice, em alguns casos de folhas pregueadas, que são importantes para seu mecanismo de ação (CHEN; LUDESCHER; MONTVILLE, 1997).

Há relatos na literatura de substâncias antimicrobianas que não foram bem caracterizadas e que são conhecidas como substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocinas (BLIS) ou substância tipo bacteriocina (*bacteriocin-like*). Este termo é muito utilizado quando a natureza peptídica do composto antimicrobiano não foi totalmente elucidado. Além disso, essas BLIS, geralmente, possuem um maior espectro de ação do que a definição clássica de bacteriocinas, atuando contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, algumas Gram-negativas e até contra alguns fungos filamentosos (DE VUYST, VANDAMME, 1994).

Estudos recentes mostram que a produção de peptídeos antimicrobianos é uma característica universal do sistema de defesa não específico de uma grande variedade de seres vivos como bactérias, plantas e animais (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Até 1999 foram encontrados e caracterizados em torno de 400 peptídeos antimicrobianos diferentes e há um grande interesse no estudo destas substâncias devido às suas potenciais aplicações tanto na área médica como na área de tecnologia de alimentos (HANCOCK; CHAPPLE, 1999). No entanto, além das bacteriocinas, as bactérias produzem também peptídeos sintetizados não

ribossomicamente tais como gramicidinas, polimixinas, bacitracinas e outras (NISSEN-MEYER; NES, 1997; HANCOCK; CHAPPLE, 1999).

Peptídeos antimicrobianos, ao contrário de muitos dos antibióticos convencionais, parecem ser bactericidas ao invés de bacteriostáticos e exigem um curto tempo de contato para induzir a eliminação de patógenos. Além destas propriedades, tem sido demonstrado que estas substâncias apresentam um número de funções imunomoduladoras que podem estar envolvidas na depuração/controle da infecção, incluindo a capacidade de alterar a expressão gênica do hospedeiro. Podem atuar como quimiocinas e/ou induzir a produção de quimiocinas, inibir lipopolissacarídeo indutor de produção de citocinas pro-inflamatórias, promover a cicatrização de feridas e modular as respostas das células dendríticas e células da resposta imune adaptativa (CHEN; LUO, 2009).

Os peptídeos antimicrobianos também podem ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais em duas classes: lineares e cíclicos. Os lineares não apresentam o aminoácido cisteína em sua composição e podem ser subdivididos nos que formam uma  $\alpha$ -hélice anfipática após contato com a membrana celular, por exemplo, magainina obtida de sapo (HARA et al., 2001) e nos que são ricos em um determinado tipo de aminoácido, tais como prolina, histidina e triptofano, por exemplo, indolicidina obtida de bovino (ROZEK; FRIEDRICH; HANCOCK, 2000). Os cíclicos são peptídeos que apresentam resíduos de cisteína em sua estrutura, podendo ter as extremidades aminoterminalis abertas, como por exemplo, drosomicina obtida da mosca *Drosophila melanogaster* (LANDON et al., 1997), ou as extremidades fechadas, por exemplo, teta-defensina obtida de macaco (TRABI; SCHIRRA; CRAIK, 2001).

### **2.3.1 Peptídeos antimicrobianos produzidos por espécies de *Bacillus* e classificação de bacteriocinas de *Bacillus***

A capacidade de produção de peptídeos antimicrobianos é amplamente encontrada entre as bactérias Gram-positivas, incluindo o gênero *Bacillus*. Estas substâncias são dirigidas contra micro-organismos competitivos e, assim, geram uma vantagem competitiva para seus produtores. No entanto, atualmente, as bacteriocinas mais estudadas são aquelas produzidas por BAL, devido à sua potencial utilização como bioconservadoras na indústria de alimentos, considerando o em geral reconhecido status de muitas cepas como sendo seguras (GRAS) (O'SULLIVAN et al., 2002), e também aqueles produzidos por espécies industrialmente

importantes de *Bacillus*, que têm uma história de utilização segura na indústria de alimentos (PEDERSEN et al., 2002).

Bacteriocinas e BLIS produzidas pelo gênero *Bacillus* como um todo, podem ser consideradas como a segunda mais importante, depois de bacteriocinas produzidas por BAL. Linhagens do gênero *Bacillus* produzem um gama diversificada de peptídeos antimicrobianos, com diferentes estruturas químicas básicas (GEBHARDT et al, 2002;. STEIN, 2005). Até momento, nenhum esquema de classificação foi elaborado para as bacteriocinas do gênero *Bacillus* apesar de todos os esforços de classificação feitos com as bacteriocinas de BAL. Este é provavelmente um resultado da falta de informação sobre muitas das seqüências de aminoácidos destas bacteriocinas ou devido à considerável diversidade de peptídeos/proteínas produzidas por *Bacillus*. Alguns peptídeos antimicrobianos foram incluídos nos grupos ou classes descritas anteriormente para as bacteriocinas de BAL. Exemplos disso são os lantibióticos, a única classe conhecida para peptídeos antimicrobianos do gênero *Bacillus* que estão incluídos na Classe I do esquema de classificação das bacteriocina de BAL (NES; YOON; DIEP, 2007; FRANZ et al, 2007). Os lantibióticos são sintetizados ribossomalmente como precursores de peptídeos. Eles são modificados pós-traducionalmente pela desidratação de resíduos de serina e treonina e subsequente adição intramolecular de cisteína, resultando na formação de ( $\beta$ -metil) pontes tioéter lantionina, característica estrutural de elementos como lantibióticos (BIERBAUM; SAHL, 2009). Além disso, várias bacteriocinas/BLIS produzidos por espécies de *Bacillus* pertencem à classe II de bacteriocinas LAB (como definida por KLAENHAMMER, 1993; NES; YOON; DIEP, 2007), que inclui as bacteriocinas similares a pediocina (Classe IIa) e as bacteriocinas de dois peptídeos (classe IIb). No entanto, Abriouel et al. (2011) propôs um esquema simples para a classificação de bacteriocinas/BLIS produzidas por espécies do gênero *Bacillus* que será descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação proposta para as bacteriocinas de *Bacillus* em comparação com a classificação proposta para BAL.

Bacteriocinas de <i>Bacillus</i>	Exemplos	Bacteriocinas de BAL (NES ; YOON; DIEP, 2007)
Classe I. (lantibióticos) peptídeos modificados pós-traducionalmente		Classe I. Lantibióticos
Subclasse I.1. Peptídeo único alongado	Subtilina, ericina S, ericina A	
Subclasse I.2. Outro peptídeo único	Sublacina 168, mersacidina, paenibacilina	
Subclasse I.3. Dois peptídeos	Haloduracina, lichenicidina	
Subclasse I.4. Outro peptídeo pós-traducionalmente modificado	pós-Subtilosina A	
Classe II. Peptídeos não modificados		Classe II. Peptídeos pequenos, lineares
Subclasse II.1. Peptídeos semelhantes a pediocina	Coagulina, SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580	Classe IIa
Subclasse II.2. Peptídeos semelhantes a thuricina	Thurincina H, thuricina S, thuricina 17, bacthuricina F4, cereina MRX 1	
Subclasse II.3. Outros peptídeos lineares	Cereina 7A, cereina 7B, lichenina, thuricina 439	
Classe III. Grandes proteínas	Megacina A-216, megacina A-19213	Classe III. Bacteriocinas grandes e termolábeis

Fonte: ABRIOUEL et al., 2011.

Algumas bacteriocinas produzidas por espécies do gênero *Bacillus* pertencem ao grupo dos lantibióticos (WILLEY; VAN DER DONK, 2007; BIERBAUM; SAHL, 2009). Os lantibióticos têm sido divididos previamente em dois grupos ou tipos: um tipo inclui os alongados e com carga positiva, enquanto o tipo B inclui os globulares e com cargas neutras (JUNG, 1991). O lantibiótico de tipo A pode ser ainda mais subagrupados (subgrupos AI e AII) de acordo com as enzimas que estão envolvidas na maturação das moléculas (WILLEY; VAN DER DONK, 2007). No entanto, dado o número crescente de lantibióticos descritos em diferentes grupos de bactérias, é muito difícil estabelecer um esquema de classificação unificador e várias outras classificações foram propostas (NES; YOON; DIEP, 2007). Portanto, o sistema de classificação de bacteriocinas de *Bacillus* deve funcionar independente do sistema de classificação de bacteriocinas de

BAL, embora alguns compostos produzidos por ambos, *Bacillus* e BAL tenham características muito semelhantes. No sistema de classificação proposto nesta revisão para bacteriocinas de *Bacillus* (Tabela 1), a Classe I inclui peptídeos antimicrobianos que sofrem diferentes tipos de modificação pós-traducionais. Esta classe pode ser subdividida em quatro subclasses. Subclasses I.1-I.3 incluem peptídeos com modificações estéricas de antibióticos (por exemplo, a formação de lantionina e resíduos de β-metil lantionina), enquanto a subclasse I.4 inclui outras modificações únicas. Subclasse I.1 inclui antibióticos tipo A com uma estrutura alongada, como a subtilina, ericina S e ericina A. A subclasse I.2 inclui antibióticos globulares do tipo B como mersacidinas e outros antibióticos como sublancina 168 e paenibacillina. A subclasse I.3 inclui os dois componentes antibióticos, como haloduracina e lichenicidina. A subclasse I.4 inclui o único peptídeo cíclico subtilosina A que contém uma ligação peptídica *head-to-tail* bem como as particulares pontes de sulfeto formado entre grupos de cisteína e resíduos desidratados de aminoácidos. Esta classificação é coerente com *clustering* obtidos da análise comparativa publicada de seqüências de aminoácidos. A subtilina e ericinas formam um cluster coerente, que é caracterizado por regiões altamente conservadas no peptídeo maduro bem como nas seqüências líder de peptídeo. Curiosamente, as subunidades A1 e A2 de haloduracina e lichenicidina também formam conjuntos coerentes, sugerindo que ambos peptídeos antibióticos compartilham uma origem comum. Mersacidina também mostra homologia com a subunidade A1 dos dois peptídeos antibióticos e especialmente com a subunidade A1 de lichenicidina, com 25 resíduos conservados em posições idênticas, indicando seu parentesco com os dois peptídeos antibióticos (Fig. 1).

Bacteriocinas da Classe II incluem peptídeos pequenos (0,7710 kDa), ribossomalmente sintetizados, não modificados e peptídeos lineares que são estáveis ao calor e mudanças de pH. Esta classe pode ser subdividida em quatro subclasses. A subclasse II.1 inclui peptídeos semelhantes a pediocina com a estrutura YGNGVXC conservada próxima ao N-terminal e a coagulina produzida por *B. coagulans* I<sub>4</sub>, bem como a bacteriocina produzida por *Bacillus circulans* e por linhagens de *Paenibacillus polymyxa* (SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580) pertencem a essa subclasse. A subclasse II.2 inclui peptídeos semelhantes a turicina com a estrutura DWTXWSXL conservada perto do N-terminal, com o bacthuricina F4, thurincina H e S e 17 produzidos por linhagens de *B. thuringiensis* e cereina MRX1 produzido por linhagens de *B. cereus*. A análise comparativa da seqüência de aminoácidos de peptídeos semelhantes a turicina mostrou um cluster coerente. A subclasse II.3 inclui

outros peptídeos lineares, como lichenina produzido por *B. licheniformis*, ou cereinas 7A e 7B.

A Classe III inclui grandes proteínas (430 kDa) com atividade fosfolipase como megacinas A-216 e A-19213 produzido por linhagens de *Bacillus megaterium*. Muitos outros polipeptídeos antimicrobianos de tamanho intermediários (10–30kDa) e outras grandes proteínas antimicrobianas produzido por bactérias do gênero *Bacillus* não estão incluídos neste sistema de classificação devido à falta de dados sobre a sua proteína ou sequências gênicas, embora eles sejam referidos normalmente sob a categoria de BLIS.

### 2.3.1.1 Subtilina

Subtilina é uma bacteriocina do tipo lantibiótico sintetizada por *Bacillus subtilis*. Lantibióticos possuem uma atividade antimicrobiana elevada contra diversas bactérias Gram-positivas tais como *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp. (COTTER; HILL; ROSS, 2005 a). A subtilina é muito similar à nisina, que é a mais importante bacteriocina do grupo dos lantibióticos lineares e é usada como um conservante de alimentos (ARAUZ et al., 2009). Como descrito anteriormente para outros lantibióticos, a subtilina é sintetizada ribossomalmente como um pré-peptídeo inativo e modificado pós-transcricionalmente. O transcrito preliminar dos genes deste lantibiótico é um pré-peptídeo de 56 aminoácidos que consiste em uma sequência líder N-terminal seguido por um pré-peptídeo C-terminal que é a proteína ativa, com 32 aminoácidos. O peptídeo maduro contém aminoácidos modificados como lantionina, dehidroalanina e dehidrobutirina (BANERJEE; HANSEN, 1988; STEIN, 2005). A biossíntese desta bacteriocina é baseada na expressão de dez genes que estão organizados no cluster gênico *spaBTCSIFEGRK*. O gene *spaS* codifica o pré-peptídeo da subtilina ao qual são introduzidos enzimaticamente aminoácidos modificados pelos produtos dos genes *spaB* e *spaC*. O precursor modificado é transportado através da membrana citoplasmática pelo transportador ABC codificado por *spaT*, que parece ser um complexo associado a membrana com enzimas modificadas SpaB e SpaC. As células são protegidas contra a atividade antimicrobiana pela produção de uma proteína de imunidade composta por SpaI, SpaF e SpaG. Já os genes *spaR* e *spaK* são responsáveis por dois sistemas regulatórios da bacteriocina subtilina (WILLEY; VAN DER DONK, 2007). A expressão dos genes de imunidade e biossíntese da subtilina são reguladas por dois mecanismos diferentes. Durante a fase de crescimento exponencial, a proteína

reguladora de estado de transição, AbrB, atua como um repressor da biossíntese da subtilina e somente um nível basal das proteínas SpaBTC são sintetizadas. Conseqüentemente, uma pequena quantidade de subtilina é produzida, quantidade esta, insuficiente para a indução da cascata de regulação. Ao final do crescimento exponencial, a síntese de AbrB é reprimida, seguida da indução do fator sigma H (STEIN et al., 2002). O fator sigma induz a transcrição de *spaRK* e a Spak histidina quinase é expressa. A partir de uma concentração limiar, a subtilina atua nas vias SpaRK 20 como um indutor transcricional de *spaS* e *spaBTC*, resultando na produção aumentada de subtilina. Mecanismos semelhantes de regulação são descritos também, para a biossíntese da nisina e mersacidina (STEIN et al., 2003).

### 2.3.1.2 Subtilosina A

Subtilosina A foi isolada originalmente por Babasaki et al. (1985) da linhagem selvagem de *Bacillus subtilis* 168, e a sequência de aminoácidos incompleta foi relatada. A sequência completa foi publicada posteriormente por Zheng et al. (1999), e uma elucidação adicional foi fornecida por Marx et al. (2001). Determinou-se uma molécula circular de 32 aminoácidos, contendo alguns aminoácidos que são modificados pós-transcricionalmente com três átomos de enxofre com ligação cruzada entre a cisteína e o carbono  $\alpha$  de duas fenilaminas e um resíduo de treonina, sendo um peptídeo de 3,4 kDa (BABASAKI et al., 1985; JACK; TAGG; RAY; KAWULKA et al., 2004). O operon para a bacteriocina subtilosina A (Fig. 2) é composto por oito genes, *albABCDEFG* e *sboA* com 7kb (ZHENG et al., 2000). Estudos da natureza da atividade antilisterial produzidas por linhagens selvagens de *B. subtilis* foram conduzidos. O gene *sboA*, que codifica a bacteriocina subtilosina, e os genes do operon *alb* (*albA* - *G* são, respectivamente, genes *ywiA*, *ywhR*, *ywhQ*, *ywhP*, *ywhO*, *ywhN*, e *ywhM*), funcionam na produção de atividade antilisterial. Os produtos de *albB*, *albC*, e *albD* atuam na imunidade da subtilosina. Uma bactéria produzindo uma bacteriocina é imune a bacteriocina específica que produz (ZHENG et al., 1999; ZHENG et al., 2000). A regulação da expressão do operon *sboA-alb* é complexa, sendo induzida em culturas de crescimento tardio aparentemente em resposta à inanição e pela limitação de oxigênio (ZHENG et al., 1999; NAKANO et al., 2000). Muitos dos fatores que governam a expressão dos genes em resposta à inanição e a limitação de oxigênio foram identificados em *B. subtilis* (NAKANO et al., 1996; NAKANO; ZUBER, 1998; NAKANO et al., 2000; ZHENG et al., 2000). A transcrição do operon *sboA-alb* é intensamente induzida pela limitação de oxigênio via um sistema de

transdução de sinal ResD-ResE, que desempenha um papel fundamental na respiração anaeróbica. Além deste sistema, a proteína reguladora de estado de transição AbrB atua reprimindo a transcrição do operon independentemente da via ResDResE (INAOKA et al., 2003). Adicionalmente, Rok, conhecido por ser um regulador do competente desenvolvimento, reprime a transcrição de *sboA-alb* (ALLENBY et al., 2006). Não se sabe como esses múltiplos fatores de regulação refletem sobre os genes da subtilosina A e seu papel fisiológico, mas sabe-se que as condições de estresse induzem a expressão do operon (STRAUCH et al., 2007).

Subtilosina tem uma comprovada eficácia contra *L. monocytogenes*, como indicado por diferentes estudos (ZHENG et al., 1999; STEIN et al., 2004). Isto demonstra uma opção atrativa que deve ser investigada pela indústria alimentar. Shelburne et al. (2007) conduziram um estudo mais detalhado em relação ao espectro de atividade antimicrobiana desta bacteriocina. Seus resultados sugerem que a bacteriocina tem a capacidade de atuar contra um amplo espectro de micro-organismos, mas sua ineficácia contra organismos capsulados limitam seu valor prático. Os autores diminuíram a importância da subtilosina como um agente antimicrobiano; isto, entretanto, é contradito por Sutyak et al. (2008 a) que indicam sua utilidade contra patógenos vaginais tais como *Gardnerella vaginalis* e *Streptococcus agalactiae*.

Subtilosina A é sintetizada por *B. subtilis*, bem como *Bacillus amyloliquefaciens* (STEIN et al., 2004; SUTYAK et al., 2008 b) e *Bacillus atrophaeus* (STEIN et al., 2004). Assim, subtilosina A foi considerada única devido ao seu processo de maturação e estrutura molecular incomuns (KAWULKA et al., 2004), que apoiam a sua inclusão como uma subclasse distinta dentro do sistema de classificação de bacteriocinas de *Bacillus* (ABRIOUEL et al., 2011).

## 2.4 BIOSSÍNTESE E DIVERSIDADE DAS BACTERIOCINAS

Segundo Souza; Silva; Sousa (2005), as bacteriocinas têm seu processo de síntese mediado por mecanismos genéticos e desenvolvem sua ação letal sobre a célula microbiana por meio de inúmeros mecanismos que podem agir tanto de forma isolada quanto concomitantemente, culminando com a morte da célula microbiana. Além disso, estas moléculas que são produzidas por linhagens bacterianas Gram-positiva e Gram-negativa, quando submetidas a condições de estresse, apresentam estabilidade ao calor, pH baixo,

refrigeração, congelamento, resistência à ácidos orgânicos fracos, sais e enzimas, sendo no entanto, muito sensíveis à enzimas proteolíticas.

É conhecido que a síntese de bacteriocinas envolve quatro diferentes genes: o responsável pela produção do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina; o responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o da produção das proteínas do transporte ABC que externalizam a bacteriocina e, por fim, o gene que codifica uma proteína acessória, não pertencente, mas necessária para a excreção da bacteriocina. A função específica desta proteína acessória, ainda não é completamente conhecida (NES et al, 1996).

Primeiramente as bacteriocinas são sintetizadas, na forma de pré-peptídeos ou pré-bacteriocinas biologicamente inativos que contêm uma seqüência de 18 a 27 aminoácidos, apresentando 2 glicinas na região N-terminal. As funções dessa seqüência de aminoácidos são de evitar que a bacteriocina seja biologicamente ativa dentro da célula produtora e servir como sinal de reconhecimento para o sistema de transporte que envolve as proteínas do transporte ABC e uma proteína acessória (NES et al, 1996). As duas glicinas presentes na seqüência de aminoácidos são as responsáveis pelo reconhecimento da pré-bacteriocina no sistema de transporte. Após o reconhecimento do pré-peptídeo, a seqüência de aminoácidos é removida, e a bacteriocina, excretada da célula (ENNAHAR et al., 2000).

Quanto a sua produção, estas substâncias podem ser consideradas metabólitos primários, quando sua síntese ocorre na fase exponencial de crescimento, fato este de extrema importância para o desenvolvimento do micro-organismo produtor. Já quando são produzidas após a fase de crescimento ativo exponencial, elas passam a ser consideradas metabólitos secundários, não sendo vital para o crescimento do microrganismo produtor, embora estejam envolvidas em processos de manutenção deste, em determinado ambiente (DE VUYST; CALLEWAERT; CRABBÉ, 1996).

## 2.5 MECANISMO DE AÇÃO DAS BACTERIOCINAS

O antagonismo exercido pelas bactérias produtoras de bacteriocinas em outras bactérias inseridas no mesmo ambiente é definido como antibiose. Este mecanismo ocorre quando dois ou mais micro-organismos presentes no ambiente podem interferir adversamente no crescimento e na sobrevivência de outros. Assim, existe uma série de formas que podem ocasionar este antagonismo, como competição por nutrientes essenciais, acúmulo de D – aminoácidos, redução do potencial de oxidação-redução, desequilíbrio na função da

membrana plasmática (afetando a síntese de energia e a permeabilidade), inibição da síntese de ácidos nucleicos, degradação não específica do DNA celular, interferência na síntese de proteínas, clivagem específica do rRNA 16S e mudança nos mecanismos de tradução da célula. Há ainda algumas linhagens que podem sofrer lise das células (RILEY, 1998; HANCOCK, CHAPPLE, 1999; SOUZA, SILVA; SOUSA, 2005).

Oscáris; Pisabarro (2001) afirmam, no entanto, que a maioria das bacteriocinas age formando canais na membrana ou poros transversalmente à bicamada fosfolipídica, que destroem o potencial energético das células sensíveis. No entanto, a membrana externa das bactérias Gram-negativas, impenetráveis a estes peptídeos, geralmente previne a atividade antimicrobiana (PAPAGIANNI, 2003). Conforme Desmazeaud (1997), além das diferenças estruturais na membrana citoplasmática, as bactérias Gram-negativas possuem membrana externa que constitui uma barreira física que dificulta a ligação das bacteriocinas na membrana plasmática. Assim, o acesso da bacteriocina à membrana citoplasmática constitui a chave para a atividade.

A ação biológica das bacteriocinas do tipo colicinas ocorre através de receptores específicos localizados na superfície da célula-alvo, situação em que após ocorrer a ligação a estes receptores, diversos mecanismos provocam a morte da célula microbiana. Desta forma, as bacteriocinas constituem poderosas toxinas, específicas, que são normalmente produzidas durante a exposição a alguma linhagem bacteriana sob condições de estresse e que quando são liberadas no ambiente causam rapidamente a eliminação de células microbianas vizinhas sem imunidade ou não resistentes (SOUZA; SILVA; SOUSA, 2005).

## 2.6 INDUÇÃO/ESTÍMULO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os micro-organismos utilizam considerável energia para o desenvolvimento de mecanismos antimicrobianos e síntese de peptídeos de defesa, porém ainda não está claro como o desenvolvimento destes compostos afetam as comunidades microbianas (RILEY; WERTZ, 2002). Deste modo, os peptídeos antimicrobianos podem ter uma relação direta com a defesa e prevenção de invasão por outras espécies de micro-organismos dentro do nicho ocupado ou limitando o avanço de células vizinhas. A mediação do sistema *quorum-sensing* tem um papel adicional na possível explicação destes mecanismos para bactérias Gram-positivas (MILLER; BASSLER, 2001).

O mecanismo de *quorum sensing*, mediado por um fator de indução (PLNC8IF), parece estar envolvido neste processo. O fenômeno de indução da produção de bacteriocinas tem sido pouco investigado, mas diversos estudos mostraram a interferência de outros microorganismos na síntese de bacteriocinas por bactérias ácido-láticas que são reportadas pela literatura. Inclusive, este mecanismo de *quorum-sensing* pode ser uma estratégia para aumentar significativamente a síntese de substâncias antimicrobianas de origem não protéica ou protéica (bacteriocina) (ROJO-BEZARES et al., 2007). No entanto, há muito poucos relatos sobre o efeito da competição microbiana na ativação da síntese de bacteriocinas por bactérias do gênero *Bacillus*.

## 2.7 PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS

Inicialmente, as bacteriocinas eram parcialmente purificadas e caracterizadas por meio de ensaios utilizando enzimas proteolíticas, para a comprovação de sua natureza protéica. Atualmente, métodos avançados de purificação de proteínas têm permitido a descrição de muitas bacteriocinas. Entretanto, algumas vezes, a purificação completa de uma bacteriocina não é obtida, nestes casos a utilização do termo substância antagonista do tipo bacteriocina (BLIS) é mais adequado (JACK; TAGG; RAY, 1995).

A utilização de peptídeos antimicrobianos, tanto para estudo quanto para aplicação, normalmente requer a purificação destas substâncias. Diversas técnicas têm sido empregadas pelos pesquisadores. Geralmente o processo inicia-se com a centrifugação da cultura para separar as células do sobrenadante e posteriormente este é concentrado através da precipitação com sulfato de amônio (ou outros sais e solventes). Em etapas posteriores são utilizados métodos cromatográficos como cromatografia de gel filtração, de troca iônica, de interação hidrofóbica e de fase reversa (SANTOS et al., 1994; JACK; TAGG; RAY, 1995; UTENG et al., 2002). Também pode ser utilizada a extração com solventes orgânicos. No entanto, apesar destas técnicas levarem à produção de preparações altamente puras, o rendimento final normalmente é baixo e inferior a 20% (JACK; TAGG; RAY, 1995).

Outra estratégia utilizada para a purificação de bacteriocinas baseia-se na propriedade da bacteriocina adsorver as células produtoras (YANG; JOHNSON; RAY, 1992). A técnica consiste no aquecimento da cultura após a produção da bacteriocina, para matar as bactérias, sendo previamente ajustado o pH, visto que a adsorção das bacteriocinas são dependentes do pH. Posteriormente deixar-se-ia uma noite a 4° C, sob agitação magnética, a fim de permitir a

adsorção da bacteriocina às células mortas. Então, após separar as células do sobrenadante, estas seriam lavadas e suspensas em tampão adequado. Posteriormente, seriam novamente agitadas sob refrigeração para permitir a liberação da bacteriocina adsorvida, sendo obtido, assim, o sobrenadante (YILDIRIM; JOHNSON, 1997; ATRIH et al., 2001).

Não existe nenhum método universal para purificação destas substâncias, uma vez que estas podem diferir substancialmente na sua seqüência de aminoácidos e outras propriedades, como a carga líquida ou hidrofobicidade. As bacteriocinas apresentam um tamanho molecular pequeno e são muitas vezes difíceis para separar dos componentes de digestão de proteína, como peptonas e triptonas, usados em meios de cultura. Estes componentes podem interferir diretamente na atividade da nisina, por exemplo. A nisina comercial está disponível como preparação em pó e não completamente solúvel. Pesquisadores (CLEVELAND; CHIKINDAS; MONTVILLE, 2002) mostraram haver diferenças na atividade da preparação comercial de Nisaplin (2,5% nisina) e da nisina pura. Eles especularam que as proteínas do leite nas preparações vinculadas à nisina, limitam a atividade antimicrobiana. Portanto, a purificação parcial ou total de bacteriocina pode aumentar a sua atividade e desempenho. Os métodos cromatográficos convencionais empregados no processo de purificação de bacteriocinas e lipopeptídeos propostos na literatura, frequentemente produzem resultados satisfatórios apenas em pequena escala. Eles são caros, apresentam baixo rendimento, muitas vezes de difícil execução e são inadequados para a produção industrial em larga escala (LÓPEZ et al., 2007). Métodos baseados na interação hidrofóbica cromatográfica utilizando coluna de octil-Sepharose ou butil-Sepharose adsorção/desorção, sistemas de duas fases aquosa, podem diminuir potencialmente os custos de purificação (ARAUZ et al, 2009).

## 2.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molar de compostos eletricamente carregados, ou íons previamente formados (COLE, 1997). Estes íons são selecionados de acordo com a razão massa-carga ( $m/z$ ), sendo  $m$  a massa em u (massa atômica unificada), definida como 1/12 da massa de um átomo do isótopo de  $^{12}\text{C}$ , o qual foi designado como 12 u por convenção (GROSS, 2004).

A espectrometria de massas provou-se uma ferramenta muito útil nos campos da análise de proteínas e de peptídeos, bem como na análise proteômica. Espectrômetros de massas consistem em três componentes principais, nomeadamente a fonte, o analisador e o

detector. A fonte cumpre a função de ionizar as moléculas presentes na amostra. Os íons gerados são então separados em função de sua relação massa/carga ( $m/z$ ) e pelo *analisador* e detectados pelo *detector*. A unidade *Thomson* [Th] (em homenagem a J. J. Thomson) é também utilizada, em substituição à grandeza adimensional  $m/z$ , assim, as unidades Th e  $m/z$  são equivalentes (GROSS, 2011). Em suma, o funcionamento de um espectrômetro de massas baseia-se na conversão dos componentes de uma mistura de moléculas ionizadas cujo  $m/z$  é subsequentemente aferido. Os dados são registrados automaticamente e podem ser extraídos para interpretação manual ou assistida por computador (LIEBLER, 2002). Assim, independentemente do interesse analítico, a espectrometria de massas visa à identificação de compostos a partir da massa atômica de seus constituintes. Tal identificação pode ser derivada apenas da informação da massa molecular do analito, ou pode ser assistida pela verificação da abundância relativa de isotopólogos e/ou pela avaliação da massa de íons resultantes da fragmentação da molécula de interesse (GROSS, 2011).

O principal desafio da espectrometria de massas de biomoléculas reside na etapa de ionização, a qual envolve transferir moléculas altamente polares de até dezenas ou centenas de kDa à fase gasosa sem destruí-las. Tal obstáculo foi superado por meio do desenvolvimento de técnicas de ionização branda tais como a eletronebulização (electrospray ionization – ESI) e a ionização e dessorção por laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization* - MALDI) (STEEN; MANN, 2004).

A combinação de fontes de íons com uma variedade de analisadores permitiu que os instrumentos atingissem níveis de desempenho nos critérios de sensibilidade, de precisão e de resolução que há pouco mais de uma década eram impensáveis para a análise de biomoléculas (ESCOUBAS, 2006). Os quatro tipos básicos de analisadores empregados na análise proteômica são os quadrupolos (Q), os do tipo tempo de voo (*time of flight* - TOF), os do tipo armadilha de íons (*ion trap* - IT) e os de ressonância em cíclotron de íons e transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance* - FT-ICR). Recentemente, o analisador do tipo Orbitrap, também baseado na transformação de Fourier, tornou-se o padrão em laboratórios de pesquisa biológica avançada. Ademais, aplicam-se instrumentos que combinam analisadores tais como os quadrupolos-tempo de voo (*quadrupole-time of flight* - QqTOF) e os tempo de voo-tempo de voo (*time of flight-time of flight* - TOF-TOF) (GROSS, 2011). A chamada espectrometria de massas *in tandem* engloba várias técnicas nas quais íons são selecionados com base em seu  $m/z$ , fragmentados e submetidos a uma segunda análise espectrométrica. Essas técnicas objetivam a aquisição e o estudo do espectro dos íons

resultantes da fragmentação de um precursor de interesse. Tais fragmentos estão relacionados à estrutura do íon precursor, o que permite a determinação de sua estrutura a partir da interpretação de seu espectro de fragmentação. Também referida como “espectrometria de massas/espectrometria de massas”, a espectrometria de massas *in tandem* é, por esse motivo, designada como MS/MS ou MS<sup>2</sup> (LIEBLER, 2002; GROSS, 2011). Um instrumento desenhado para realizar experimentos MS/MS precisa ter incorporado ao menos dois estágios de análise espectrométrica, configurados segundo o conceito MS/MS no espaço ou MS/MS no tempo.

O desafio representado pela interpretação de espectros MS/MS de peptídeos é grandemente aumentado quando não se possuem quaisquer informações prévias sobre sua seqüência de aminoácidos, i.e., seqüenciamento de novo (PAPAYANNOPOULOS, 1995). A interpretação de novo ainda não pode ser realizada de maneira confiável por recursos de *software*, sendo ainda uma tarefa que requer o esforço ‘manual’ de especialistas (STEEN; MANN, 2004). Em todos os casos, o sucesso do seqüenciamento de novo criticamente depende da qualidade dos dados adquiridos, tanto em termos de acurácia e resolução, quanto em relação à riqueza de informação (i.e., íons de fragmentos) contida em um espectro MS/MS (STEEN; MANN, 2004). O seqüenciamento de peptídeos por MS/MS torna-se um problema de mais simples solução quando a interpretação de dados é convertida a uma tarefa de busca por emparelhamento em banco de dados. Isso se deve ao fato de que apenas uma fração infinitesimal das seqüências peptídicas possíveis ocorre na natureza. Ademais, ainda que um espectro de fragmentação possua informações insuficientes para que a partir dele seja determinada a seqüência de aminoácidos completa, pode haver informações que permitam seu emparelhamento com uma molécula em um banco de dados (STEEN; MANN, 2004). Outra limitação dessa abordagem em relação ao seqüenciamento de novo reside no fato de que a primeira é passível de ser realizada principalmente para identificar peptídeos oriundos de organismos que tiveram seu genoma seqüenciado, de modo que todos os peptídeos possíveis sejam conhecidos. Em menor grau, também são acessíveis os proteomas de organismos já submetidos a estudos transcriptômicos, bem como os proteomas de organismos cujos genes possuam grande similaridade aos de organismos com informações genéticas disponíveis (STEEN; MANN, 2004). A interpretação de espectros MS/MS consiste principalmente em assinalar diferenças de massa entre íons de fragmentos abundantes resultantes clivagens ao longo da cadeia peptídica (PAPAYANNOPOULOS, 1995).

## 2.9 BIOSSURFACTANTES

Além das bacteriocinas os bacilos também podem produzir surfactantes, melhor denominados como biossurfactantes, por terem origem microbiana. São caracterizados por serem moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial de um líquido, a tensão interfacial entre dois líquidos ou aquela entre um líquido e um sólido. Os surfactantes são compostos orgânicos que contêm caracteristicamente dois grupos hidrofóbicos (caudas) e grupos hidrofílicos (cabeças). Assim, uma molécula de surfactante contém tanto um componente insolúvel em água (e o componente solúvel em óleo) e um componente solúvel em água. Biossurfatantes englobam as propriedades de diminuir a tensão superficial, promovendo a estabilização de emulsões e a formação de espuma e são geralmente não-tóxicos e biodegradáveis (BANAT et al., 2000; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Interesse em surfactantes microbianos tem sido progressivamente crescente nos últimos anos devido à sua diversidade, baixa toxicidade, natureza ecológica e biodegradabilidade, biocompatibilidade, digestibilidade, possibilidade de produção em larga escala, seletividade e desempenho em circunstâncias extremas (como em altos valores de temperatura, pH e salinidade) (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

Moléculas biossurfactantes possuem um potencial para ser usada em diversos setores da indústria, como a de cosméticos, produtos farmacêuticos, agentes humectantes, conservantes de alimentos e de detergentes (MELO; AZEVEDO, 2008; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). No entanto, atualmente, a produção de biosurfactantes é muito cara devido ao uso de meios de cultura sintéticos. Portanto, uma maior ênfase está sendo dada sobre a utilização de diversos substratos agroindustriais, que constituem matérias-primas de valor econômico bastante baixo e facilmente disponíveis em grandes quantidades, incluindo óleos vegetais e resíduos agroindustriais, como leite, melão, soja, gordura animal e amido. Estes resíduos podem ser utilizados como substratos para a produção em grande escala de biosurfactantes com tecnologia de ponta (ILORI et al., 2005; MELO; AZEVEDO, 2008; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; WINTERBURN; MARTIN, 2012).

Os biossurfactantes de origem microbiana têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, sendo considerados com características superiores aos sintéticos na indústria petroleira e de óleos (ROCHA et al., 1992; MULLIGAN, 2005). (ILORI et al., 2005; MULLIGAN, 2005). Entretanto, até o momento, apenas alguns biossurfactantes estão sendo utilizados comercialmente, mas ainda incapazes de competir

economicamente no mercado com os sintetizados quimicamente, devido aos altos custos de produção. Neste contexto, os biossurfactantes ainda representam um desafio em relação ao conhecimento de novas espécies potencialmente produtoras, métodos de análise, extração, purificação e otimização da produção. Progressos nestas áreas podem aumentar a competitividade econômica destas biomoléculas (ROCHA et al., 1992; MULLIGAN, 2005).

Muitas pesquisas têm sido realizadas no intuito de determinar como os micro-organismos interagem com compostos orgânicos hidrofóbicos. Os biossurfactantes têm sido freqüentemente citados como um mecanismo pelo qual os micro-organismos aumentam seu acesso a substratos pouco solúveis sendo transportadas, tanto passivamente como ativamente, o composto apolar para o interior da célula (VAN HAMME et al., 2006). Assim, a produção de biossurfactantes constitui um mecanismo comum pelo qual os micro-organismos lidam com os desafios relacionados às interfaces (VAN HAMME et al., 2006).

A propriedade conferida a todo surfactante é a sua habilidade em reduzir a tensão superficial em um meio líquido. Por exemplo, a água destilada apresenta uma tensão superficial de  $73 \text{ mN m}^{-1}$ . Nos últimos anos, biomoléculas de origem microbiana capazes de reduzir este valor para valores tão baixos como  $30 \text{ mN m}^{-1}$  têm sido descritas (WILLUMSEN; KARLSON, 1997; MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005).

Várias espécies de micro-organismos são conhecidas por produzirem diversos tipos de biossurfactantes, alguns disponíveis comercialmente como a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, o emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 e um ramonolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (BODOUR; MAIER, 2002).

### **2.9.1 Biossurfactantes e bioemulsificantes**

Os biossurfactantes apresentam aplicações no controle microbiano por possuírem propriedades antifúngica, antibacteriana, antimicoplasma e atividade antiviral. Também tem sido utilizado para a transfecção de genes, como ligantes para as imunoglobulinas de ligação, como adjuvantes para antígenos, como inibidores de coágulo de fibrina e como ativadores de lise do coágulo de fibrina. Ademais, podem ser utilizadas no controle de biofilmes em diversos tipos de materiais, incluindo cateteres, superfícies e outros materiais médicos inseridos por apresentarem propriedades antiadesivas (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Eles também podem ser usados em imunoterapia pulmonar e incorporados em preparações probióticas para combater as infecções do trato urogenital (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Os biosurfactantes podem ser divididos em duas categorias em função da massa molecular. Os surfactantes de baixa massa molecular apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial, quando presentes em meio aquoso e são chamados de biosurfactantes, lipopeptídios e glicolipídios. Já os de alta massa molecular são denominados bioemulsificantes (agentes de superfície ativa de alto peso molecular) (RON; ROSENBERG, 2001; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Os biosurfactantes são divididos ainda em seis classes: ácidos graxos hidroxilados e reticulados (ácidos micólicos), glicolipídios, lipopolissacarídeos, lipoproteínas/lipopeptídeos, fosfolipídios e própria superfície da célula completa (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

Uma emulsão é uma mistura estável de dois líquidos, constituindo-se em uma dispersão coloidal de gotículas de um líquido em outro. Os bioemulsificantes, considerados uma subclasse dos surfactantes, estabilizam dispersões de um líquido em outro, como por exemplo, as emulsões de óleo em água (RON; ROSENBERG, 2001). Normalmente, uma mistura de óleo em água forma fases separadas, entretanto se a mistura é agitada vigorosamente, o óleo vai se dispersar na fase aquosa. Se a agitação cessar, as fases se separam rapidamente. Quando se adiciona um bioemulsificante, é obtida uma mistura estável ou uma emulsão. Para a formação de gotas de óleo na água é preciso que o emulsificante seja solúvel em água e a porção hidrofóbica do bioemulsificante será adsorvida na fase oleosa dispersa e a porção hidrofóbica ficará na interfase. A estabilidade da emulsão é garantida pela formação de filmes na superfície das gotículas de óleo na fase aquosa, que tende a se manter por longos períodos, refletindo a efetividade do bioemulsificante. Logo, ocorrerá a formação de uma gota de óleo carregada na superfície e provocará a repulsão das gotículas carregadas semelhantemente, o que evita a coalescência e confere a estabilidade da emulsão. As emulsões representam uma grande área interfacial e se formam à medida que a tensão é reduzida, e a estabilidade dependerá da natureza do emulsificante e das condições do meio (MAIER, 2003).

Os biosurfactantes e bioemulsificantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento em diferentes fontes de carbono desde substâncias hidrofílicas como a glicose até substratos hidrofóbicos como hidrocarbonetos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005). O principal papel fisiológico dos biosurfactantes é o fato de permitirem que micro-organismos cresçam em substratos imiscíveis em água, pela redução da tensão superficial, tornando-os mais disponíveis para a captação e metabolismo (MELO; AZEVEDO, 2008).

Alguns autores relatam a redução da tensão superficial do meio na fase exponencial de crescimento (WILLUMSEN; KARLSON, 1997) e muitos outros apresentam apenas na fase estacionária, sendo considerado por muitos autores como metabólitos secundários (PRUTHI; CAMEOTRA, 2003; TAHZIBI et al., 2004). Os bioemulsificantes são geralmente produzidos quando as culturas atingem a fase estacionária de crescimento. Em vários casos foi demonstrado que a produção de emulsificantes é induzida por sinais moleculares envolvendo *quorum-sensing*. Esta característica regulatória parece ser geral e provavelmente se aplica à produção de emulsificantes ou compostos tensoativos de alta e baixamassa molecular (RON; ROSEMBERG, 2001).

### **2.9.2 Biossíntese e produção de biosurfactantes**

A síntese dos lipopeptídeos microbianos envolve a atividade das enzimas peptídeos sintetases não-ribossomais (NRPSs), de estrutura modular formada por múltiplos domínios catalíticos. Há três domínios em NRPSs cada uma como uma função diferente que inclui adenilação (domínio A), condensação (domínio C) e tioesterase (TE) (MITCHELL, et al., 2012).

Variações em determinados aminoácidos e ácidos graxos durante a biossíntese podem propiciar uma vasta gama de biomoléculas diferentes. Estas moléculas podem apresentar diferenças na composição de aminoácidos e na estrutura, podendo ser lineares (DESJARDINE et al., 2007) ou cíclicos (SCHNEIDER et al. 2009) e também na composição e tamanho da cadeia de ácidos graxos (DESJARDINE et al., 2007; SCHNEIDER et al. 2009).

O entendimento da estrutura e dos mecanismos de regulação para a excreção de biosurfactantes constituem dos pontos chave para o desenvolvimento de métodos mais baratos para a produção em escala industrial, com capacidade de competir comercialmente com os surfactantes sintéticos (SULLIVAN, 1998). As informações sobre síntese, regulação e genética da produção de biosurfactantes são ainda restritas e, em alguns casos, até mesmo incompletas (RON; ROSEMBERG, 2001).

Os métodos mais usados para aumentar a produção metabólica consistem de seleção de estirpes, mutagênese, manipulação de fatores ambientais e nutricionais e manipulação genética (IQBAL et al., 1995). A maioria dos biosurfactantes é de alta massa molecular, normalmente produzida sob condições altamente aeróbias e sendo predominantemente lipídeos e sua biossíntese se promove em baixos níveis de nitrogênio (KOSARIC, 1992).

Ainda, alguns dos surfactantes produzidos por micro-organismos são constitutivos, mas outros requerem a presença de substratos específicos, como os alcanos, para induzirem a síntese. Entretanto, vários autores constataram a produção de biossurfactantes em meios de cultura contendo outras fontes de carbono, que não hidrocarbonetos (ZHANG; MILLER, 1992). Em certos casos, a síntese dos biossurfactantes é reprimida catabolicamente por glicose ou outros metabólitos primários (REDDY et al., 1983).

O tipo, propriedades e quantidade do biossurfactante são influenciados pela natureza do substrato carbonado, a concentração de N, P, Mg, Fe e Mn no meio e as condições de cultura, tais como pH, temperatura, agitação e taxa de diluição em culturas contínuas (COOPER 1986; GUERRA-SANTOS et al., 1984).

Além dos substratos, a relação carbono-fosfato (GUERRA-SANTOS et al., 1984) e a adição de alguns antibióticos, como penicilina e clorafenicol (SYLDATK et al., 1985) também podem aumentar a síntese, bem como cátions multivalentes, embora outros autores relatem o aumento da produção pela adição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) que tem a capacidade de complexar tais cátions (REIS et al., 2004).

A partir da seleção de micro-organismos produtores de surfactantes e do estudo das condições necessárias para sua produção, pode-se aplicar o melhoramento genético para otimizar o potencial para a produção de biossurfactantes, ou as suas propriedades. Como exemplo, a modificação por engenharia genética da enzima surfactina sintetase, de *B. subtilis*, resultou na obtenção de um biossurfactante com atividade antimicrobiana aumentada (SYMMANK et al., 2002). Assim, o futuro das aplicações destas moléculas será determinado pelo custo dos processos de produção e isolamento, pois é necessário que sejam economicamente viáveis, como já afirmado anteriormente (MELO; AZEVEDO, 2008).

### **2.9.3 Classificação dos biossurfactantes e bioemulsificantes**

Os biossurfactantes e bioemulsificantes são considerados uma classe de surfactantes naturais, sendo que os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do grupo polar, enquanto que os biossurfactantes são diferenciados pela natureza química da biomolécula e pela espécie microbiana produtora. Deste modo, os surfactantes microbianos são moléculas complexas com uma grande diversidade de estruturas químicas. Embora a produção de biossurfactantes ocorra entre os diferentes grupos microbianos, muitas vezes o tipo de biossurfactante produzido é específico do gênero e, às vezes, da espécie (MAIER, 2002).

Os principais biossurfactantes, como mencionado anteriormente incluem glicolipídeos, os lipopeptídeos e lipoproteínas, os fosfolipídeos e ácidos graxos, os polímeros e os biossurfactantes particulados (MELO; AZEVEDO, 2008).

O gênero *Bacillus* se destaca pela produção de lipopeptídeos e a espécie *B. subtilis*, tem uma média de 4-5% do seu genoma relacionado à síntese de antibióticos, possuindo assim potencial para produzir mais de duas dúzias de compostos antimicrobianos estruturalmente diversos, incluindo os lipopeptídeos cíclicos (LPs) das famílias surfactina, iturina e fengicina (ou plipastatina) (STEIN, 2005).

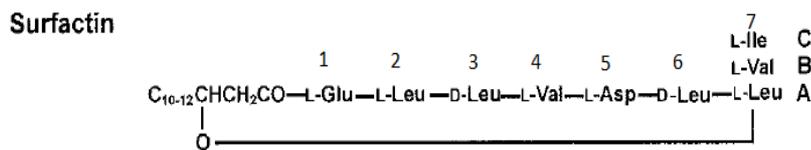
## 2.9.4 Lipopeptídeos

Lipopeptídeos são moléculas de baixa massa molecular formados por peptídeos cíclicos ou lineares e curtos ligados a um anel com cauda lipídica ou a outra molécula lipofílica (ARNUSCH et al., 2012). Recentemente diversos lipopeptídeos foram caracterizados mostrando atividades surfactantes, antimicrobianas e citotóxicas (MANDAL; BARBOSA; FRANCO, 2013). As propriedades dessas substâncias permitem aplicações nas mais diversas áreas incluindo a indústria farmacêutica (como antibióticos convencionais); a indústria cosmética e dermatológica (produtos com propriedades surfactantes, emulsificantes e anti-rugas); na indústria de alimentos (emulsificantes) e na área ambiental e médica (MANDAL; BARBOSA; FRANCO, 2013).

O primeiro lipopeptídeo descoberto foi a polimixina A isolada em 1949 de uma bactéria do solo denominada *Bacillus polymyxa*, mas a biossíntese desta molécula têm sido encontrada em diversos outros gêneros bacterianos incluindo *Actinoplanus*, *Brevibacillus*, *Lyngbya*, *Streptomyces*, *Tolypothrix*, especialmente *Pseudomonas* e *Streptomyces*, bem como em algumas espécies de fungos, como *Aspergillus nidulans* (MANDAL; BARBOSA; FRANCO et al. 2013, (RAAIJMAKERS et al., 2010). Posteriormente, outros lipopeptídeos sintetizados por *Bacillus* spp. foram descritos como as surfactinas, iturinas e fengicinas (MANDAL; BARBOSA; FRANCO et al. 2013). Todas estas fontes naturais de lipopeptídeos possibilitam que haja uma enorme diversidade de estruturas que refletem em diversos modos de ação (TALLY et al., 1999)

### 2.9.4.1 Surfactina

Surfactina (srf) foi isolada pela primeira vez pelos pesquisadores Arima, Kakinuma e Tamura,(1968) e a sua estrutura foi confirmada por Kakinuma et al. (1969) como um lipopeptídeo cíclico em que um ácido graxo  $\beta$ -hidroxilado está ligado a uma sequência de sete amino ácidos por um grupo amida e uma ligação lactona. A massa molecular de 1050 Da foi determinada por Arima;Kakinuma; Tamura, (1968). A figura 2 apresenta a estrutura primária das surfactinas.



**Figura 2.** Estruturas primárias das surfactinas (srf) A, B e C. A srf contém um ácido graxo  $\beta$ -hidroxilado ligado covalentemente por uma ligação amida ao um heptapeptídeo e por uma lactona. O heptapeptídeo é composto por resíduos dos aminoácidos na sequência indicada: ácido glutâmico (Glu), leucina (Leu), leucina (Leu), valina (Val) e ácido aspártico (Asp); o resíduo na posição 7 é variável, sendo Leu, Val ou isoleucina (Ile) para srf A, srf B e srf C, respectivamente. Fonte VATER et al., 2002.

A surfactina pode ser constituída de uma mistura de isoformas, cuja diferenciação ocorre devido a substituição nos resíduos de aminoácido na cadeia peptídica ou pelo comprimento e ramificação do ácido graxo (KOWALL et al., 1998). A classificação em srf A, srf B ou srf C é feita de acordo com o resíduo de aminoácido presente na posição 7 (Leu, Val ou Ile). O ácido graxo varia de 12 a 16 unidades de carbono (KAKINUMA et al.,1969; KOWALL et al., 1998; VATER et al., 2002).

Surfactina ou variantes estreitamente relacionadas como lichenisina foram isolados a partir de *B. subtilis* (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968), *B. coagulans* (HUSZCZA; BURCZYK, 2006), *B. pumilus* e *B. licheniformis* (PEYPOUX, 1999), *B. amyloliquefacines* (CALDEIRA et al., 2011) e *B. mojavensis* (BACON et al., 2012).

A surfactina é uma dos mais poderosos biossurfactantes conhecidos e exibe atividade de superfície elevada (COOPER et al., 1981), capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN m<sup>-1</sup> (ARIMA et al., 1968), além de apresentar menores valores de concentração micelar crítica (CMC) quando comparada a outros biossurfactantes e alguns surfactantes sintéticos (COOPER et al., 1981, KIM et al., 1997). Possuem ainda diversas funções biológicas incluindo atividade antibacteriana e antifúngica (VATER, 1986), atividade hemolítica (BERNHEIMER; AVIGAD, 1970), atividade antiviral (VOLLENBROICH et al., 1997 b), atividade antitumoral (KAMEDA et al, 1974), antimicoplasma (MADAN et al.,

2001), inibidora da formação de coágulos de fibrina (KIKUCHI; HASUMI,2002), e propriedades ionóforas e sequestrantes (THIMON et al., 1993). Pode ser usada também como veículo para administração de drogas via pulmonar (HUSSAIN et al.; 2004). Há estudos relatando a inibição de micro-organismos como *Enterococcus faecalis* ATCC 2912, *Lactococcus garviae* KCCM 40698, *Streptococcus parauberis* DSM 6631, *Flexibacter tractuosus* ATCC23168, *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (KIM et al., 2009) e *Listeria monocytogenes* 99/287RB6 (SABATÉ; AUDISIO, 2013). Essas funções caracterizam a surfactina como molécula biologicamente ativa.

Com relação às aplicações na agricultura, a surfactina sozinha não inibe o crescimento de agentes fitopatogênicos mas acredita-se que aumenta significativamente a atividade antifúngica da iturina A, através de uma relação sinérgica (MAGET-DANA et al., 1992; COUTTE et al., 2010), provavelmente devido à atividade citolítica da surfactina, ligada à sua potente propriedade surfactante, que enfraquece a membrana celular e facilita o ataque da iturina A (MAGET-DANA et al., 1992). Embora a surfactina tenha sido descoberta há aproximadamente 35 anos atrás, houve um aumento no interesse por este composto na década passada, provocada pela demanda crescente por biosurfactantes eficazes, antimicrobianos, anti-virais, anti-tumorais e agentes hemolíticos (COOPER et al., 1981; HSIEH et al., 2004; ONGENA et al., 2007; KIM et al., 2009). Até agora, apesar das muitas vantagens da surfactina sobre os agentes químicos sintéticos, este lipopeptídeo tem tido poucas aplicações, principalmente devido a baixa produção da linhagem e da necessidade de substratos caros para a produção (DESAI; BANAT, 1997; PEYPOUX et al., 1999; KIM et al., 2010). Entretanto, diversos grupos tem sugerido o uso de substratos alternativos como a manipueira para a diminuir o custo de produção da surfactina (COOPER et al., 1981; PEYPOUX; BONMARTIN; WALLACH, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2006).

As propriedades da surfactina constituem base para a explicação de sua ação anticarcinogênica, tendo sido proposto que a surfactina tem a capacidade de, ao atingir o interior da célula, promover ruptura da membrana plasmática (HAFENBURG et al., 1986). Esta substância mostrou também atividade antitumoral contra células com carcinoma de Ehrlich (NITSCHKE et al., 2004), atividade antiproliferativa em experimentos com células dos cânceres de ovário, renal, de próstata, de cólon, de pulmão, de mama e melanoma bem como atividade citostática e citotóxica a todos os carcinomas investigados (COSTA, 2005).

Estudos genéticos visando a identificação dos genes envolvidos na produção da surfactina mostraram o envolvimento do operon *srfA* de 25 kb, igualmente responsável pela

esporulação e fenótipo de competência (NAKANO et al., 1991) e do gene *sfp* (NAKANO et al., 1992). Este gene está mapeado a 4 kb *downstream* do operon *srfA* sua sequência de nucleotídeos foi estabelecida por Nakano et al. (1988).

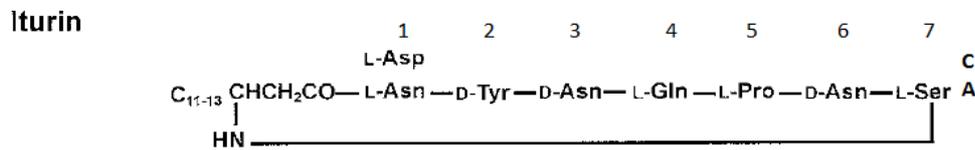
A biossíntese da surfactina é catalisada não ribossomalmente pela ação de um grande complexo multienzimático constituído de quatro blocos modulares, chamados de surfactina sintetase. As surfactinas sintetases, SrfAA, SrfA-B e SrfA-C, são codificadas pelos primeiros três genes do operon *srfA* (SCHNEIDER et al., 1998). Tem sido sugerido que o gene *sfp* tenha um papel regulador assim como um papel mais direto na síntese da surfactina (NAKANO et al., 1992; TSUGE et al., 1999). A síntese da surfactina é dependente da fase de crescimento, e é induzida durante a transição para a fase estacionária. A transcrição do operon *srf* é conduzida por um promotor sigma A-dependente e regulado por uma complexa rede, incluindo o sistema de dois componentes, ComAP (NAKANO et al., 1991; ROGGIANI; DUBNAU, 1993; STEIN, 2005; CHEN et al., 2009). ComA fosforilada liga-se a montante do operon de surfactina e induz sua expressão. PerR, um repressor geral da regulação de estresse por peróxido mostrou regular o operon *srf* de forma positiva e independente de ComA (HAYASHI et al., 2005). Em contraste, CodY, um regulador global GTP ativado, atua como um repressor direto em condições de abundância (STEIN, 2005; CHEN et al., 2009).

#### 2.9.4.2 Iturinas

O grupo das iturinas compreende lipopeptídeos cíclicos constituído por um peptídeo contendo sete resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos formando um anel cíclico por meio da reação entre o grupo amino do ácido graxo com o grupo carboxila da porção C-terminal do aminoácido por uma porção de ácido graxo  $\beta$ -amino ligados por ligações de amida aos resíduos de aminoácidos constituintes. O grupo é constituído pelos lipopeptídeos iturina A, C, D e E (BESSON; MICHEL, 1987), bacilomicina D (PEYPOUX et al. 1984), F (MHAMMEDI et al. 1982) e L (PEYPOUX et al. 1984), bacilopeptina (KAJIMURA et al. 1995) e micosubtilina (PEYPOUX et al. 1986), os quais compartilham em comum uma sequência (D-Tyr e D-Asn nas posição 2 e 3, respectivamente) e mostram variações para as outras quatro posições (MAGET-DANA; PEYPOUX, 1994). A estrutura primária das iturinas é mostrada na figura 2.

Iturina A é um lipopeptídeo cíclico contendo sete resíduos de  $\alpha$ -aminoácidos e um resíduo de um  $\beta$ -aminoácido com cadeia lateral sintetizado não ribossomalmente, com massa

molecular de 1042 Da, aproximadamente (MAGET-DANA; PEYPOUX, 1994; GRAU et al., 2000). A itu A difere da itu C pelo resíduo de aminoácido na posição 1: asparagina (Asn) e ácido aspártico (Asp), respectivamente. A figura 3 mostra a estrutura primária das itu A e itu C.



**Figura 3.** Estruturas primárias das iturinas (itu) A e C. As itu contêm um ácido graxo b-amino ligado covalentemente por uma ligação amida ao heptapeptídeo e por uma ligação lactama. O heptapeptídeo é composto por resíduos dos aminoácidos na sequência e com a mesma quiralidade indicada: posição 1 é variável, podendo conter asparagina (Asn) ou ácido aspártico (Asp), para itu A e itu C, respectivamente, tirosina (Tyr), glutamina (Gln), prolina (Pro) e serina (Ser). Fonte VATER et al., 2002, modificado.

O operon deste peptídeo compreende uma região de aproximadamente 38 kb e é composta de quatro fases aberta de leitura: *ituD*, *ituA*, *ituB*, e *ituC*. O gene *ituD* codifica uma malonil CoA transacilase, cujo rompimento do gene conduz à deficiência específica na produção da iturina A. Os genes *ituB* e *ituC*, codificam peptídeos sintetases que sintetizam cadeias peptídicas precursoras para a formação da ItuA (YAO et al., 2003). Evidências demonstram que a expressão desta bacteriocina é induzida durante a fase estacionária (DUITMAN et al., 1999). Três reguladores globais, DegU, DegQ, ComA e os fatores sigma B ( $\sigma$ B) e H ( $\sigma$ H) foram identificados por atuarem de forma positiva na ativação transcricional do promotor itu (Pitu). O controle direto sobre Pitu é exercida por DegU, que ocupa dois locais distintos no promotor (KOUMOUTSI et al., 2007; CHEN et al., 2009). Em contraste, ComA controla a expressão indireta do operon através de DegQ, que serve como um fator auxiliar para DegU. ComA é um regulador de genes de competência tardia (GUILLEN et al., 1989) e da produção de surfactina (SHIMANE; OGURA, 2004). DegU é um regulador de resposta de um sistema que controla muitos processos celulares, incluindo desenvolvimento de competências, capacidade de resposta osmótica, e desencadeamento de reações pós-fase de crescimento exponencial em condições limitantes (STEIL et al., 2003; KOUMOUTSI et al., 2007).

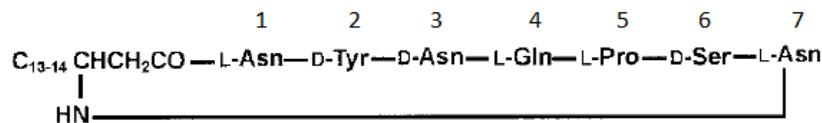
Este lipopeptídeo demonstra uma atividade antifúngica com um espectro amplo de ação, o que a torna um agente de controle biológico potencialmente ideal com o objetivo de reduzir o uso de antifúngicos químicos na agricultura (SANDRIN et al., 1990; MAGET-DANA; PEYPOUX, 1994; YU et al., 2002; STEIN, 2005; ARREBOLA et al., 2010). De fato, a atividade antifúngica de *B. subtilis* pode ser atribuída, em grande parte, a produção de

iturina A (ARREBOLA et al., 2010). Além disso, triagens clínicas em seres humanos e animais igualmente mostraram iturina A sendo uma droga valiosa devida seu amplo espectro antifúngico, baixa toxicidade, e baixo efeito alérgico (DE LUCCA; WALSH, 1999; MAGET-DANA; PEYPOUX, 1994; YAO et al., 2003; KIM et al., 2010). Estudos sobre seu mecanismo de ação mostram que a mesma se comporta como uma molécula anfifílica não-iônica que tem como sítio alvo estruturas fosfolipídicas e esteróis. Desta forma, induz a abertura de canais iônicos nas membranas de células de fungos e leveduras, aumentando a permeabilidade e condutância a íons, principalmente  $K^+$ , o que causa um desequilíbrio eletroquímico entre os meios intra e extracelular (MAGET-DANA; PEYPOUX, 1994; GRAU et al., 2000; SINGH; CAMEOTRA, 2004). Apesar de muitas vantagens destelipopeptídeo sobre agentes químicos, iturina A tem tido poucas aplicações até o presente momento, principalmente por causa da baixa produtividade e dos custos de produção relativamente elevados (SZCZECH; SHODA, 2006; YU et al., 2002).

A produção de iturina parece ser restrita a *B. subtilis* (BONMATIN et al., 2003) e *B. amyloliquefaciens* (KOUMOUTSI et al., 2004) e há relatos de atividade inibitória de crescimento contra diversas espécies de fungos incluindo *Fusarium oxysporum* (YUAN et al., 2012).

#### 2.9.4.2.1 Micosubtilina

Micosubtilina é um potente lipopeptídeo antifúngico da família da iturina sintetizado por um número limitado de *Bacillus subtilis* (BESSON et al., 1978) e *Bacillus* spp. Micosubtilina é composta de um péptido cíclico de sete aminoácidos ligados por um anel lactama de um ácido graxo  $\beta$ -amino de cadeia de comprimento variável (isto é, C15 a C17) e isoformas (N-, iso-e anteiso-). A estrutura primária da micosubtilina é mostrada na figura 3. A atividade antifúngica de micosubtilina foi demonstrada estar relacionada com o comprimento do componente de ácido graxo e com a sua isomeria. A biossíntese deste composto é mediada por um complexo modular multienzimático e as sintetases de peptídeos chamado “mecanismos não ribossomais” (PNR) (BÉCHET et al., 2013). *Bacillus* produtores de multi-lipopeptídeos foram descritos especialmente para *B. amyloliquefaciens* (KOUMOUTSI et al., 2004) e a ocorrência de linhagens que produzem naturalmente apenas micosubtilina não foi relatada até agora. Notavelmente, esta substância já foi relatada com atividade antibacteriana também contra a bactéria *Micrococcus luteus* (PEYPOUX et al., 1979).

**Mycosubtilin**

**Figura 4.** Estrutura primária da micosubtilina (mic) o heptapeptídeo composto por asparagina (Asn), tirosina (Tyr), glutamina (Gln), prolina (Pro) e serina (Ser). Fonte VATER et al., 2002.

#### 2.9.4.2 Bacilomicina

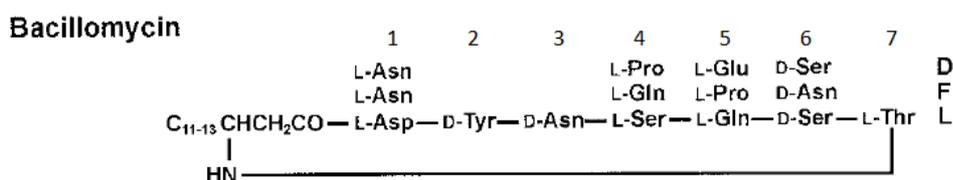
Bacilomicina D e bacilomicina L são lipopeptídeos antibióticos isolados a partir de linhagens de *Bacillus subtilis* (LANDY et al., 1948). Sua determinação estrutural por métodos químicos indicaram que consistem de um heptapeptídeo ligado a uma cadeia do 3-aminoácido lipossolúvel (PEYPOUX et al., 1981). Entre os aminoácidos das porções peptídicas resíduos de aspartato, aspartila, glutamato, asparagina e glutarninila foram encontrados (PEYPOUX, et al., 1984).

De acordo com a sua composição de aminoácidos, podem ser divididos em dois grupos. Bacilomicina D e bacilomicina L são caracterizadas pela presença de resíduos L-Glu na posição 5, mas diferem pelo seu aminoácido na posição 4, que é L-Pro em bacilomicina D e L-Ser em bacilomicina L (NASIR; BESSON, 2012).

A Bacilomicina D foi descoberta em 1950 por Raubitschek e Dostrovsky, por conta de suas fortes atividades contra dermatófitos (RAUBITSCHEK; DOSTROVSKY, 1950) e também tem considerável atividade contra *Aspergillus flavus* indicando que a bacilomicina D pode ser um conservante potencial para a alimentação/ração armazenadas (ZHANG, 2008). Também se demonstrou atividade, devida à esta substância, na inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* (KUMAR et al., 2012). Alguns anos mais tarde, este composto anti-fúngico, produzido por *Bacillus subtilis*, foi mostrado como pertencente aos lipopeptídeos da família iturina (PEYPOUX et al., 1980) e sua sequência de aminoácidos foi determinada (KUMAR et al., 2012). Estes lipopéptidos são caracterizados por um heptapeptídeo, com a configuração-aminoácido LDDLLDL, ciclizados num anel com um ácido graxo b-amino (BAA) (HOURDOU et al., 1989). Todos contêm a sequência de aminoácidos BAA-L-Asn-D-Tir-D-Asn. Apesar de muitos trabalhos realizados no entendimento dos mecanismos moleculares da atividade biológica de outros lipopéptidos da família da iturina (MAGET-DANA, PEYPOUX, 1994), há limitados estudos sobre a interação da bacilomicina D com a membrana plasmática das células (TABBENE et al., 2011) e a comparação de sua atividade hemolítica com os de

outros lipopeptídeos da família das iturinas não nos permitem determinar uma regra baseada na composição dos lipopeptídeos diferentes.

A Bacilomycina L, um lipopeptídeo iturinico natural produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, é caracterizado por uma forte atividade antifúngica contra uma variedade de fungos filamentosos agronomicamente importantes, incluindo *Rhizoctonia solani* Kühn. Estudos recentes sobre a função da permeabilização da membrana na atividade antimicrobiana de bacilomicina L contra fungos patogênicos demonstraram que a atividade antifúngica de bacilomicina L pode não ser apenas uma consequência da permeabilização da membrana fúngica, mas relacionada com a interação dela com alvos intracelulares (ZHANG, et al., 2013).



**Figura 5.** Estrutura primária das bacilomicinas D, F e L mostra as variações dos resíduos de aminoácidos do heptapeptídeo nas posições 1, 4, 5 e 6. Os resíduos nas posições 2, 3 e 7 são comuns: tirosina (Tyr), asparagina (Asn) e treonina (Thr), respectivamente. Fonte VATER et al., 2002.

#### 2.9.4.3 Fengicina

A terceira família de LPs compreende as fengicinas A e B, que também são chamados de plipastatinas. Estas moléculas são lipodecapeptídeos com um anel de lactona interna na fração peptídica e com um ácido graxo de cadeia  $\beta$ -hidroxi (C14 a C18) que pode ser saturado ou insaturado (MUKHERJEE; DAS, 2005). Esta classe de lipopeptídeos é composta de variantes estreitamente relacionadas, que diferem tanto no comprimento da cadeia do ácido graxo (de 13 a 17 átomos de carbono) quanto na natureza do aminoácido na posição 6 da porção de peptídeo (D-Ala ou D-Val por fengicina A e fengicina B, respectivamente). A figura 6 mostra as estruturas primárias das fengicinas. Eles ainda diferem de iturina e de surfactina pela presença de aminoácidos incomuns, tais como ornitina e alo-treonina. Fengicina inclui três resíduos de aminoácidos que podem ser protonados ou desprotonado de acordo com o pH. Em pH neutro, ela exibe duas cargas negativas (resíduos de ácido glutâmico) e uma positiva carga (resíduo ornitina), que deverão afetar sua conformação e

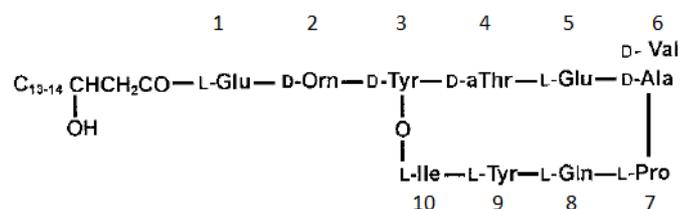
desempenhar um papel importante nas suas interações intermoleculares (EEMAN, et al. 2009).

As fengicinas são menos hemolíticas que iturinas e surfactinas, mas mantêm uma forte atividade antifúngica, especificamente contra fungos filamentosos (KOUMOUTSI et al., 2004; HOFEMEISTER, 2004). O mecanismo de ação da fengicina é menos conhecido em comparação com outros LPs, mas eles também interagem facilmente com as camadas de lípidos e, em certa medida, retêm o potencial para alterar a estrutura da membrana celular e da permeabilidade de uma maneira dose-dependente (DELEU, et al., 2005). Lipopeptídeos são conhecidos por atuar de forma sinérgica como sugerido por diversos estudos de surfactina e iturina e (MAGET-DANA et al, 1992) surfactina e fengicina (ONGENA, et al., 2007) e iturina e fengicina (KOUMOUTSI et al., 2004).

Assim, a fengicina é considerada um lipopeptídeo fungicida de permeabilização de membranas bacterianas e têm sido usada como "pesticida verde" na proteção das culturas por muitos anos, e uma melhor compreensão do seu modo de ação pode ser valioso para o desenvolvimento de antibióticos peptídicos (ONGENA; JACQUES, 2008). Vanittanakom et al. (1986) estudaram a atividade antimicrobiana de fengicinas de *B. subtilis* F-29-3, encontrando atividade contra uma variedade de fungos ainda não detectando atividade contra bactérias. Sabe-se até o momento presente que a permeabilização da membrana induzida por fengicina é considerado o mecanismo responsável pela atividade antifúngica. Até agora, fengicina não tem sido extensivamente estudada, principalmente por causa da dificuldade de produzir e purificar esta molécula em quantidades adequadas. Os poucos estudos têm demonstrado a sua forte atividade de superfície e as suas interessantes propriedades antifúngicas, com uma baixa atividade hemolítica (VANITTANAKOM et al., 1986).

A produção de fengicina foi identificada em *B. cereus* (TSUGE et al., 1999) e em *B. thuringiensis* (KIM et al., 2004) em adição a *B. subtilis* (JACQUES et al., 1999) e *B. amyloliquefaciens* (KOUMOUTSI et al., 2004).

### Fengycin



**Figura 6.** Estruturas primárias das fengicinas A e B. Feg são formadas por um ácido graxo b-hidroxiado covalentemente ligado por uma ligação amida a um decapeptídeo que contém um anel lactona interno entre os resíduos 3 e 10. A posição 6 é variável contendo o resíduo Ala ou Val nas fen A e B, respectivamente. A posição 2 encontra-se um resíduo de ornitina e na posição 4 resíduo modificado de treonina. Fonte: Vater et al., 2002.

### 2.9.5 Métodos de detecção de biossurfactantes

Diversas metodologias de detecção de linhagens produtoras de biossurfactantes tem sido descritas, sendo as mais simples as relacionadas a atividade hemolítica do surfactante; técnica do espalhamento do óleo e técnica de colapso da gota. Youssef et al. (2004) relataram que apenas 13,5% das cepas que apresentaram hemólise reduziram a tensão superficial a valores menores que  $40 \text{ mN m}^{-1}$  e 38,2% das cepas que não provocaram hemólise apresentaram resultados positivos em outras técnicas de detecção. Os resultados se devem ao fato de que estes compostos podem ser fatores de virulência hemolíticos e não biossurfactantes ou ser biossurfactantes com baixa capacidade de difusão o que os incapacitam de lisar as células. Tanto a técnica do espalhamento do óleo como o colapso da gota, podem gerar dados qualitativos ou quantitativos. Plaza et al., (2006) obtiveram bons resultados utilizando a técnica de espalhamento do óleo, considerando o método fácil e rápido, já a técnica de colapso da gota mostrou resultados mais variáveis. No entanto, segundo o autor, estas metodologias não são precisas, havendo grandes variações nos valores de redução da tensão superficial dos isolados que apresentaram resultados positivos, oscilando entre  $35$  e  $67 \text{ mN m}^{-1}$ . Por estas razões, os autores sugerem que estes métodos sejam confirmados utilizando técnicas baseadas em medidas da capacidade de redução da tensão utilizando tensiômetros (MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005). A tensão superficial, pode ser quantificada, através da medida da força exigida para mover um anel de platina (Du Nouy) ou a placa de Wilhelmy (lamínula) que está sobre um líquido através do ar. Este método é amplamente utilizado devido a sua reprodutibilidade (MAIER, 2002; BODOUR; MAIER, 2002; YOUSSEF et al., 2004; CUNHA et al., 2004). No entanto, algumas substâncias do meio de cultura, como a peptona ou solventes como o metanol ou etanol, podem reduzir a tensão superficial na ausência de um surfactante (MILLER; ZHANG, 1997).

Para os biossurfactantes poliméricos, com capacidade de emulsificar o meio a detecção da atividade emulsificante também tem sido utilizada e é especialmente importante para os biossurfactantes que não apresentam capacidade de redução da tensão superficial. São produzidos por várias bactérias, leveduras e fungos filamentosos e, em geral, estes

biossurfactantes não reduzem a tensão superficial do meio significativamente (BODOUR; MAIER, 2002). Um dos biossurfactantes poliméricos melhor caracterizado é o emulsan, produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus* RAG I (VAN DER MEI; COWAN; BUSSCHER, 1991). Este micro-organismo produz uma proteína associada ao polímero que provoca a emulsificação, no entanto a capacidade de redução da tensão superficial é baixa,  $52 \text{ mN m}^{-1}$ , segundo Bodour; Maier, (2002). Todavia alguns autores observaram relação direta entre emulsificação e redução da tensão (CUNHA et al., 2004; MATA-SANDOVAL et al., 1999).

### 2.9.6 Mecanismos de ação dos lipopeptídeos

Os dados disponíveis tem mostrado que ocorre a formação de poros na membrana após a formação de ligações oligaméricas com o lipopeptídeo sendo que algumas podem ser  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de multímeros. Estes poros podem causar influxo de íons transmembrana incluindo  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  causando a destruição da membrana e conseqüente morte celular (SCOTT, et al., 2007). No caso da surfactina, apesar dos mecanismos de ação não estarem plenamente elucidados, presume-se que ocorra uma interação direta da surfactina com a os fosfolipídeos da membrana celular com a conseqüente alteração das propriedades da estabilidade da bicamada lipídica (CARRILLO et al., 2003; HUSSAIN et al., 2004). Estudos sobre os mecanismos moleculares de permeabilização de membrana através da incorporação da surfactina demonstraram haver perda do conteúdo vesicular através da desestabilização lipídica ou formação de poros intra membranais (SHEPPARD et al., 1991). A surfactina forma *clusters* com os fosfolipídeos, estabelecendo domínios de surfactina dentro da bicamada (GRAU et al., 1999). Esta molécula pode ainda formar, nas bicamadas, agregados micelares com organização lamelar ou pequenas vesículas fechadas, que solubilizam a membrana biológica, atuando como um detergente nesta estrutura (GRAU et al., 1999; CARRILLO et al., 2003; HEERKLOTZ et al., 2004).

Em adição, alguns estudos mostram que os lipopeptídeos podem causar inibição na formação da parede celular fúngica (SCHEINER; SAHL, 2010) através inibição específica e não competitiva de determinadas enzimas que são essenciais para a integridade da parede célula como por ex. a enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase (YAO et al., 2012). No entanto, os lipopeptídeos também podem causar apoptose pela ligação da ATPase na membrana

mitocondrial como ocorre quando há altas concentrações de um lipopeptídeo antifúngico produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* (QI et al, 2010).

Estes modos de ação dos lipopeptídeos podem conferir alta atividade contra patógenos resistentes à múltiplos fármacos (MANGONI; SHAI, 2011) e a emergência de resistência contra lipopeptídeos é extremamente rara (SADER, 2011).

## 2.10 APLICAÇÕES DE BACTERIOCINAS E LIPOPTÍDEOS

### 2.10.1 Aplicações em alimentos

Atualmente, conservantes químicos artificiais são empregadas para limitar o número de micro-organismos capazes de crescer em alimentos, mas o aumento de consumidores conscientes sobre os potenciais riscos à saúde associados com algumas destas substâncias levou investigadores a analisar a possibilidade de utilização de bacteriocinas como biopreservantes. Assim, o termo biopreservação foi, e ainda tem sido, cada vez mais difundido, sendo caracterizado por ser uma extensão do tempo de armazenamento e o aumento da segurança de alimentos usando a sua microbiota natural ou controlada e/ou produtos antimicrobianos (STILES, 1996), como ácido lático, bacteriocinas e outros (HUGAS, 1998).

As bacteriocinas podem ser usadas de diversas formas em alimentos, desde o uso de linhagens produtoras diretamente nos mesmos, como biocontroladores ou como culturas “starters” em alimentos fermentados, até o uso de preparações concentradas da bacteriocina como aditivo, no desenvolvimento de embalagens com bacteriocinas imobilizadas ou encapsuladas em nanovesículas fosfolipídicas (SCANNELL et al., 2000; PAPAGIANNI, 2003; TEIXEIRA et al., 2007). Além disso, as bacteriocinas podem ser utilizadas para melhorar atributos sensoriais de certos alimentos (DEEGAN et al., 2006).

Encontra-se um grande número de trabalhos de pesquisa sobre a aplicação das bacteriocinas em bioconservação (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991; MCMULLEN; STILES, 1996; DE MARTINIS; FRANCO, 1998; STILES; HASTINGS, 1991), mas o uso efetivo destes compostos em alimentos ainda é bastante limitado. Uma outra aplicação relaciona-se ao fato de as bacteriocinas poderem ser empregadas tecnologicamente, com certas vantagens, pois atuam em sinergia com tratamentos combinados de preservação de alimentos mais eficientes (BROMBERG et al., 2004). Um exemplo seria a utilização de

nitratos e nitritos em produtos cárneos visam manter a coloração avermelhada e inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*, que pode levar a formação de nitrosaminas, substâncias que são carcinogênicas. Assim as bactérias produtoras de bacteriocinas podem atuar na redução destas substâncias até nitrogênio elementar, o que diminui a formação de nitrosaminas (BALDUINO; OLIVEIRA; HAULY, 1999).

Outra aplicação atualmente importante demanda da necessidade dos consumidores por alimentos minimamente processados ou “alimentos frescos” e sem conservantes químicos, que têm estimulado interesse de pesquisa em recursos naturais, tais como agentes antimicrobianos bacteriocinas. No entanto, a maioria dos estudos relativos a aplicações em alimentos concentraram-se em bacteriocinas produzidas por BAL, principalmente nisina e alguns outros (GÁLVEZ et al., 2008). Embora a nisina seja a única bacteriocina atualmente licenciada como um biopreservativo, suas aplicações são restritas, devido à sua atividade muito baixa em um pH neutro ou alcalino. Portanto, a busca de novas bacteriocinas com melhores propriedades físico-químicas (estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura) e também um amplo espectro antimicrobiano é de grande interesse para a sua aplicação em alimentos. No entanto, apesar do leque diversificado de bacteriocinas produzidas por espécies de *Bacillus* com propriedades tecnológicas atrativas, a importância e o valor industrial das bacteriocinas de *Bacillus* têm sido subestimados, e apenas um pequeno número de aplicações foram relatadas em alimentos. Este fato é potencializado pela falta do status GRAS de algumas espécies de *Bacillus*, exceto para alguns representantes, como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (SHARP et al., 1989). Além disso, algumas espécies são altamente patogênicas, tais como linhagens de *B. anthracis* ou produzem toxinas como *B. cereus* toxigênico, *B. coagulans*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* (GILBERT et al, 1981; KRAMER; GILBERT, 1989; CHANG; CHEN, 2003). Recentemente, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) introduziu o conceito de presunção qualificada de segurança (QPS) para aceitabilidade de bactérias em alimentos se o grupo taxonômico não suscita preocupações de segurança ou, se existiam preocupações de segurança, mas estes poderiam ser definidos e excluídos (EFSA, 2007, 2008).

Linhagens de *Bacillus cereus* já foram aprovadas pela *European Food Safety Authority* (EFSA) para alimentação animal (EFSA, 2004, 2005). A qualificação QPS a respeito de espécies *Bacillus* é modificado para “ausência de toxinas causadoras de intoxicação alimentar”, ausência de atividade surfactante, ausência de atividades enterotóxicas

(EFSA, 2008). No entanto, linhagens produtoras de bacteriocinas ou preparativos contendo bacteriocina poderiam ainda ser utilizados na conservação de alimentos, desde que atendam aos critérios estabelecidos pela AESA.

Bacteriocinas de *Bacillus* têm um potencial para aplicação como conservantes em substratos de diferentes alimentos como em produtos lácteos tais como leite e queijos (SHARMA et al., 2009 a, b). Dois exemplos representativos são bacilocina 490 e cereína 8A. Bacilocina 490 mostrou-se ativa contra *Bacillus* spp. intimamente relacionados ambos sob condições aeróbias e anaeróbias e sua atividade bactericida foi mantida durante o armazenamento a 41 °C, através de uma ampla faixa de pH, a uma alta temperatura e também em substratos de alimentos como o leite (MARTIRANI et al., 2002). Esses recursos podem permitir o uso de bacilocina 490 durante o processamento de alimentos realizado em altas temperaturas e como um agente antimicrobiano para complementar a nisina (que exibe uma atividade muito baixa em um pH neutro ou alcalino) contra alguns *Bacillus* spp. em alimentos não acidificados.

Outra bacteriocina testada em produtos lácteos (leite e queijo minas-frescal) para controlar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* é cereína 8A produzida por *B. cereus* 8A (BIZANI; BRANDELLI, 2002; BIZANI; DOMINGUEZ; BRANDELLI, 2005; BIZANI et al., 2005). A adição de 160 UA/mL<sup>-1</sup> de cereína 8A em leite UHT resultou em uma diminuição de 3 ciclos log de células viáveis dentro de um período de 14 dias a 4 °C (BIZANI et al., 2008). No entanto, amostras de queijo tratadas com cereína mostraram uma redução de 2 ciclos logarítmicos nas contagens de micro-organismos viáveis durante 30 dias a 4 °C, quando cereína 8A foi usado para controle de contaminação de superfície de queijo por *L. monocytogenes*. Em queijo tipo minas-frescal a cereína causou apenas um atraso no início da fase de crescimento exponencial (BIZANI et al., 2008). Curiosamente, a atividade antimicrobiana da cereína 8A contra *Salmonella Enteritidis* foi potencializada pela adição de EDTA e lactato de sódio (LAPPE et al., 2009). Portanto, a potência e o espectro da cereína 8A pode ser melhorada pela combinação com agentes desestabilizadores de membrana.

Outra aplicação relatada foi para a biopreservação de carne de frango usando uma BLIS produzida por *B. amyloliquefaciens* GA1 (HALIMI et al. 2010). Um dos gargalos para a aplicação de bacteriocinas nos alimentos é a sua produção industrial em razoável baixo custo. Cereína 8A pode ser obtida com alto rendimento por cultivo da cepa produtora em caldo infusão de cérebro-coração (BIZANI; BRANDELLI, 2004) e em meio de proteína de soja

permitindo uma produção de baixo custo para possíveis aplicações (DOMINGUEZ et al., 2007).

Muitos outros peptídeos antimicrobianos mostram potenciais aplicações na conservação de alimentos. A maioria deles é estável ao calor e a condições de mudanças de pH que podem ocorrer durante o processamento de alimentos e podem ser degradados por proteases. Muitos deles também mostram amplo espectro de atividades antimicrobiana, inibindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas, e, em alguns casos, até mesmo fungos. Neste ponto, as bacteriocinas de *Bacillus* são superiores às bacteriocinas de BAL. Bons exemplos são os peptídeos antimicrobianos P34 (MOTTA et al., 2008), P45 (SIRTORI et al., 2006), paenibacilina (HE et al., 2007), polixina (produzido por uma cepa de *P. polymyxa* isolada de salsichas fermentadas da Argentina) (PIURI; SANCHEZ-RIVAS; RUZAL, 1998) ou o peptídeo antibacteriano/antifúngico produzido por *B. brevis* isolada de kimchi (HYUNG et al., 2001). Além disso, cepas de *Bacillus* desempenham um papel central na fabricação de alimentos fermentados alcalinos e bebidas (WANG; FUNG, 1996). Aplicação de cepas produtoras de bacteriocinas nestes substratos alimentares pode oferecer novas oportunidades em biopreservação de alimentos.

A nisina é uma bacteriocina atóxica, destruída por enzimas digestivas e não confere sabores ou odores desagradáveis aos alimentos. Foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS) em 1969 com limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/kg de peso corpóreo e pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1988. Diversos países permitem o uso da nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis (DE MARTINIS; FREITAS, 2003). Além disso, a nisina tem sido utilizada por mais de 50 anos, em mais de 48 países, sem o desenvolvimento substancial de resistência (DEEGAN et al., 2006).

No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo, no limite máximo de 12,5 mg/kg e é também permitido o uso em produtos cárneos com aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado com solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico grau alimentício (DE MARTINIS; FREITAS, 2003). Diversas aplicações da nisina têm sido estudadas, devido à suas várias propriedades favoráveis. Além disso, vesículas fosfolipídicas estão sendo consideradas para o encapsulamento e liberação controlada das bacteriocinas em material alimentar, nutracêuticos, cosméticos e produtos farmacêuticos (COLAS et al., 2007).

Quanto aos lipopeptídeos, estes são bem caracterizadas em termos das suas atividades antimicrobianas, antivirais, antitumoral e anti-adesivas que asseguram a sua posição nas indústrias farmacêutica e cosmética. Na indústria alimentar, lipopeptídeos são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias primas. Na indústria de panificação, surfactinas e rhamnolipídeos são utilizados para manter a estabilidade, a textura e o volume e também para ajudar a emulsificação de células adiposas, a fim de controlar a aglomeração de glóbulos de gordura (MANDAL; BARBOSA, FRANCO, 2013). Além disso, as classes de lipopeptídeos do grupo das iturina, da classe das fengicinas e a surfactina são resistentes às proteases, exibindo uma forte inibição do crescimento de uma vasta gama de agentes patogênicos de plantas e fungos como *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* e *Aspergillus flavus*) ou agentes patogênicos de pós-colheita, tais como *Botritis cinerea* e *Penicillium expansum* (TOURE et al., 2004). Lipopeptídeos também podem impedir a ação de agentes de corrosão em superfícies de aço inoxidável, grandemente utilizados na indústria de alimentos. Considerando isso, Dagbert et al. (2006) forneceu evidências de que no aço inoxidável AISI 304 a corrosão é atrasada na presença do biotensioativo produzido por uma estirpe de *Pseudomonas fluorescens*. Assim, lipopeptídeos podem satisfazer várias características de um aditivo sendo benéficos para emulsão, atividades antiadesivas e antimicrobianas que sugerem as suas aplicações como ingredientes polivalentes ou aditivos. Assim, lipopeptides em um futuro próximo irá representar uma percentagem significativa do mercado de aditivos alimentares.

### **2.10.2 Aplicações em saúde humana**

A crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais de aplicação clínica resultou em um crescente interesse em considerar bacteriocinas como agentes antimicrobianos alternativos para o tratamento de infecções humanas (e, possivelmente, animais) (LAWTON et al., 2007). Resistência cruzada entre bacteriocinas e antibióticos convencionais de uso clínico raramente tem sido relatada, porque esses dois grupos de antimicrobianos agem em diferentes alvos celulares.

Desde a descoberta da colicina em 1925 (GRATIA, 1925 apud CHEN; LUO, 2009), centenas de peptídeos antimicrobianos têm sido identificados e alguns deles têm sido utilizados com sucesso contra patógenos de humanos e animais (SNELLING, 2005; KIRKUP, 2006). Assim como estas substâncias apresentam propriedades de lisar patógenos,

também exibiram atividades anti-tumoral (KAMYSZ; OKRÓJ; LUKASIAK, 2003). Assim, reconhecendo as atividades biológicas de peptídeos antimicrobianos é criticamente importante sua pesquisa para a concepção de complementos de terapia antibiótica convencional e de novos agentes terapêuticos.

Diversas bacteriocinas ou BLIS produzidas por espécies de *Bacillus* mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas de interesse, tais como *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) ou vancomicina resistente (VRE). Alguns exemplos são a BLIS produzida por *B. sphaericus*, pumilicina 4 ou os lantibióticos lichenidina, haloduracina e mersacidina. Haloduracina particularmente parece ser de interessante para aplicações médicas, porque é mais estável em valores de pH fisiológico do que a nisina (OMAN; VAN DER DONK, 2009). Mersacidina mostra forte atividade antimicrobiana contra *S. aureus* *in vitro* e em estudos com animais (SASS et al., 2008). O lantibiótico subtilosina A mostra atividade antimicrobiana contra patógenos como *Listeria monocytogenes*, *G. vaginalis* e *S. agalactiae* (SUTYAK et al., 2008 a). A Subtilosina tem assim um potencial de aplicação contra patógenos vaginais tais como as *G. vaginalis* resistentes às terapias convencionais com antibióticos. Além de sua atividade antibacteriana, algumas bacteriocinas/BLIS de *Bacillus* também mostram atividade antifúngica, o que poderia ser explorados para aplicações clínicas.

Bacteriocinas produzidas por cepas de *Bacillus* também pode encontrar aplicações como probióticos para uso humano, devido à sua atividade inibitória contra patógenos intestinais, como *C. perfringens*, *C. difficile* e outros. Por exemplo, *B. polyfermenticus* SCD (produtor de polifermenticina SCD) é um probiótico comercial para o tratamento em longo prazo de distúrbios intestinais, devido à sua atividade inibitória para *C. perfringens* (LEE et al., 2001). A linhagem probiótica *B. clausii* O/C produz substâncias inibidoras para *S. aureus*, *E. faecium* e *C. difficile* (URDACI et al., 2004), e thuricina CD visa especificamente *C. difficile* (HILL et al., 2009). Bacteriocinas de *Bacillus* também pode ter aplicações potenciais como contraceptivos naturais. Um bom exemplo é subtilosin A, que mostra a atividade espermicida contra espermatozóides de seres humanos e de uma variedade de animais como bovinos, equinos, caprinos (SUTYAK et al., 2008 a, b).

No caso da nisina, embora a principal aplicação seja como agente conservante natural em alimentos há pesquisas propondo a sua potencial utilização para fins terapêuticos, como para o tratamento de dermatite atópica (VALENTA; BERNKOP-SCHNÜRCH; RIGLER, 1996) e úlceras estomacais em pacientes com imunodeficiências (DUBOIS, 1995; KIM et al., 2003). Ademais, pesquisas demonstraram a atividade antimicrobiana da nisina no controle de

infecções no trato respiratório causadas por *Staphylococcus aureus* em um modelo animal (DE KWAADSTENIET; DOESCHATE; DICKS, 2009). Fernández et al. (2008) estudaram uma aplicação de nisina como uma eficiente alternativa aos antibióticos para o tratamento de mastite estafilocócica em mulheres durante a lactação. Outra interessante aplicação farmacêutica da nisina pode ser um futuro desenvolvimento de um potente contraceptivo vaginal para os seres humanos (ARANHA; GUPTA; REDDY, 2004). Gupta; Aranha; Reddy (2008) continuaram a investigação e demonstraram que a nisina não revelou nenhuma evidência de toxicidade e tem propriedades contraceptivas, além de não apresentar toxicidade. Esta bacteriocina também tem sido utilizada em produtos de saúde, tais como pasta de dentes e produtos para cuidados da pele. Como uso veterinário, a nisina é atualmente utilizada como sanitizante contra patógenos causadores de mastite como espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* (CAO et al., 2007; WU; HU; CAO, 2007).

Já alguns lipopeptídeos, que possuem ação similar aos antibióticos apresentam potente ação contra patógenos clínicos relevantes e resistentes, já que os antibióticos acabam por diminuir a potência e efetividade depois de exposições repetidas à micro-organismos patogênicos. Há também vários tipos de lipopeptídeos que são efetivos no controle de infecções fúngicas como as echinocandinas e derivados. São utilizados lipopeptídeos também para controle de *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium prolificans* e *Pseudallesheria polysperma* (MANDAL; BARBOSA, FRANCO, 2013). Além disso, têm se dado atenção à forte atividade antiviral de muitos tipos de lipopeptídeos tendo algumas pesquisas demonstrado que a viscosina pode aumentar a habilidade do controle do envelopamento de vírus humanos patogênicos (NYBROE; SORENSEN, 2004). Similarmente, a surfactina pode ser eficiente para diversos vírus envelopados, incluindo herpes vírus e retrovírus (VOLLENBROICH et al, 1997 b).

Na área da cosmetologia diversas aplicações têm sido bem documentadas além de diversas aplicações multipropósitos como no caso da surfactina (NISSEN et al., 1997). A surfactina é altamente biocompatível com toxicidade muito baixa para células de mamíferos com segurança para aplicação sem causar irritações para a pele humana. Algumas empresas têm utilizado vários derivados surfactina em produtos dermatológicos e cosméticos para a limpeza da pele com uma alta capacidade de lavagem (KANLAYAVATTANAKUL; LOURITH, 2010). Um cosmético de alta qualidade é caracterizada principalmente pelas propriedades que estimulam a produção de novo colágeno e de elastina. Com o aumento da idade do indivíduo e diminuição dos níveis de fatores de crescimento, a pele perde elastina

provocando o aparecimento de rugas finas. Algumas empresas de cosméticos estabelecidas nos EUA já desenvolvido e comercializado seus produtos formulados com lipopeptídeos que ajudam diretamente na estimulação da produção de colágeno e elastina, como agentes anti-envelhecimento.

Com efeito, estes lipopeptídeos são bem caracterizados pelas suas propriedades antioxidantes (CAMEOTRA; SINGH, 2004) e, portanto, além de serem usado para a limpeza, ação anti-rugas, estimulantes da produção de colágeno e elastina, agentes de eliminação de radicais livres e hidratação também apresentam atividade antimicrobiana de largo espectro (SUN et al., 2006). Assim, estes lipopeptídeos melhoram a fisiologia da pele saudável, com vários tipos de cosméticos como loções, cremes e sabonetes faciais. Para expandir a uma indústria de biotecnologia rentável, a manipulação genética dos organismos é essencial para a produção de alto rendimento e alta qualidade de lipopeptídeos no futuro (MANDAL; BARBOSA, FRANCO, 2013).

E, por fim, também podem ser incorporados em preparações probióticas para combater as infecções do trato urogenital. Como tratam-se de micro-organismos que são biologicamente seguros, os biossurfactantes produzidos podem ser uma alternativa viável aos agentes antimicrobianos sintéticos (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Existem trabalhos sobre a inibição do biofilme, formado por bactérias uropatogênicas e leveduras na borracha de silicone, devido a ação de biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus acidophilus* (VELRAEDS et al., 1996).

### 2.10.3 Aplicações em saúde animal

Algumas cepas de *Bacillus* são comercializadas como probióticos para a saúde animal, com base nas propriedades funcionais, tais como melhoria do peso corporal dos animais ou aves. Por exemplo, BioPlus2B contém uma mistura cepas de *B. licheniformis* e *B. subtilis* (MUTUS et al., 2006). Bacteriocinas produzidas por espécies de *Bacillus* podem ser usadas como probióticos animais para melhorar a saúde animal e inibir bactérias patogênicas. A linhagem de *B. licheniformis* produtora de lichenina foi relatada exibindo um efeito antibacteriano contra *S. bovis* e *Eubacterium ruminantium*, e possuindo uma notável atividade hidrolítica contra polissacarídeos diversos (PATTAIK et al., 2001). Por isso, oferece aplicações potenciais para melhorar fermentação ruminal, devido ao seu papel como auxiliar ao sistema digestivo destes animais e, devido à produção de propriedades antimicrobianas

(PATTNAIK et al., 2001). Esporos de *B. amyloliquefaciens* CECT 5940, produtora de BLIS, são utilizados como um probiótico para alimentação de aves (Ecobiols, Norel & Nature Nutrition) que age no trato gastrointestinal de aves, reduzindo o efeito de agentes patogênicos como bactérias como *C. perfringens*, *E. coli* e *Yersinia*, reduzindo assim, a mortalidade de aves (DIAZ, 2007).

A aplicação de bacteriocinas de *B. polymyxa* e *P. circulans* em aves domésticas foi relatado por Stern et al. (2005). Bacteriocinas produzidas por cepas de *P. polymyxa* NRRL B-30507, NRRL B-30508 e NRRL B-30509 assim como por *B. circulans* NRRL B-30644 foram usadas para controlar como *Campylobacter jejuni* um tratamento sem antibióticos para animais portadores de zoonoses. A administração dietética de preparações de bacteriocinas reduziu a colonização de perus por *C. jejuni*, diminuindo o risco de exposição pública à campilobacteriose (SVETICH et al., 2005).

Bacteriocinas de *Bacillus* com forte atividade inibitória contra estafilococos poderiam ser aplicadas na prática de controle de mastite em vacas leiteiras. Em um estudo recente, várias BLIS de *B. thuringiensis* (morricina 269, kurstacina 287, keniacina 404, entomocina 420 e tolworthcina 524) foram testadas contra uma coleção de isolados de *S. aureus* de fontes de laticínios, que apresentaram resistência a uma variedade de antibióticos comerciais (BARBOZA-CORONA et al., 2009). Apesar de linhagens de *S. aureus* diferirem na sensibilidade os melhores resultados foram reportados para morricina 269, seguido por kurstacina 287. Os autores sugeriram que estes peptídeos antimicrobianos poderiam ser úteis como um método alternativo para controle de mastite bovina, e propuseram a superexpressão destas BLIS e o desenvolvimento de preparações das bacteriocinas purificadas e concentradas para a prevenção e tratamento de mastite. Outra substância antimicrobiana de interesse para aplicação em saúde animal é a BLIS produzido por *B. subtilis* LFB112 isolado de ervas chinesas, que é ativa contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas envolvidas em doenças de animais domésticos (XIE et al., 2009).

#### **2.10.4 Aplicações ambientais e como agentes de biocontrole**

Os biossurfactantes tem diversas aplicações, incluindo tratamento de derrames de óleo no mar ou na terra, remoção de pesticidas do solo, como estabilizadores de espuma, nas indústrias de alimentos e farmacêutica e na produção de sabões e detergentes (COOPER, 1986).

Bacilos são também naturalmente associados com solo e plantas. Para este razão, linhagens produtoras de bacteriocinas ou BLIS com atividade antibacteriana ou antifúngica podem ser favoráveis para aplicação como agentes de biocontrole. Este gênero apresenta grande vantagem em relação aos outros, devido à sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem, permitindo, portanto, sua utilização na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e sua aplicação no tratamento de folhas na forma de sprays (BACKMAN, WILSON; MURPHY, 1997). Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Muitas das bacteriocinas ou BLIS produzidos por bacilos poderiam inibir bactérias fitopatogênicas. Tanto as linhagens produtoras de bacteriocinas ou preparações parcialmente purificadas poderiam ser aplicadas no controle biológico de doenças de plantas. Por exemplo, ericina S é ativa contra *Clavibacter michiganensis*, o agente causador do cancro bacteriano do tomateiro. Da ericina purificada ou de sua linhagens produtora pode ser desenvolvido um bioprotetor de tomateiros. Outro exemplo é o 14B Bac, uma BLIS produzido por *B. subtilis* 14B isoladas da rizosfera de plantas saudáveis e é ativa contra *Agrobacterium tumefaciens*, podendo ser potencialmente aplicada como um agente de controle biológico para redução das infecções em plantas causadas por *A. tumefaciens*.

Bactérias da rizosfera podem promover o crescimento das plantas por vários mecanismos. Plantas promotoras de crescimento de rizobactérias são de grande interesse para aplicação na agricultura. Espécies de *Bacillus* são conhecidas por atuar como agentes promotores de crescimento de plantas e/ou promoção de resistência a doenças em plantas, como exemplificado pelo polipeptídeo produzido por *B. thuringiensis* linhagem NEB17 (SMITH et al., 2008). Deste modo, estas bacteriocinas têm uma dupla função podendo ter amplos espectros inibitórios, sendo não apenas explorada para melhorar o crescimento das plantas e a produtividade da cultura, mas também para inibir bactérias fitopatogênicas e/ou para diminuir a contaminação da planta com bactérias patogênicas humanas, tais como *L. monocytogenes* ou *Salmonella* sp.

BLIS ou cepas produtoras exibindo atividades antifúngicas poderiam ser aplicadas no controle biológico da decomposição de plantas e no controle do pós-colheita de frutas e legumes. Um exemplo é *B. amyloliquefaciens* linhagem RC-2, que produz uma BLIS ativa contra *Colletotrichum dematium*, fungo da antracnose de amora e vários outros fungos

fitopatogênicos e bactérias, como como *Rosellinia necatrix*, *Piricularia oryzae*, *A. tumefaciens* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Bacteriocina produzidas por *Bacillus* podem também ser passíveis de outras aplicações ambientais. Algumas cepas têm sido isoladas de reservatórios de petróleo, como a produtora de cerecidina *B. cereus* Q1 ou as cepas produtoras de BLIS isoladas de um reservatório de petróleo brasileiro com atividade antimicrobiana contra bactérias redutoras de sulfato (KORENBLUM et al., 2005). Entre elas, a BLIS produzida pela cepa *B. firmus* H2O-1 é um pequeno peptídeo que é estável ao calor e ao pH alcalino, e provavelmente resiste a condições ambientais durante a perfuração de petróleo. Devido à sua alta atividade antimicrobiana para bactérias redutoras de sulfato esta BLIS oferece uso potencial como um biocida na indústria de petróleo para controlar os problemas associados com estas bactérias. Em outros estudos, foi mostrado que a BLIS produzida pela linhagem H2O-1 reduziu a viabilidade e a fixação de um consórcio de um biofilme de bactérias redutoras de sulfato (KORENBLUM et al., 2008). Deste modo, os autores sugerem que esta linhagem ou seus peptídeo antimicrobianos pode ter um potencial para aplicação em oleodutos com fins de inibir a formação de biofilme e consequentemente, reduzir biocorrosão.

## 2.11 DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA A BACTERIOCINAS

Uma preocupação com o uso das bacteriocinas para a preservação de alimentos é a seleção de linhagens resistentes (RILEY; WERTZ, 2002). Em algumas populações de espécies normalmente sensíveis a bacteriocinas, já foram encontradas linhagens microbianas resistentes. Deste modo, espera-se que classes similares de resistência possam existir para todas as bacteriocinas (DYKES, 1995).

A célula alvo pode desenvolver resistência ou tolerância à ação das bacteriocinas geralmente alterando receptores da superfície celular ou sistema de translocação (RILEY, 1998).

Podem ser observados três tipos de mecanismos de resistência: imunidade, resistência transferível e resistência espontânea (DYKES, 1995). A imunidade é aquela apresentada pela célula produtora ou por bactérias que também produzem bacteriocinas (KLAENHAMMER, 1993). A resistência transferível é aquela codificada por elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, e que não estão ligados à produção de bacteriocina. A ocorrência de resistência espontânea pode ocorrer em baixos níveis em populações bacterianas. No entanto,

esta não leva à proliferação de linhagens resistentes no ambiente já que os mecanismos de resistência podem levar a uma perda na habilidade de concorrer contra linhagens não resistentes na ausência da bacteriocina (DYKES, 1995). Além disso, a alteração da composição e da estrutura da parede da(s) membrana(s) celular(es), de modo a que a bacteriocina seja fisicamente incapaz de alcançar o alvo, também constitui um fator que pode contribuir para tornar uma célula resistente a certas bacteriocinas. Alternativamente, certos componentes celulares (receptores), que são essenciais para o aumento da ação das bacteriocinas, podem estar faltando ou mutados. Outra possibilidade que se especula é a presença de proteases inespecíficas no alvo ou próximas a ele que poderiam reduzir a efetividade das bacteriocinas nestes casos (EIJSSINK et al., 2002).

Estudos com bactérias ácido-láticas têm demonstrado geração de resistência à atividade de bacteriocinas depois de linhagens sensíveis terem sido expostas a 25 ciclos de crescimento sucessivo na presença da bacteriocina. O tratamento com uma combinação de bacteriocinas, por exemplo, nisina e uma bacteriocina classe IIa, poderia reduzir teoricamente a incidência de resistência. Um problema adicional é a resistência a uma classe de bacteriocina produzidas por bactérias ácido-láticas poder resultar numa resistência cruzada com outra classe de bacteriocina. Porém, a natureza química diversa das bacteriocinas propõe modos de ação diferentes, o que conduz a pensar que uma resistência cruzada é mais difícil de obter. Não obstante, tem sido reportada uma resistência cruzada entre diferentes bacteriocinas por diversos autores (GRAVESEN et al., 2002).

## 2.12 TOXICIDADE DAS BACTERIOCINAS

Para aprovação do uso de uma bacteriocina como preservativo de alimentos é necessário que a mesma seja identificada quimicamente e caracterizada. O processo de produção deve ser descrito e o método utilizado para quantificação e padronização do peptídeo deve ser mostrado. Além disso, é importante o conhecimento do destino da molécula após a ingestão, dados toxicológicos bem como levar em conta os aspectos econômicos (CLEVELAND et al., 2001). Toxicidade é a qualidade que caracteriza o grau de virulência de qualquer substância nociva para um organismo vivo ou para uma parte específica desse organismo. Estudos toxicológicos com animais de laboratório constituem um dos principais componentes da avaliação de segurança de produtos químicos (MORENO et al., 1999). Os principais estudos toxicológicos envolvendo bacteriocinas relatados até o momento se referem

aos testes realizados para a aprovação do uso da nisina como bioconservador em alimentos (FDA, 1988). O requerimento mínimo necessário para demonstrar a segurança do consumo do alimento em longo prazo é a realização de um estudo subcrônico de 90 dias. Estudos mais longos podem ser necessários se os resultados indicarem efeitos adversos (KUIPER et al, 2001).

As bacteriocinas são, geralmente, inativadas por enzimas proteolíticas, incluindo as de origem pancreática (tripsina e  $\alpha$ -quimiotripsina). A sensibilidade de algumas bacteriocinas à degradação por enzimas proteolíticas é bastante interessante com relação à segurança alimentar, uma vez que a ingestão de bacteriocinas não promove alterações na ecologia do trato gastrointestinal, por isso, não apresenta os mesmos riscos relacionados ao uso, por exemplo, de antibióticos. Contudo, estudos toxicológicos são necessários para a aprovação do uso de novos tipos de bacteriocinas em alimentos (MORENO, 1995). O FDA e o Food Safety and Inspection Service (FSIS), do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos confirmam a segurança, a eficiência e o uso de novos conservantes, incluindo as bacteriocinas (POST, 1996).

Com base nos apontamentos de todos os estudos citados, evidencia-se a necessidade e a grande importância do emprego de sistemas adequados de controle bem como de novas tecnologias na produção de alimentos que priorizem o necessário cuidado com a saúde pública. No laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG e no laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioquímica da UFRGS, micro-organismos produtores de bacteriocinas e de biossurfactantes tem sido alvo de uma profunda investigação. Diversas bacteriocinas produzidas por espécies de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* e outras já foram caracterizadas, purificadas e mostraram-se efetivas contra micro-organismos patogênicos. Deste modo, torna-se necessário o contínuo estudo dessas substâncias avaliando suas atividades antagonistas bem como os métodos de purificação e caracterização utilizados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp. isolados da matriz alimentar Puba.

#### 4.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, da matriz alimentar puba, linhagens de *Bacillus* e identificá-las por meio de métodos fenotípicos e genotípicos;
- Avaliar *in vitro* o espectro de ação antibacteriana e antifúngica das linhagens de *Bacillus*;
- Avaliar a produção de biosurfactantes por *Bacillus* spp. por meio do teste de atividade hemolítica, do índice de emulsificação e da medida da tensão superficial;
- Verificar a presença dos genes relacionados à produção de subtilosina A, subtilina, iturina A e surfactina em *Bacillus* sp.;
- Selecionar uma linhagem de *Bacillus* sp. de amplo espectro de atividade antimicrobiana, ação biosurfactante e que possua genes de bacteriocinas e lipopeptídeos;
- Caracterizar o perfil de produção das substâncias com atividade antimicrobiana e surfactante de *Bacillus* sp. P5 ao longo da curva de crescimento;
- Avaliar *in vitro* o aumento da produção e o espectro de ação antibacteriana de *Bacillus* sp. P5 quando utilizado o mecanismo de ativação, estímulo e/ou indução por meio da inoculação de células mortas de determinados micro-organismos;

- Purificar os lipopetídeos produzidos por *Bacillus* sp. P5 pelas técnicas de precipitação ácida ou extração com solventes orgânicos e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa;
- Caracterizar estruturalmente os lipopetideos produzidos por *Bacillus* sp. P5 por espectrometria de massas MALDI-TOF;
- Extrair lipopeptídeos da matriz alimentar puba e caracterizá-los por espectrometria de massas MALDI-TOF.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS

Dois tipos de amostras bacterianas foram incluídos neste estudo: amostras teste, do gênero *Bacillus*, recuperadas de puba de mandioca (um produto alimentício obtido por meio da fermentação espontânea de raízes de mandioca submersas em água), que foram avaliadas quanto a produção de substância(s) antimicrobiana(s) e debiosurfactante(s) e amostras indicadoras da expressão destas atividades.

Pela sua importância como patógenos humanos ou de animais e/ou deteriorante para a indústria de alimentos, as seguintes espécies indicadoras da atividade antimicrobiana foram utilizadas nos experimentos: Gram positivos - *B. amyloliquefaciens* LBM 5006, *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350, *B. cereus* ATCC 14579, *B. cereus* A-1 (alimento), *B. cereus* B-2 (alimento), *B. cereus* (alimento), *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* DSM 3258, *B. subtilis* ATCC 21228, *B. subtilis* ATCC 7971, *B. subtilis* (alimento), *Corynebacterium fimi* NTCS 7547, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* (alimento), *Lactobacillus delbruecki* subs. *lactis* ATCC 7830 *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, *Lactobacillus murinus* L2 (camundongo), *Lactobacillus rhamnosus* (alimento), *Listeria monocytogenes* ATCC 6477, *Listeria monocytogenes* ATCC 15113, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria innocua* (alimento), *Listeria seeligeri* AC 82/4, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus intermedius* (clínico), *Staphylococcus haemolyticus* (clínico), *Staphylococcus saprophyticus* (clínico), *Streptococcus* sp.(clínico), *Streptococcus pneumoniae* (clínico), *Weissella paramesenteroides* (alimento). Gram negativos - *Enterobacter aerogenes* (alimento), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aruginosa* (clínico), *Pseudomonas fluorescens* (alimento), *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ATCC 13311, *Serratia marcescens* (alimento), *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

Além disso, também foram utilizadas as seguintes linhagens de fungos filamentosos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* 5B1, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *P. chrysogenum*, *Penicilium roqueforti*, *Diplodia* sp. e a levedura *Candida*.

## 4.2 MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

*Bacillus* sp. e as bactérias indicadoras da expressão da atividade antimicrobiana foram mantidas em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, Difco Lab., Inc., Detroit, USA), ou caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharp - Difco Lab., Inc., Detroit, USA) todos acrescidos de glicerol 15% (v/v) a temperatura de -20 °C ou -80 °C. As culturas de trabalho foram obtidas por meio da reativação das amostras congeladas em caldo BHI ou MRS, conforme o micro-organismo, incubadas à 24h por 37 °C, seguido de plaqueamento em em meio BHI ou MRS sólido, conforme o micro-organismo novamente. As placas foram mantidas em geladeira e reativadas por meio de transferência para meios novos para a produção dos inóculos.

Os fungos filamentosos e a levedura foram mantidos em caldo batata dextrose e/ou Ágar batata dextrose (BDA) e incubados a 25 °C por até 72 h. As culturas de trabalho foram armazenadas em placas ou tubos contendo ágar BDA, acrescidos de glicerol a 50%.

## 4.3 QUANTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *Bacillus* sp. RECUPERADOS DE PUBA

Duas amostras de pubas dos lotes de fermentação denominados como D e E foram obtidas no outono de 2009 de um mesmo produtor do distrito de Saco da Raiz, Estância, Sergipe. Pesou-se 25 g de cada amostra e transferiu-se para saco plástico ao qual foi acrescido 225 mL de água peptonada 0,1%, esterilizada. Após a homogeneização no *stomacher* por cerca de 30 s, transferiu-se 1 mL da amostra diluída para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ . Um volume de 100  $\mu$ L de cada amostra nas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  foram plaqueadas na superfície de ágar *Mannitol Egg Yolk Polymixin* (MPY, Difco, EUA). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. As colônias típicas sugestivas de *B. cereus* foram enumeradas e repicadas para agar Nutriente (Difco) para a obtenção de culturas puras (BAM, 2012).

### 4.3.1 Caracterização citomorfológica, bioquímica e fisiológica de *Bacillus* sp.

A identificação presuntiva das colônias típicas foi baseada na morfologia celular por meio da coloração de Gram e pesquisa de catalase. Posteriormente, foi feita uma suspensão das colônias típicas para tubos contendo água tamponada esterilizada, para a inoculação dos meios utilizados nos testes bioquímicos e fisiológicos (BAM, 2012). Adicionalmente, a

identificação foi feita por meio dos kits API 50-CHBe API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França).

#### 4.3.1.1 Fermentação da glicose em anaerobiose

Utilizou-se o caldo vermelho de fenol acrescido de glicose 1%, previamente desaerado e, após o inóculo, adicionou-se ao tubo óleo mineral esterilizado, para obtenção de anaerobiose. O resultado foi considerado positivo quando houve mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo devido a acidificação e consequente virada de cor do indicador de pH (BAM, 2012).

#### 4.3.1.2 Resistência a lisozima

Utilizou-se o caldo Nutriente (controle) e caldo Nutriente adicionado de 0,001% de lisozima (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) e incubou-se a 37°C, por 24 h. *B. cereus* não tem seu crescimento inibido pela lisozima, portanto, o teste é considerado positivo quando exibe crescimento (turbidez) e negativo se não o apresenta (BAM, 2012).

#### 4.3.1.3 Redução de nitrato

Células dos isolados bacterianos foram inoculadas em caldo Nitrato e os tubos foram incubados a 37°C, por 24 h. Após o período de incubação adicionou-se 0,3 mL de cada um dos reagentes ácido sulfanílico e  $\alpha$ -naftilamina. Quando ocorreu a cor laranja ou vermelha o teste foi considerado positivo (BAM, 2012). No caso de reação negativa, adicionou-se uma pitada de zinco em pó e observou-se a mudança da coloração de meio após a adição do metal (BAM, 2012).

#### 4.3.1.4 Verificação de crescimento rizóide

Com uma alça de platina depositou-se um inóculo de cada amostra bacteriana sobre a superfície seca e no ponto central da placa de ágar Nutriente. As placas foram incubadas a 30°C, por 48 a 72 h. Após incubação verificou-se o tipo de crescimento. O crescimento rizóide caracteriza-se pelo aparecimento de colônias com longas extensões sem forma de

raízes ou longos fios, típicas de *Bacillus mycoides*. *Bacillus cereus* não apresenta crescimento rizóide, porém algumas cepas podem apresentar colônias rugosas em forma de galáxia (BAM, 2012).

#### 4.3.1.5 Atividade hemolítica

Inoculou-se células bacterianas sobre a superfície de placas de ágar Tryptcaseína de Soja (TSA) acrescidas de 5% de sangue de carneiro e incubou-se a 37°C, por 24 h. A presença de zona clara com 2 a 4 mm em torno da colônia indica  $\beta$ -hemólise (BAM, 2012).

#### 4.3.1.6 Motilidade

Inoculou-se as amostras contendo células bacterianas dos *Bacillus* sp. em profundidade no ágar mobilidade para *B. cereus* e incubou-se à 30°C, por 24 h. A presença de crescimento difuso no meio indica resultado positivo (BAM, 2012).

#### 4.3.1.7 Voges-Proskauer (VP)

Inoculou-se células bacterianas em tubos contendo 5 mL de caldo Voges-Proskauer e incubou-se a 37°C, por 48 h. Transferiu-se 1 mL da cultura para tubos 16 x 125 mm e adicionou-se 0,6 mL de uma solução de  $\alpha$ -naftol e 0,2 mL de KOH a 40%. Os tubos foram mantidos destampados a temperatura ambiente por uma hora. O aparecimento da coloração rósea ou violeta foi considerado positivo (BAM, 2012).

#### 4.3.1.8 Detecção de produção de cristais de toxina protéica

Inoculou-se as amostras isoladas em ágar Nutriente inclinado e incubou-se a 30°C por 24 h. Os tubos foram deixados por 2 a 3 dias em temperatura ambiente e, após este tempo, preparou-se um esfregaço da cultura em lâmina e adicionou-se metanol sobre ela. Após secagem da lâmina ela foi coberta com fucsina básica a 0,5% e, posteriormente, lavada com água. A lâmina foi observada ao microscópio sob imersão e verificada a presença de cristais de toxina em formato tetragonal (BAM, 2012).

#### 4.3.1.9 Identificação por meio dos testes bioquímicos e fisiológicos com Kits API 50 CHB e API 20E

Foi preparada uma suspensão celular das duas amostras bacterianas isoladas dos lotes D e E da puba, ambas de bacilos a serem identificados e seguido o protocolo sugerido pelo fabricante. Após, incubou-se por 34-48h em estufa microbiológica a 37 °C e anotou-se os resultados obtidos das cartelas 50 CHB e 20E. Utilizou-se então o software APILAB Plus (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) para obtenção dos resultados.

### 4.3.2 Análise Quimiotaxonômica

#### 4.3.2.1 Protocolo da Análise de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) - Sistema Sherlock® - Microbial Identification System (MIDI)

A identificação quimiotaxonômica dos isolados de *Bacillus* sp. designadas como C3 e P5 foi realizada por meio da análise do perfil de ácidos graxos totais das células bacterianas, detectados e quantificados por cromatografia gasosa como ésteres metílicos dos ácidos graxos (*Fatty Acid Methyl Ester* - FAME). As análises foram feitas no Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia Aplicada ao Meio Ambiente (LBBMA), Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Brasil). Células bacterianas foram coletadas a partir de uma cultura em *Trypticase Soy Broth Agar* (TSBA) e submetidas as etapas de saponificação, metilação, extração de ácidos graxos e lavagem, empregando-se o kit *Instant Fame* (Sistema de Identificação Microbiana, Microbial ID Inc., Newark, Delaware), de acordo com as recomendações do fabricante (Sasser, 2006).

O extrato, contendo os ésteres metílicos dos ácidos graxos, foi então analisado em um cromatógrafo a gás Agilent 6890 usando padrões de calibração (# 1300-AA, MIDI, Inc.). O software de identificação microbiana Sherlock® (MIDI, Inc., versão 4.5) foi usado para designar os picos de GC para estruturas de ácidos graxos individuais. A identificação foi feita por ácidos graxos comparativos com banco de dados para microrganismos aeróbios de sistemas de amostras ambientais (Sherlock® Microbial biblioteca TSBA, versão 4) utilizando as bibliotecas de referências *Instant Environmental TSA library* (ITSA1.0) e/ou *Instant Environmental R2A library* (IR2A1) do sistema Sherlock® Microbial Identification System (MIDI Inc., Newark, DE). Neste sistema, a identificação em nível de espécie baseia-se no

índice de similaridade (SI), que é um valor numérico (0-1) que expressa o grau de similaridade da composição de ésteres metílicos de ácidos graxos entre as amostras testadas e aquelas depositadas nas bibliotecas de referências. Assim, as amostras com índice de similaridade/semelhança (IS) de 0,5 ou mais e separada dos outros organismos na biblioteca com pelo menos 0,100 indicam boa qualidade de identificação e foram considerados como micro-organismos identificados. Se o SI encontrado está entre 0,3 e 0,5 e bem separado da segunda escolha (> 0,1 de separação) pode ser uma boa opção de identificação mas uma linhagem atípica (KUNITSKY et al. 2006).

### 4.3.3 Análise Filogenética

#### 4.3.2.1 Protocolo de extração de DNA

Retirou-se uma alçada de colônias do micro-organismo em questão de uma cultura em placa com meio BHI sólido e transferiu-se para 5 mL de caldo BHI. Incubou-se por 24 h a 30°C. Coletou-se 1 mL do caldo da cultura do crescimento dos dois *Bacillus* sp. com 24 h de crescimento em tubos de microcentrifuga de 2 mL estéreis. Centrifugou-se por 3 min a 12.000 g. O DNA de *Bacillus* sp. C3 e de *Bacillus* sp. P5 foram então extraídos utilizando o *SV Genomic DNA kit* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) segundo instruções do fabricante.

Aplicou-se o produto resultante da extração de DNA em um gel de agarose a 1% para visualizar a qualidade do DNA e o mesmo também foi quantificado utilizando-se um espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific, USA). Procedeu-se a etapa de PCR ou congelou-se para posteriormente usar o DNA extraído para o PCR.

#### 4.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

As Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas empregando os *primers* universais 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa et al. (2006) para o sequenciamento do gene rRNA 16S.

As condições da PCR utilizadas foram: desnaturação inicial por 5 min. a 95 °C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C para desnaturação, 1 min. e 30 s a 46 °C para o anelamento dos primers,

80 s a 72 °C para extensão e 7 min. a 72 °C para extensão final (Adaptado de Horisawa et al., 2009). O produto de PCR foi avaliado através de gel de agarose 1%.

#### 4.3.2.3 Purificação das amostras de PCR

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se para um volume de 50 µL de PCR: 18 µL de produto de PCR; 1,9 µL de acetato de amônio 7M gelado e 20 µL de isopropanol a 4 °C. Misturou-se tudo em um microtubo e homogeneizou-se no vortéx por 15 segundos. Após, centrifugou-se por 15 min. A 13.000 g. Após este período, descartou-se o sobrenadante e à amostra foram acrescentados 124 µL de etanol 70% a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 5 min a 13.000 g novamente. Descartou-se o sobrenadante. Colocou-se para secar em bloco térmico a 50°C por 30 min. Após, ressuspendeu-se o pellet com 10 a 20 µL de água Mili-Q, homogeneizando-se bem. Deixou-se por 2 h no banho úmido a 37 °C ou *overnight* a temperatura ambiente. Fez-se um gel para verificar a presença de uma única banda. Os amplicons foram sequenciados pelo Laboratório ATCGene no Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil). O algoritmo BLAST foi utilizado para busca por seqüências homólogas no GenBank e, para alinhamento destas seqüências, utilizou-se o software BioEdit. Para a construção dos dendogramas as seqüências do gene rRNA 16S foram checadas para qualidade, alinhadas e analisadas usando o software Phred v.0.20425 (ERWING; GREEN, 1998), Phrap v.0.900319 (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 2001) e Consed 12.0 (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). As análises filogenéticas dos dendogramas foram baseadas nas seqüências de rRNA 16S e foram construídas no programa Mega versão 4.0 (KUMAR et al., 2004). A árvore foi construída a partir do método de *Neighbor-joining*, utilizando-se o modelo evolutivo de substituição nucleotídica de Kimura-2-parâmetros. A confiabilidade dos nós foi avaliada através de 1000 réplicas de *Bootstrap*. Foi incluída pelo menos uma seqüência de, no mínimo, uma espécie de cada grupo reconhecido para o gênero *Bacillus*.

#### 4.3.4 Caracterização da atividade antimicrobiana

##### 4.3.4.1 Obtenção do extrato bruto da cultura

###### 4.3.4.1.1 Preparação do pré-inóculo

As colônias de *Bacillus* sp. foram reativadas em BHI sólido foram coletadas por raspagem e transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de caldo BHI. A cultura com o pré-inóculo foi incubada a 37°C por 24 h, em incubadora com agitação de 125 rpm.

As colônias do micro-organismo produtor, estocadas em ágar BHI, foram coletadas por raspagem de placas e transferidas para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de caldo cérebro coração (BHI). A cultura com o pré-inóculo foi incubada a 37°C por 24 h, em equipamento incubador com agitação – *shacker* (125 rpm).

###### 4.3.4.1.2 Obtenção do inóculo

Uma alíquota de 1% (v/v) do pré-inóculo foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo BHI. A cultura foi incubada por 24 h em incubadora com agitação (125 rpm) a 42 °C. Após este período, a cultura foi centrifugada durante 15 min. a 10.000 g. O sobrenadante foi esterilizado por filtração através de filtros de celulose com poros de 0,22 µm acoplados a seringas (para volumes pequenos) ou mediante filtração à vácuo com filtros de sílica de 0,22 µm (para volumes grandes). O filtrado foi conservado em geladeira a 4 °C até utilização, por um período máximo de 7 dias.

###### 4.3.4.1.2.1 Espectro de ação

A atividade antimicrobiana do sobrenadante bruto contra as culturas indicadoras descritas no item 4.1 foi avaliada pelo método de difusão em ágar modificado (KIMURA et al., 1998; MOTTA; BRANDELLI, 2002). Para isto, foram preparadas suspensões das culturas indicadoras em solução fisiológica com  $10^8$  células/mL (correspondente a 0,5 na escala de Mac Farland) e espalhadas com *swab* em placas contendo os meios de cultura apropriados para cada espécie de micro-organismo a ser testado (MRS ou BHI). Alíquotas de 20 µL do

sobrenadante bruto (centrifugado e filtrado) de *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5 foram aplicadas, sob a forma de um *spot*, diretamente sobre o ágar solidificado em placas contendo ágar BHI ou MRS e previamente inoculadas com a suspensão das bactérias indicadoras. Zonas de inibição, com a formação de halos e ausência de crescimento ao redor do inóculo, foram medidas após incubação por 24-48h a 37 °C indicando a presença de substâncias inibidoras. Os halos foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo, Digimatic Caliper, Japan) com precisão para 0,01mm. O teste foi realizado em duplicata com dois sobrenadantes obtidos em diferentes datas.

#### 4.3.4.1.2.2 Outras condições de cultivo

Para este ensaio, foram utilizadas as seguintes espécies de bactérias *Bacillus cereus* ATCC 14579; *B. cereus* A-1 (isolado de puba), *B. cereus* B-2 (isolado de puba), *B. cereus* C-3 (isolado de puba), *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* DSM 3258, *B. subtilis* ATCC 21228, *B. subtilis* ATCC 7971, *Corynebacterium fimi* NTCS 7547, *E. coli* ATCC 25922, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, *Listeria monocytogenes* L. *monocytogenes* 6477, *L. monocytogenes* 15113, *L. monocytogenes* 19112, *L. monocytogenes* 19115, *S. aureus* ATCC 25923, *S. enterica* ser. *Typhimurium* ATCC 13311, *Weissella paramesenteroides* (isolado de alimento). As mesmas foram reativadas, dependendo da sua espécie, em ágar BHI ou ágar MRS.

No ensaio de determinação da atividade antibacteriana foram também analisadas algumas condições de crescimento e produção da(s) possível(is) substância(s) antimicrobiana(s), pelos dois micro-organismos estudados, utilizando os meios BHI e TSB (Tryptic Soy Broth) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Condições de crescimento testadas para a produção da(s) substância(s) antimicrobiana(s) em *shaker*.

Condição	Meio	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
1	TSB	30	30
2	TSB	30	42
3	TSB	37	42
4	BHI	30	30
5	BHI	30	42
6	BHI	37	42

Tempo de Incubação: 24 h. Agitação de 125 rpm.

A atividade antibacteriana dos sobrenadantes foi determinada conforme já descrito no item 4.3.4.1.2.1e as zonas de inibição foram medidas após incubação por 24 h a 37 °C.

#### 4.3.4.1.2.3 Detecção da atividade antifúngica

Foram utilizados para este ensaio os seguintes fungos filamentosos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e a levedura *Candida*. Os mesmos foram inoculados em placas de ágar BDA (Ágar Batata Dextrose) e incubados por 72 h antes de serem utilizados para a contagem de esporos e teste da atividade antifúngica.

Para o teste da atividade antifúngica adicionou-se 5 mL de água esterilizada sobre o crescimento da colônia fúngica na placa de Petri e com um *swab*, cuidadosamente, foram raspadas as estruturas fúngicas. Após, pipetou-se esta água com os esporos da espécie de fungo em questão e colocou-se em um frasco estéril. Então pipetou-se 10 µL desta suspensão de esporos e 990 µL de H<sub>2</sub>O estéril em um microtubo e misturou-se bem. Posteriormente, colocou-se 5 µL da suspensão em uma câmara de Neubauer e fez-se a enumeração dos esporos em cinco campos.

O número de esporos contados em cada campo foi multiplicado por cinco (5), para obter-se o valor final de esporos contados nos cinco campos. Então, a partir da quantidade de esporos, calculou-se a quantidade de esporos que deveria ser adicionada para cada placa, onde fez-se semeadura destes esporos através de *pour plate* em Ágar Batata (BDA) semi-sólido.

Cálculo:  $m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$ , sendo que:

m<sub>1</sub>: número de esporos existentes na suspensão.

v<sub>1</sub>: volume a ser adicionado no Ágar semi-sólido.

m<sub>2</sub>: número de esporos que se deseja na suspensão.

v<sub>2</sub>: volume final de Ágar semi-sólido.

Após, inoculou-se, sob a forma de um “spot” de 20 µL, o micro-organismo produtor em caldo BHI ou o sobrenadante do mesmo, liofilizado e não liofilizado. As placas foram incubadas por 72h a 30 °C. Todos os experimentos foram realizados no mínimo com duas repetições.

### 4.3.5 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes

#### 4.3.5.1 Verificação da atividade hemolítica em placas de Ágar sangue

O método utilizado por Hsieh et al. (2004) foi modificado como segue. Colônias de *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5 foram selecionados e cultivadas por 24 h em caldo TSB a 37 °C e inoculadas, posteriormente, em placas de ágar Triptcaseína de Soja (TSA) acrescidas de 5% de sangue de carneiro, incubando-se a 37°C, por 24 h. A presença de uma zona de hemólise ao redor da colônia indica produção de um biossurfactante, apesar de esta ser uma medida indireta.

#### 4.3.5.2 Índice de emulsificação ( $E_{24}$ )

A avaliação do índice de emulsificação (COOPER; GOLDENBERGER, 1987) foi realizada utilizando culturas e sobrenadantes de *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5 crescidos em meio BHI, e em meio de Landy acrescido de glutamato ou arginina (Apêndice B) a 37 °C por 24 h com agitação de 125 rpm, porque o biossurfactante pode ser excretado no meio ou permanecer fixo ao envoltório celular do micro-organismo. Para este teste, 2 mL da cultura ou do sobrendante foram misturados a 3 mL de compostos hidrofóbicos (óleo mineral, xileno, tolueno e biodiesel de soja), em tubos de ensaio com fundo chato (100 mm x 15 mm), sendo a mistura agitada em vortex por 2 min. e os frascos deixados em repouso por 24 h. Após este período, foi determinado o índice de emulsificação pela seguinte fórmula (VELHO et al., 2011):

$$E_{24} = (\text{altura da coluna emulsificada})/(\text{altura total}) \times 100.$$

#### 4.3.5.3 Tensão superficial

A medida da tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas, de *Bacillus* sp. C3 e de *Bacillus* sp. P5, removidas por meio de centrifugação, a 10.000 g por 15 min. Esta medição foi efetuada, para as duas bactérias, após o crescimento em três meios de cultura: caldo BHI, caldo Landy com arginina e caldo Landy com glutamato (24 h). As amostras permaneceram por 30 min. a temperatura ambiente e a tensão superficial foi

determinada na ausência de células microbianas utilizando-se um tensiômetro (Krüss, modelo K100, Alemanha). Como padrões utilizou-se a água destilada ( $72 \text{ mN m}^{-1}$ ) e etanol ( $24 \text{ mN m}^{-1}$ ).

#### **4.3.6 Pesquisa de genes de lipopeptídeos (surfactina, iturina A) e de bacteriocinas (subtilosina A e subtilina).**

##### *4.3.6.1 Extração de DNA*

Foi realizada a extração de DNA também das culturas utilizadas como controle positivo, de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Bacillus subtilis* DSM 3258, utilizando-se o *SV Genomic DNA kit* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) segundo instruções do fabricante.

##### *4.3.6.2 Condições da PCR*

Amplificações dos genes *sfp*, *ituD*, *sboA* e *spaS* foram realizadas por PCR com *primers* específicos (Tabela 3). *Primers* para *sfp* foram usados para amplificação de um fragmento de 675 pb, correspondente a surfactina de *Bacillus subtilis* (HSIEH et al., 2004), para *ituD* foram empregados para a obtenção do fragmento de 1203 pb, correspondente a iturina A de *Bacillus amyloliquefaciens* (HSIEH et al., 2008). Os iniciadores para *sboA* e *spaS* foram usados para amplificação de fragmentos de 734 e 566 pb, correspondentes ao grupo de genes de subtilosina A de *Bacillus subtilis* (GenBank No. AJ430547) e ao cluster gênico de subtilina de *B. subtilis* (GenBank No. U09819), respectivamente. PCR foi realizado utilizando-se as recomendações do fabricante em um Termociclador *Mastercycler® Personal Eppendorf* (Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburgo, Alemanha), sob os seguintes parâmetros: desnaturação por 1 min. a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , anelamento por 1 min. a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , alongamento por 1,5 min. a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  num total de 30 ciclos para iturina A e desnaturação por 1 min. a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , anelamento por 30 s a  $46 \text{ }^\circ\text{C}$ , e alongamento por 1 min. a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por um total de 25 ciclos para surfactina. Para subtilosina A e subtilina foram utilizados os seguintes parâmetros: desnaturação por 1 min. a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , anelamento por 30 s a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  (*sboA*) ou  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  (*spaS*) e alongamento para 1 min. a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  num total de 35 ciclos.

**Tabela 3.** Primers específicos para genes funcionais das bacteriocinas e de lipopeptídeos.

Bacteriocina/ Lipopeptídeos	Primers	Sequencia do Primer (5'-3')	Referências
Surfactina	<i>sfp-F</i> <i>sfp-R</i>	ATGAAGATTTACGGAATTTA TTATAAAAGCTCTTCGTACG	HSIEH et al., 2008
Iturina A	<i>ituD-F</i> <i>ituD-R</i>	ATGAACAATCTTGCCTTTTTTA TTATTTTAAAATCCGCAATT	HSIEH et al., 2008
Subtilosina A	<i>sboA-F</i> <i>sboA-R</i>	TAAACCTCATAAAAAGCATTTCCTT GGTAGATCCAAGAGGTATATTTAG	VELHO, 2010
Subtilina	<i>spaS-F</i> <i>spaS-R</i>	TGTAGGGTTAGGGGTATTAAACATG AGCAAGGTGATGCTAATGGTTTTAC	VELHO, 2010

#### 4.3.6.3 Métodos de sequenciamento

Os produtos de PCRs foram sequenciados no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brasil) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA) e o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, EUA). A metodologia usada corresponde ao método de interrupção da cadeia automatizado (SANGER et al., 1977). Dados de sequenciamento foram obtidos utilizando os software de coleta de dados v1.0.1 (Applied Biosystems). O algoritmo BLAST foi usado para recuperar para sequências homólogas no GenBank (Centro Nacional de Informação Biotechnonology [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]), utilizando o software CLUSTAL W, versão 1.8 (Thompson et al. 1994).

#### 4.3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana e de biosurfactante ao longo da Curva de crescimento de *Bacillus* sp. P5

Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo de *Bacillus* sp. P5, incubado anteriormente em *shaker* com agitação de 125 rpm a 37 °C por 24 h, foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de caldo BHI e incubado novamente sob agitação (125 rpm) a 42 °C por 24 h. Este foi considerado o ponto zero da curva. A medida da absorbância a 600 nm, a determinação das UFC/mL, das UA/mL, a produção de biosurfactantes e a medição de pH foram realizados nos seguintes tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, e 48 h de incubação, totalizando 9 pontos. As medidas foram realizadas em triplicatas.

#### 4.3.7.1 Determinação das Unidades Fomadoras de Colônias por mililitro

Durante o tempo de realização da curva de crescimento, ou seja, por 48h monitorou-se o crescimento de *Bacillus* sp. P5. Para isto, foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina 0,75% em cada ponto da curva. Após as diluições decimais terem sido realizadas 100 µL destas diluições foram inoculados em duplicata em placas de ágar BHI e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigasliki (método do espalhamento em superfície). As placas que apresentaram de 30 a 300 colônias foram contadas após incubação a 37 °C, por 24h. Os resultados foram expressos como o valor médio do número de células viáveis de *Bacillus* sp. P5 (logUFC.mL<sup>-1</sup>) das três repetições.

#### 4.3.7.2 Outras análises realizadas durante a curva de crescimento

Paralelamente, realizou-se a leitura do pH dos cultivos (pHmetro pH 21, Hanna Instruments, Brasil), a atividade antimicrobiana contra *B. cereus* ATCC 14576 e a atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizando-se tanto o sobrenadante da cultura quando o caldo de cultura com as células e a medição do índice de emulsificação (E<sub>24</sub>), conforme descrito no item 4.3.5.2., nos mesmos tempos descritos no item 4.4.1, até 48h.

#### 4.3.8 Efeito do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 sobre o crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de *B. cereus* ATCC 14579 (Curva dose-resposta)

Neste experimento buscou-se avaliar a sensibilidade de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de *B. cereus* ATCC 14579, durante o seu crescimento frente ao extrato bruto (sobrenadante filtrado) da cultura de *Bacillus* sp. P5.

Pré-inóculos de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de *B. cereus* ATCC 14579 foram preparados em Erlynmeyers contendo 50 mL de meio BHI, incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Após este período de incubação 1% do pré-incóculo foi inoculado em novos Erlynmeyers contendo 50 mL de meio BHI, em triplicata para cada bactéria. Como controle utilizou-se um cultivo de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de *B. cereus* ATCC 14579, sem adição do sobrenadante.

Para o cultivo controle, a cultura indicadora foi inoculada em meio BHI e em intervalos regulares de 2h, alíquotas foram coletadas para acompanhamento da absorbância

determinada em espectrofotômetro (600 nm) e contagem do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Para a determinação de UFC/mL foi utilizado o método descrito no item 4.4.1.1 realizando-se as diluições decimais e utilizando-se o método do espalhamento em placa. As placas foram incubadas por 48 h, a 37 °C em estufa bacteriológica. A contagem foi realizada na diluição onde as colônias estivessem isoladas, entre um mínimo de 30 e máximo de 300 colônias e os resultados foram expressos em log UFC/mL.

Para o cultivo teste procedeu-se como para o cultivo controle, porém, após 4h de incubação, 5 mL do extrato bruto de *Bacillus* sp. P5 equivalentes 800 UA frente às duas bactérias testadas, foram adicionados às culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e o efeito e modo de ação da substância antimicrobiana foram acompanhados em intervalos regulares de 2 h, sendo o experimento realizado durante 12 h. Foi realizada a determinação do número de UFC/mL e os resultados foram comparados àqueles da cultura controle, sem adição da substância antimicrobiana.

#### **4.3.9 Indução/ativação da produção de substâncias antimicrobianas**

Para estes testes de indução (ativação/estímulo) da produção da substância antimicrobiana por *Bacillus* sp. P5 células de diversos micro-organismos separadamente e inativados termicamente (mortos pelo calor em autoclave) foram adicionados a um cultivo em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid) contendo 1% de um pré-inóculo da linhagem produtora e incubada a 42°C, sob agitação (125 rpm). Foram realizados três (3) tipos de experimentos distintos: a) adição, separadamente, das células de quinze espécies microbianas patogênicas ao homem ou animais ou ainda fitopatógenas, inativadas termicamente, listadas abaixo; b) adição das células de treze (13) espécies microbianas isoladas do mesmo lote (E) de fabricação do qual foi isolado o *Bacillus* sp. P5, sendo que doze espécies foram identificadas como sendo bactérias ácido-lácticas (BAL) e uma espécie de levedura; c) adição do sobrenadante de cinco (5) espécies selecionadas entre as espécies anteriores que apresentaram melhores resultados quanto ao aumento da atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp. P5.

#### 4.3.9.1 Preparo das culturas indicadoras

Preparou-se inóculos em 10 mL de caldo BHI dos seguintes micro-organismos: *L. monocytogenes* 15113, *L. monocytogenes* 19112, *L. monocytogenes* 19115, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 14579, *Corynebacterium fimi* NTCS 7547, *S. enterica* ser. *Typhimurium* ATCC 13311, *Aspergillus flavus* (patógeno alimentar), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fitopatógeno), *Penicillium chrysogenum*, *Diplodia*, *Aspergillus fumigatus* (patógeno humano), *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus flavus* 5B1 (micotoxigênico); e de micro-organismos isolados do lote E, mesmo lote de fabricação da puba, do qual foi isolado o *Bacillus* sp. P5: *Lactobacillus acidophilus* E1-244, *L. plantarum* E1-227, *L. plantarum* EPF-255, *L. plantarum* EPF-256, *L. plantarum* EPF-257 *Lactobacillus fermentum* E2-237, *L. fermentum* E2-238, *L. fermentum* E4-249, *L. fermentum* E4-250, *L. paracasei* E3-241, *L. brevis* E2-248, *L. plantarum* E2-236 e *Pichia kudriavzevii* EPF-292.

Incubaram-se os tubos com os micro-organismos a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica ou sob agitação, caso fosse necessário, de acordo com cada micro-organismo, de modo a obter uma alta densidade celular. Posteriormente, autoclavou-se estes tubos de ensaio por 121°C por 30 min. Após, centrifugou-se estes 10 mL alíquotando-os em microtubos estéreis e centrifugou-se por 10.000 g por 10-15 min para a obtenção dos pellets de células mortas. Retirou-se o meio de cultura com cuidado e, após, lavou-se pelo menos uma vez as células com uma solução salina ou meio de cultura adicionando-se ao cultivo da bactéria produtora. Centrifugou-se mais uma vez para obtenção dos *pellets* e então, retirou-se a solução de lavagem. Com os pellets nos 10 microtubos, estes foram reunidos em um (1) microtubo com volume final de pelo menos 1 mL. Para isso, lavou-se cada microtubo retirando-se o *pellet* de cada um deles com 500 µL de caldo BHI, de modo que cada microtubo era lavado passando-se todo material para o tubo seguinte. No final obteve-se um volume final de células mortas de 1 mL. Estas células foram adicionadas ao cultivo da bactéria produtora a fim de avaliar alguma provável indução da produção das substâncias antimicrobianas em estudo, pela presença de células mortas no meio de cultura (MOTTA, 2007; BENITEZ, 2011).

Cinco culturas foram utilizadas para o teste de indução com sobrenadantes por terem apresentados melhores resultados: *Corynebacterium fimi* NTCS 7547, *Aspergillus fumigatus* (patógeno humano), *L. brevis* E2-248, *L. fermentum* E4-249 e *L. plantarum* EPF-257. O

sobrenadante das culturas ativas autoclavadas foi obtido por centrifugação a 10.000 g por 10-15 min para a obtenção dos pellets de células mortas e procedeu-se conforme descrito anteriormente acima.

#### 4.3.9.2 Cultivo e produção da substâncias antimicrobianas

Neste ensaio foi feito um pré-inóculo da cultura produtora de *Bacillus* sp. P5 em 30 mL de caldo BHI e incubou-se a 37 °C por 24 h em shaker com agitação (125 rpm). Após 1% (0,5 mL) deste pré-inóculo foi adicionado em 50 mL de caldo BHI em frascos Erlenmeyer e incubou-se por mais 24h a 37 °C, no 3º dia fez-se novo inóculo de 1% e incubou-se por 24h a 42 °C. A partir de então formou-se 2 grupos em avaliação:

- a) *Controle*: Erlenmeyer com 49 mL de caldo BHI + 0,5 mL do pré-inóculo + 0,5 mL de meio de cultura BHI, em triplicata.
- b) *Teste*: Erlenmeyer com 49 mL de caldo BHI + 0,5 mL do pré-inóculo + 0,5 mL das células mortas (inativadas termicamente) da cultura indicadora/indutora ou do sobrenadante da cultura, em triplicata.

Após o preparo das amostras nos frascos Erlenmeyer e incubação das mesmas em *shaker* e foi estabelecido o intervalos para retirada das amostras no tempo de 24 h de cultivo e procedeu-se a leitura da contagem de UFC/mL e a determinação das UA/mL de cada um dos frascos.

#### 4.3.9.3 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

Após o tempo de cultivo de 24 h foram realizadas diluições seriadas em solução salina tamponada (PBS) (1:10, p/v). 20 µL de cada diluição foram inoculados sob a forma de um “spot” em duplicata em placas de ágar BHI. As colônias foram contadas após incubação a 37 °C, por 24h. Os resultados foram expressos como o valor médio da contagem viável de *Bacillus* ( $\log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) de duas repetições.

#### 4.3.9.4 Determinação das unidades arbitrárias por mililitro

A atividade antimicrobiana após a indução/ativação foi avaliada utilizando-se como culturas indicadoras *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 e *Bacillus cereus* ATCC 14579 e para o teste com as bactérias lácticas isoladas da puba também foi utilizado *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* como indicador de atividade antifúngica e as medidas de atividades foram realizadas pelo método da diluição seriada, conforme descrito no item 4.4.2.

#### 4.3.10 Purificação de bacteriocinas e lipopeptídeos

Diversos passos e diferentes métodos foram executados para purificação de bacteriocinas e lipopeptídeos. Em cada um deles foi quantificada a atividade antimicrobiana através da titulação do extrato bruto (UA/mL) (conforme item 4.4.4.2). A seguir serão apresentados os métodos de purificação que foram utilizados com sucesso para o isolamento de bacteriocinas e lipopeptídeos.

##### 4.3.10.1 Crescimento da cultura e obtenção do sobrenadante

O micro-organismo produtor foi crescido frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de caldo BHI, pH 7,5. Para a obtenção do sobrenadante foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 15 min. a 4°C. Após, foi realizada a primeira etapa de purificação, obtendo-se a substância parcialmente purificada.

##### 4.3.10.2 Titulação do extrato bruto

Foi utilizado o método da diluição seriada para determinar o número de unidades arbitrárias por mL no sobrenadante bruto. O sobrenadante filtrado em filtros com porosidade de 0,22 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, E.U.A.), foi diluído sucessivamente em placas de microtitulação a partir da proporção 1:1 (v/v) em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%), tendo-se diluições de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e assim sucessivamente. Alíquotas de 20 µL dessas diluições foram inoculadas diretamente na forma de um *spot* na superfície de placas contendo ágar BHI com uma suspensão de 10<sup>8</sup> células/mL (0,5 na escala de Mac Farland) em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) de *Bacillus cereus* ATCC

14579 ou de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. O título designado como UA/mL foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição (KIMURA et al., 1998). Em seguida, a atividade antibacteriana foi calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA/mL) empregando-se a fórmula: “UA = título X 1000  $\mu\text{L}$  X  $v^{-1}$  ( $\mu\text{L}$ )” sendo o “v” o volume do extrato utilizado no ensaio (BATDORJ et al., 2006), que foi de normalmente 20  $\mu\text{L}$ .

#### 4.3.10.3 Técnicas de extração empregadas para a purificação de bacteriocinas e lipopeptídeos

##### 4.3.10.3.1 Extração dos lipopeptídeos e bacteriocinas por precipitação ácida ou por butanol

A extração dos lipopeptídeos no sobrenadante de cultura do *Bacillus* sp. P5 foi realizada por meio de precipitação ácida de acordo com Cooper et al. (1981) e com Nakano, Marahiel, Zuber (1988). As bacteriocinas foram extraídas com butanol de acordo com KAWULKA et al. (2004) e STEIN (2008).

##### 4.3.10.3.1.1 Extração com butanol do sobrenadante da cultura

A cultura bacteriana foi obtida através de inoculação e crescimento em caldo BHI por 24 h a 37 °C (pré-inóculo). Após este tempo, fez-se o inóculo a 1% em caldo BHI e em caldo de Landy e incubou-se por diferentes tempos (6h, 30 h e 36h) a 37 °C.

Decorridos estes três diferentes tempos de cultivo do inóculo, centrifugou-se a cultura a 10.000 g, por 10-15 min. a 4°C. Após, adicionou-se ¼ do volume de n-butanol(Merck) e agitou-se por 1 h com auxílio de um agitador magnético em capela de exaustão química. A mistura foi então transferida para um funil de separação e deixada em temperatura ambiente *overnight*.

Posteriormente, a fase orgânica (superior) foi concentrada em vácuo (liofilizada) obtendo-se um resíduo amarelo, que foi suspenso em metanol (10 mL por litro de cultura) e submetido à cromatografia de fase reversa (coluna C18 acoplada ao HPLC).

#### 4.3.10.3.1.2 Extração ácida de lipopeptídeos do sobrenadante da cultura

Os sobrenadantes obtidos conforme descrito no item anterior foram precipitados através da adição de HCl concentrado até pH 2,0. Centrifugou-se por 30 min. a 10000 X g. Dissolveu-se o precipitado em água destilada, ajustando-se o pH para 7,0 com NaOH. Manteve-se a suspensão a 4°C *overnigh*, então adicionou-se o mesmo volume de diclorometano e deixou-se em repouso por 30 min. à temperatura ambiente, quando realizou-se nova centrifugação 15 min. a 10000 X g. Retirou-se a fase aquosa (superior) e, após a evaporação do diclorometano obteve-se um precipitado branco que foi dissolvido em 0,5 a 1 ml de etanol e foi utilizado para a etapa cromatográfica (COOPER, 1981; NAKANO; MARAHIEL; ZUBER, 1988).

#### 4.3.10.3.1.3 Extração dos lipopeptídeos com butanol da matriz alimentar Puba (Lote E)

Foram utilizadas duas formas de extração:

- a) 20g de massa de puba foram diluídas em 40 mL de água destilada e misturadas com ¼ de butanol deixando-se em agitação *overnigh*. Após este período, o líquido da porção superior foi separado.
- b) 20g de massa de puba foram diluídas em 40 mL de butanol e deixados em agitação por 6-8h. A fase superior foi separada como descrito no item a. Ambas as amostras foram liofilizadas.

#### 4.3.10.3.2 Cromatografia de fase reversa

Os extratos butanólicos e aqueles obtidos por precipitação ácida foram submetidos à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Shimadzu, modelo Prominace, Detector UV: SPD-20A - UV/VIS, injetor: SIL-20A Prominace Auto sampler). As colunas utilizadas foram Shim-Pack CLC-ODS (M) PN22817873-92 C18, 100-Å *pore size*, 5 µm *particle size column*; Shimadzu e Sephasil™ Peptide C18 5 µm ST 4.6/250 C18, 100-Å *pore size*, 5 µm *particle size column*; Amersham Pharmacia Biotech.

Nas corridas designadas como de número 1, 2, 7, 13 e 14, as colunas foram equilibradas com a seguinte condição de eluição: de 0-10 min.: fase móvel A (ácido trifluoroacético - TFA 0,05 %v/v em água MiliQ), 10- 40 min: gradiente de 0 - 100 % de fase móvel B (100 % de

acetonitrila - CH<sub>3</sub>CN) e de 40-50 min: apenas fase móvel B. Nas corridas 4, 5, 6, 8, 9, 10 e 12 a condição de eluição utilizada para equilibrar as colunas foi de 0-10 min: fase móvel A (TFA 0,05% ) acrescido de CH<sub>3</sub>CN 100% (8:2 v/v), 10-40 min. utilizou-se um gradiente de 20% a 100 % da fase móvel B (CH<sub>3</sub>CN 100%) para a separação dos lipopeptídeos e de 40-50 min. foi usada apenas a fase móvel B (100 % CH<sub>3</sub>CN). Uma taxa de fluxo de 1 mL/min. foi utilizada em todas as corridas. As frações eluídas das colunas foram monitoradas a 220 e 280 nm.

Todas as frações (1 mL) foram coletadas, liofilizadas e suspensas em 50 µL de água ultra pura (mili-Q) para realização do teste de atividade antimicrobiana. As frações que demonstraram atividade contra *B. cereus* ATCC 14579 e/ou contra *L.monocytogenes* ATCC 7644 foram selecionadas e submetidas a espectrometria de massas. Todos os solventes de HPLC foram preparados diariamente e filtrados sob vácuo antes do uso. Todas as soluções aquosas utilizadas foram preparadas com água ultra pura.

#### 4.3.10.3.3 Preparo das amostras de puba para espectrometria de massas

Os extratos butanólicos obtidos da matriz de puba foram suspensos em água ultra-pura e submetidos a microcromatografia de fase reversa utilizando-se “ponteiras” Zip Tip® *pipette tips* C18 (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Cada “ponteira” Zip Tip® foi equilibrada com 10µL de ACN 100%, seguida de 10µL CH<sub>3</sub>CN 50% /TFA 0,1% e, então, duas vezes com 10µL de TFA 0,1%. Após o equilíbrio, a solução contendo os lipopeptídeos extraídos da puba foi pipetada de 5 a 10 vezes e o líquido foi descartado. A “ponteira” Zip Tip® foi lavada três vezes com 10µL de TFA 0,1% e, logo após, a amostra foi eluída com 5µL de uma solução de CH<sub>3</sub>CN 60%/TFA 0,1%. Os eluatos foram analisados por espectrometria de massas.

##### 4.3.10.3.2.1 Análise dos eluatos por espectrometria de massas MALDI-TOF

Os eluatos que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 e/ou contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, bem como aqueles eluatos obtidos diretamente do extrato butanólico de puba, foram submetidos à espectrometria de massas utilizando-se um espectrômetro de massas com Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de voo (MALDI-TOF, Mass Spectrometer Autoflex III; Bruker Daltonics,

Inc) instalado no Núcleo de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG.

Para a determinação de massa molecular foram aplicados na superfície da placa de MALDI (MTP AnchorChips 384x600) 1µL da amostra a ser analisada acrescida de 1µL da matriz orgânica ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico ou 1µL da matriz ácido 2-5 dihidroxibenzóico (DHB, Fluka). A cristalização da mistura foi feita à temperatura ambiente. O MALDI-TOF foi operado no modo refletido positivo, usando o software Flex Control 3.3 (Brucker Daltonics, Inc.). A calibração externa foi feita utilizando-se a mistura de peptídeos da *Brucker Peptide Calibration Standard II* (Brucker Daltonics, Inc.). Uma vez obtidos os valores de massa correspondentes a cada lipopeptídeo presente nas amostras, estes foram submetidos à fragmentação MS/MS, quando possível, e/ou comparados a fragmentação dos padrões de iturina (Iturin A obtida de *Bacillus subtilis*, ≥95% (HPLC) e de surfactina (Surfactina obtida de *Bacillus subtilis*, ≥98% (HPLC and TLC)S3523 (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

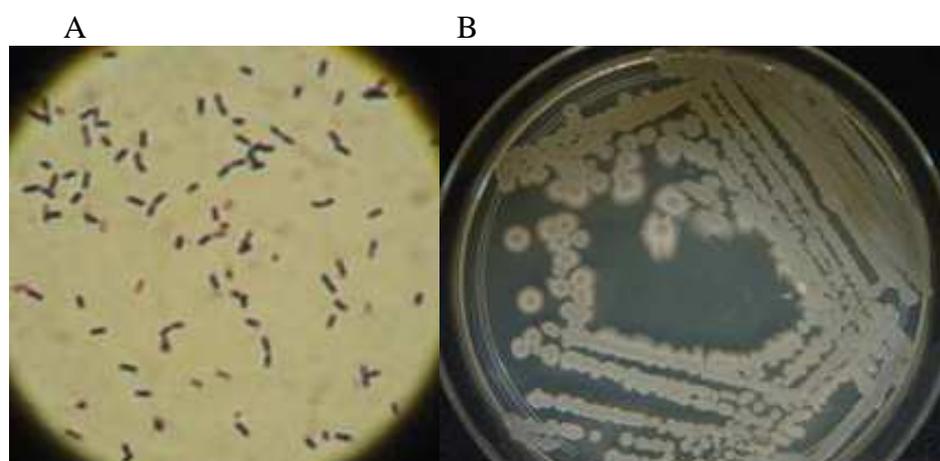
Todos os testes foram realizados, no mínimo, com duas repetições e os resultados das atividades antibacterianas quando o micro-organismo produtor foi co-cultivado com células mortas (inativadas) de outros microrganismos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para comparação de médias, em um intervalo de confiança de 95%

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE *Bacillus* sp. ISOLADOS DE PUBA

#### 5.1.1 Caracterização bioquímica e fisiológica

Foram enumeradas todas as colônias, crescidas na superfície do Agar MPY, que apresentaram características comuns como a coloração rosa (manitol negativo) rodeadas por um halo opaco (lecitinase positiva). Os resultados obtidos na quantificação foram  $10^3$  UFC/g e  $5 \times 10^2$  UFC/g, para as amostras de puba obtidas dos lotes D e E, respectivamente. Uma colônia de cada uma das amostras de puba foi selecionada e repicada para ágar Nutriente. Após a obtenção de cultura pura, identificou-se presuntivamente como sendo *Bacillus* sp., as colônias que apresentaram morfologia celular típica de bacilos Gram positivos isolados e em cadeias (Fig. 7) e cujo teste da catalase foi positivo. Os isolados dos lotes D e E foram denominados de *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5, respectivamente. Os resultados dos demais testes bioquímicos e fisiológicos estão mostrados na tabela 4.



**Figura 7.** (A) Coloração de Gram de *Bacillus* sp. P5 isolado de puba. (B) Aspecto da colônia de *Bacillus* sp. P5 em Ágar Nutriente (37°C – 24h).

**Tabela 4.** Testes bioquímicos e fisiológicos dos isolados C3 e P5 recuperados dos lotes de puba D e E.

Isolado	Ferm Glic.	Motil.	Redução Nitrito	Resist. Lisoz.	V.P .	Hemólise	Cresc. Rizoid.	Catalase	Cristais de toxina
(C3)	+	+	+	-	-	+	-	+	-
(P5)	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Os isolados C3, P5 e o *B. cereus* fermentaram a glicose em condições de anaerobiose, demonstrado pela viragem da cor do meio de vermelho para o amarelo, apresentaram motilidade positiva, hemólise do tipo beta em agar sangue e reduziram o nitrato a nitrito. Entretanto, apenas o isolado C3 teve os testes negativos de VP e resistência a lisozima. Não foi observado o crescimento rizóide, com estruturas semelhantes a fios de cabelos ou raízes a partir do ponto de inóculo, que é característico de *B. mycoides*. Esta prova diferencia *B. cereus* de *B. mycoides* (BAM, 2012). As duas amostras não produziram de cristais de toxina, cuja detecção ocorre em *B. thuringiensis* (BAM, 2012). Adicionalmente, utilizaram-se kits API 20CHB e 20E, cujos resultados são mostrados nas Tabelas 5 e 6. A análise destes resultados, pelo *software* APILAB Plus, identificou o isolado C3 como *Bacillus cereus* 1/*thuringiensis*, com o índice de identificação (ID) de 99,1% e o valor de 0,56 de fiabilidade de identificação (T). O isolado P5 foi identificado como *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* com valores de 99,8% ID e 0,59 T.

**Tabela 5.** Resultados dos testes bioquímicos obtidos através do sistema API 50 CHB.

N <sup>o</sup>	Teste	<i>B. sp.</i> C3	<i>B. sp.</i> P5	N <sup>o</sup>	Teste	<i>B. sp.</i> C3	<i>B. sp.</i> P5
0	Controle	-	-	25	ESculina	+	+
1	GLIcerol	+	-	26	SALicina	-	+
2	ERitritol	-	-	27	D-CELOBiose	+	-
3	D-ARAbinose	-	-	28	D-MALtose	+	-
4	L-ARAbinose	-	+	29	D-LACtose	-	-
5	D-RIBose	+	+	30	D-MELobiose	-	-
6	D-XILOse	-	+	31	D-SACarose	+	-
7	L-XILOse	-	-	32	D-TREalose	+	+
8	D-ADOnitol	-	-	33	INULina	-	-
9	Metil-βD-Xilopiranosido	-	-	34	D-MeLeZitose	-	-
10	D-GALactose	-	-	35	D-RAFinose	-	+
11	D-GLUCose	+	+	36	AmiDo	+	-
12	D-FRUtose	+	+	37	GLIcoGênio	+	-
13	D-MaNosE	-	+	38	XiLiTol	-	-
14	L-SorBosE	-	-	39	GENtiobiose	-	-
15	L-RAMnose	-	-	40	D-TURanose	-	-
16	DULcitol	-	-	41	D-LIXose	-	-
17	INOsitol	-	+	42	D-TAGatose	-	-
18	D-MANitol	-	+	43	D-FUCose	-	-
19	D-SORbitol	-	+	44	L-FUCcose	-	-
20	Metil-α-D-manopiranosido	+	-	45	D-ARabitol	-	-
21	Metil-α-D-glucopiranosido	+	+	46	L-Arabitol	-	-
22	N-AcetilGlucosamina	+	-	47	GlucNaTo de potássio	-	-
23	AMigdalina	-	+	48	2-Ceto-gluconato de potássio	-	-
24	ARButina	+	-	49	5-Ceto-gluconato de potássio	-	-

+, positivo (cor amarela); -, negativo (cor vermelha); D, duvidoso (cor laranja).

**Tabela 6.** Resultados dos testes bioquímicos obtidos através do sistema 20E.

N <sup>o</sup>	Teste	<i>B. sp.</i> C3	<i>B. sp.</i> P5	N <sup>o</sup>	Teste	<i>B. sp.</i> C3	<i>B. sp.</i> P5
1	β-galactosidase(Orto Nitrofenil-βD-Galactopiranosidase)	-	+	7	UREase	-	-
2	Arginina DiHidrolase	+	-	8	Triptofano DesAminase	-	-
3	Lisina DesCarboxilase	-	-	9	Produção de INDol	-	+
4	Ornitina DesCarboxilase	-	+	10	Produção de acetoína (Voges Proskauer)	-	+
5	Utilização do CITrato	+	-	11	Gelatinase (GELatina)	+	-
6	Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	12	Fermentação/Oxidação (GLUcose)	-	-

### 5.1.2 Análise quimiotaxonômica

Os isolados de *Bacillus* C3 e P5 foram submetidos a testes quimiotaxonômicos utilizando a metodologia de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos - Fatty Acid Metil Ester (FAME), através do sistema MIDI Sherlock Microbial Identification System. A composição FAME celular dos isolados foi determinada por cromatografia em fase gasosa. O principal ácido graxo apresentado por *Bacillus* sp. C3 foi iso-C15: 0 e iso-C17: 0, enquanto que para o *Bacillus* sp. P5 foi anteiso-C15: 0; iso-C15: 0, iso-C17: 0 e anteiso-C17:0 (Tabela 7). É importante notar que apenas o isolado C3 mostra os ácidos graxos 12:00 e 13:00, enquanto o ácido graxo 17:01 anteiso A foi detectada exclusivamente no isolado P5.

**Tabela 7.** Perfis de ácidos graxos de *Bacillus* sp. C3 e P5 determinado por análise FAME-MIDI.

Ácido graxo	Composição celular de ácidos graxos (%)		
	C3 (SI) <sup>b</sup> <b>0.675</b>	P5 <sup>a</sup> (SI) <b>0.452</b>	P5 <sup>a</sup> (SI) <b>0.463</b>
12:0	0.19	- <sup>c</sup>	-
13:0 iso	5.97	-	-
13:0 anteiso	1.01	-	-
14:0 iso	5.42	0.73	0.65
14:0	3.33	0.66	0.68
15:0 iso	29.74	21.31	19.98
15:0 anteiso	5.34	40.90	41.25
15:1 ω5c	0.45	-	-
16:1 ω7c alcohol	0.77	-	0.38
Sum in feature 2	4.72	-	-
16:0 iso	7.58	1.89	2.07
16:1 ω11c	0.16	2.36	2.61
15:0 2OH	0.37	-	-
Sum in feature 3	9.52	-	-
16:0	4.35	5.84	6.14
17:1 iso ω10c	1.43	2.11	2.11
Sum in feature 4	-	1.28	1.37
17:1 iso ω5c	4.8	-	-
17:1 anteiso A	1.35	-	-
17:0 iso	10.25	10.04	9.78
17:0 anteiso	1.78	11.99	12.66
17:1 ω7c	0.25	-	-
17:0	0.28	-	0.32
18:0 iso	0.24	-	-
18:3 ω6c (6,9,12)	-	0.88	-
18:1 ω9c	0.15	-	-
18:0	0.40	-	-

<sup>a</sup>Perfil de ácidos graxos do mesmo isolado a partir de análises independentes

<sup>b</sup>(SI), o índice de similaridade > 0.5 (numa escala de 0-1) foi considerado como uma identificação aceitável

<sup>c</sup>(-) não detectado

Soma na característica 2

Soma na característica 3

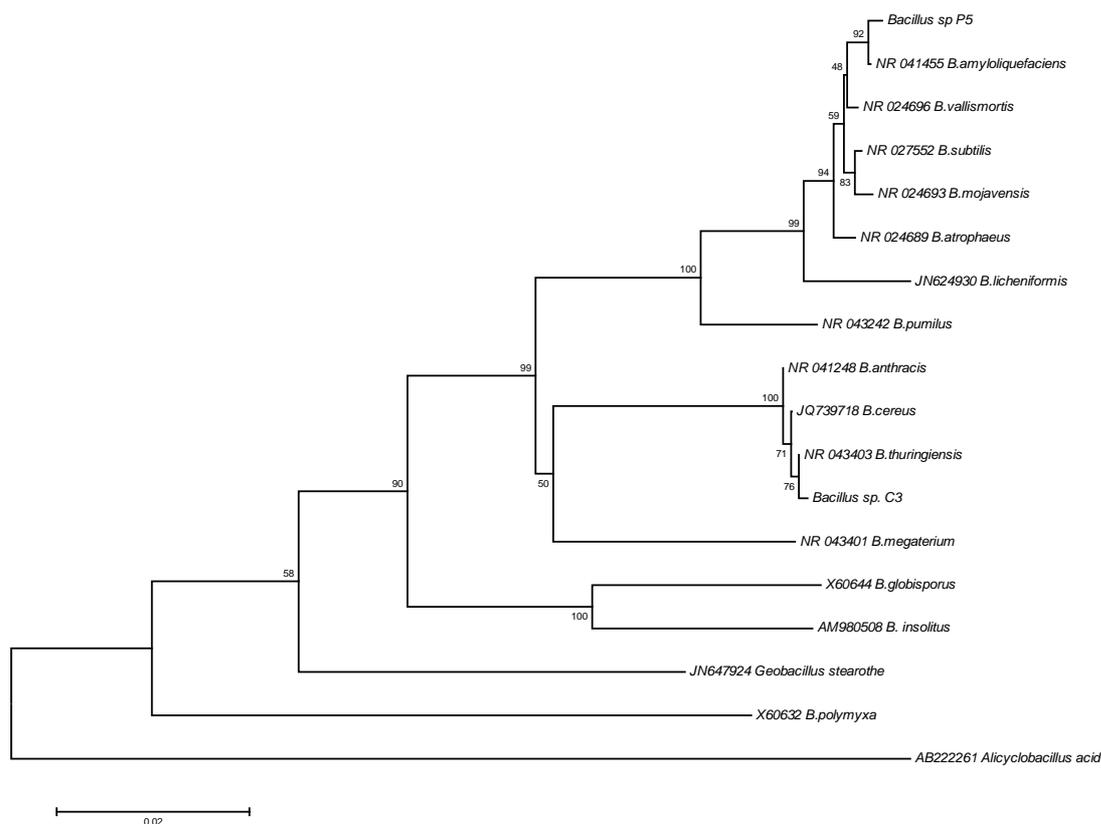
Soma na característica 4

Baseado no perfil FAME de *Bacillus* sp. C3 os valores do índice de similaridade (SI) de 0,675 e 0,563 foram calculados e a identificação segundo a biblioteca ITSA1 foi de *Bacillus thuringiensis* GC subgrupo A e *Bacillus cereus* GC subgrupo A, respectivamente. De acordo com o critério estabelecido pelo sistema MIDI quando SI é maior do que 0,5 e separado dos outros organismos na biblioteca pelo menos 0.100 este isolado é considerado identificado, neste caso, como *B. thuringiensis*. Enquanto que para *Bacillus* sp. P5 o valor de SI foi de 0,452 para *Bacillus subtilis* GC subgrupo A e 0,407 para *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Quando o teste foi repetido, os valores de SI foram 0,463 para *B. subtilis* subsp. *spizizenii* e 0,458 a *B. subtilis* GC subgrupo A. Neste caso, os valores de SI foram inferiores a 0,5 e a este isolado não pode ser atribuída confiabilidade ao nível de espécies por análise quimiotaxonômica utilizando FAME-MIDI.

### 5.1.3 Análise filogenética

A reconstrução filogenética de sequências de rDNA 16S é mostrada no dendograma filogenético na Figura 8. A matriz de dados foi construída com um total de 1301 pb de cada sequência avaliada. A inferência filogenética revelou que a linhagem *Bacillus* sp. P5 foi recuperada em um ramo com 92% de suporte juntamente com a espécie *B. amyloliquefaciens*, enquanto o isolado denominado como *Bacillus* sp. C3 mostrou-se intimamente relacionado com o grupo formado pelas espécies *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*, evidenciando uma maior similaridade (76%) com a espécie *B. thuringiensis*.

As seqüências de rDNA 16s obtidas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso JX456531 para *Bacillus* sp. C3 e JX456530 para *Bacillus* sp. P5.



**Figura8.** Análises filogenéticas baseadas em seqüências do gene rRNA 16S de *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5 utilizando o método de Neighbor-joining (1000 repetições de *Bootstrap*).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 5.2.1 Espectro de ação

O sobrenadante bruto da cultura de *Bacillus* sp. P5 foi testado para a presença de atividade antimicrobiana contra diversos micro-organismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e uma levedura. A tabela 8 mostra os halos de inibição obtidos ao serem aplicados 20  $\mu$ L do sobrenadante diretamente sobre placas previamente inoculadas com o microrganismo indicador. Foi observada atividade inibitória contra diversas bactérias incluindo importantes patógenos e deteriorantes como linhagens de *B. cereus*, várias linhagens de *L. monocytogenes* e isolados clínicos de *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* além de fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e a levedura *Candida* sp.

**Tabela 8.** Espectro de ação do sobrenadante bruto contra micro-organismos indicadores da atividade antimicrobiana.

Micro-organismo indicador	Fonte	Meio de cultura	Temperatura de incubação	Halo de inibição (mm) † <i>Bacillus</i> sp. C3	Halo de inibição (mm) † <i>Bacillus</i> sp. P5
<b>Gram-positivos</b>					
<i>B. amyloliquefaciens</i>	LBM 5006	BHI	37 °C	NE	6±0,6
<i>B. amyloliquefaciens</i>	ATCC 23350	BHI	37 °C	-	11±0,5
<i>B. cereus</i>	ATCC 14579	BHI	37 °C	12±0,4*	14±0,5
<i>B. cereus</i> A-1	Puba	BHI	37 °C	-	11±0,1*
<i>B. cereus</i> B-2	Puba	BHI	37 °C	-	10±0,8
<i>B. cereus</i> C-3	Puba	BHI	37 °C	10±0,5*	12±0,5
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	BHI	37 °C	-	10±0,6
<i>B. subtilis</i>	DSM 3258	BHI	37 °C	-	13±0,7
<i>B. subtilis</i>	ATCC 21228	BHI	37 °C	-	13±0,1
<i>B. subtilis</i>	ATCC 7971	BHI	37 °C	-	11±0,2*
<i>B. subtilis</i>	Alimento	BHI	37 °C	NE	6±0,4
<i>Corynebacterium fimi</i>	NTCS 7547	BHI	37 °C	-	10±0,5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	MRS	35 °C	NE	2±0,0
<i>Lactobacillus casei</i>	Alimento	MRS	35 °C	NE	-
<i>Lactobacillus delbruecki</i> subs. <i>Lactis</i>	ATCC 7830	MRS	35 °C	NE	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC 9338	MRS	35 °C	-	-
<i>Lactobacillus murinus</i> L2	Camundongo	MRS	35 °C	NE	5±0,3
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Alimento	MRS	35 °C	NE	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 6477	BHI	37 °C	-	12±0,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15113	BHI	37 °C	-	11±0,2
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112	BHI	37 °C	-	9±0,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	BHI	37 °C	-	8±0,2
<i>Listeria innocua</i>	Alimento	BHI	37 °C	NE	11±0,5
<i>Listeria seeligeri</i>	AC 82/4	BHI	37 °C	NE	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	BHI	37 °C	-	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Clínico	BHI	37 °C	NE	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Clínico	BHI	37 °C	NE	15±1,5
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Clínico	BHI	37 °C	NE	14±1,0
<i>Streptococcus</i> sp.	Clínico	BHI	37 °C	NE	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Clínico	BHI	37 °C	NE	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Alimento	MRS	35 °C	-	-
<b>Gram-negativos</b>					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Alimento	BHI	37 °C	NE	8±0,8
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	BHI	37 °C	-	-
<i>Pseudomonas aruginosa</i>	Clínico	BHI	37 °C	NE	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Alimento	BHI	37 °C	NE	-
<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	ATCC 13076	BHI	37 °C	-	-
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	ATCC 13311	BHI	37 °C	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	Alimento	BHI	37 °C	NE	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	BHI	37 °C	NE	-
<b>Fungos filamentosos e levedura</b>					
<i>Aspergillus flavus</i>	Alimento	BDA	30 °C	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	5B1 - Alimento			-	7±0,5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ambiental	BDA	30 °C	-	7,3±0,7
<i>Aspergillus Níger</i>	Alimento	BDA	30 °C	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Ambiental	BDA	30 °C	-	80±0,5

<i>Candida tropicalis</i>	Clínico	BDA	30 °C	-	10±1,0
---------------------------	---------	-----	-------	---	--------

<sup>†</sup> Diâmetro do halo; \* Halos com inibição parcial; - sem inibição; + diminuição da esporulação. NE não executado.

### 5.2.1.1 Atividade antibacteriana em diferentes condições

As análises de atividade antibacteriana revelaram que a melhor condição de inibição dos micro-organismos indicadores utilizados foi do cultivo de *Bacillus* sp. P5 em pré-inóculo a 37°C e inóculo a 42°C em caldo BHI, ocorrendo inibição de 14 das 20 espécies de bactérias testadas, com halos que variaram de 8 a 14 mm, sendo os micro-organismos inibidos os seguintes: *Bacillus cereus* ATCC 14579; *B. cereus* A-1 (isolado de alimento - puba), *B. cereus* B-2 (isolado de alimento - puba), *B. cereus* C-3 (isolado de alimento - puba), *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* DSM 3258, *B. subtilis* ATCC 21228, *B. subtilis* ATCC 7971, *Corynebacterium fimi* NTCS 7547, *L. monocytogenes* 6477, *L. monocytogenes* 15113, *L. monocytogenes* 19112, *L. monocytogenes* 19115. Na melhor condição de cultivo não houve inibição de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ATCC 13076, *S. enterica* ser. Typhimurium ATCC 13311 e *Weissella paramesenteroides* (isolado de alimento).

Além disso, a mesma condição de incubação descrita acima, mudando-se apenas o meio de cultura para TSB foi a segunda melhor condição para *Bacillus* sp. P5 inibir micro-organismos como *B. subtilis* ATCC – 21228, *B. subtilis* DSM 3258, *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 e *B. cereus* ATCC 14579. Para o *Bacillus* sp. C3 a melhor condição de inibição foi o meio TSB com pré-inóculo a 30°C/24h e inóculo a 30°C/24h igualmente, inibindo apenas um micro-organismo: *Bacillus cereus* ATCC 14579. Na condição de pré-inóculo a 30°C/24 h e inóculo a 42°C/24 h no meio TSB houve inibição apenas *B. cereus* (D-4).

### 5.2.1.2 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica mostrou que *Bacillus* sp. P5 foi mais ativo contra *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* produzindo halos que variaram de 62 a 80 mm quando a bactéria crescida em caldo BHI foi inoculada sob a forma de um *spot* no Ágar BDA já com o fungo filamentoso inoculado. Já para *Bacillus* sp. C3 os halos contra este micro-organismo indicador variaram de 50 a 53 mm. Quando os sobrenadantes foram testados os valores de halos ficaram em torno de 80 mm, mas apenas para *Bacillus* sp. P5, sendo que o sobrenadante de *Bacillus*

sp. C3 não apresentou inibição no crescimento desta espécie de fungo. Já os sobrenadantes liofilizados, de ambas as espécies, apenas diminuíram a esporulação em ambos os casos.

Para o teste com *Aspergillus fumigatus* foram encontrados halos que variaram de 8 a 18 mm, quando uma alíquota de 20 µL do crescimento bacteriano de *Bacillus* sp. P5 foi aplicada diretamente na superfície do Agar BDA (Ágar Batata Dextrose), já inoculado com a espécie de fungo (Tabela 9). Para *Bacillus* sp. C3 este valor foi de 6,6 a 8 mm. Para o sobrenadante tanto liofilizado quanto não liofilizado de *Bacillus* sp. P5 os valores de halos encontrados foram de 8 a 5 mm, enquanto que para *Bacillus* sp. C3 não houve inibição do crescimento do fungo.

Para os ensaios com *Aspergillus flavus*, *Candida tropicalis* e *Aspergillus niger* a presença de halos maiores ocorreu sempre para *Bacillus* sp. P5, com valores que foram de 6,6 a 10 mm para *Aspergillus flavus*, de 14 a 16 mm para *Candida* sp. e de 3 mm para *Aspergillus niger* quando a houve a inoculação de células no meio de cultura (Tabela 9 e Figura 9). Para os ensaios com sobrenadantes testados contra estas espécies indicadoras de fungos houve a presença de halos de 10 mm para *Candida* sp. não apresentando resultados significativos para as outras duas espécies, muitas vezes apenas reduzindo a esporulação.

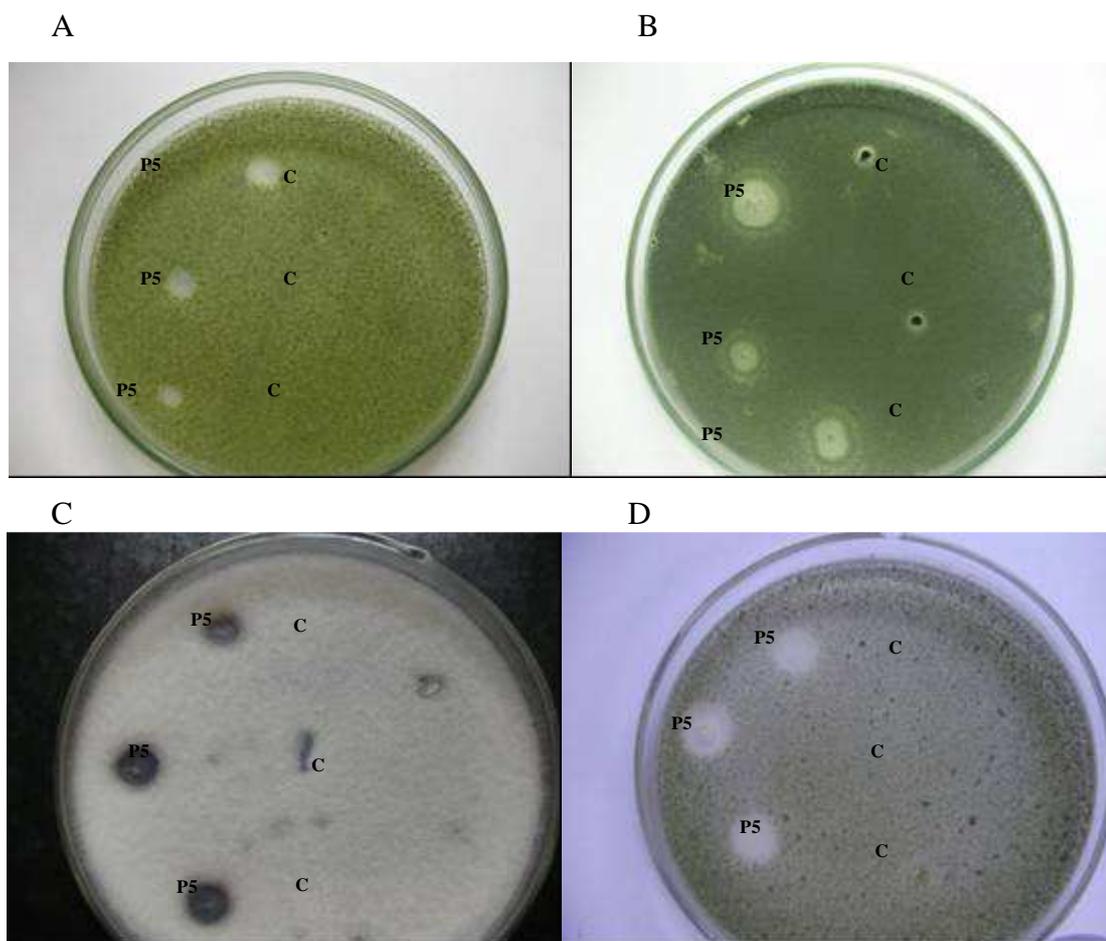
**Tabela 9.** Média comparativa dos halos das triplicatas do teste de atividade antifúngica realizada para *Bacillus* sp. P5 diretamente com as células bacterianas e apenas com o sobrenadante da cultura.

Fungo/Levedura	Médias dos halos teste bactéria* (mm)	Médias dos halos teste sobrenadante** (mm)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	72±8,0	80±0,5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13±5,0	7,3±0,7
<i>Aspergillus flavus</i>	8,3±1,7	+
<i>Aspergillus niger</i>	3±0,6	+
<i>Candida tropicalis</i>	15±1,0	10±1,0

\* A bactéria cultivada em caldo BHI foi inoculada sob a forma de um *spot* no ágar BDA já com este fungo filamentoso inoculado.

\*\* O sobrenadante filtrado da bactéria cultivada em caldo BHI, após centrifugação foi inoculado sob a forma de um *spot* no ágar BDA, já com este fungo filamentoso inoculado.

+ Houve apenas a redução da esporulação.



**Figura 9.** Atividades antifúngicas de *Bacillus* spp. inoculados diretamente sobre a superfície do Ágar BDA contendo o fungo filamentosos indicador. Em (A) atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, em (B) Atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*, em (C) Atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersic* em (D) contra *Aspergillus flavus* 5B1. Todas as placas mostram três inoculações de *Bacillus* sp. P5 no lado esquerdo da foto e de *Bacillus* sp. C3 no lado direito.

## 5.2.2 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes

### 5.2.2.1 Verificação da atividade biossurfactante em placas de Ágar sangue

A inoculação de placas de ágar sangue com *Bacillus* sp. C3 e P5 resultou em halos de hemólise em torno de cada colônia. A lise dos eritrócitos foi relacionada com a produção de compostos ativos de superfícies por *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5.

### 5.2.2.2 Índice de emulsificação ( $E_{24}$ )

A avaliação do índice de emulsificação (COOPER; GOLDENBERGER, 1987) foi realizada na presença das células microbianas e com o sobrenadante para os três meios de cultura descritos (Tabela 10).

Os resultados mostraram que *Bacillus* sp. C3 crescido em meio BHI apresentou índice de emulsificação no sobrenadante de 39% para óleo mineral enquanto que para os outros compostos hidrofóbicos não houve emulsificação. Apenas quando foi testado o sobrenadante do mesmo bacilo crescido em meio de Landy com glutamato que houve uma pequena emulsificação de 4% para tolueno.

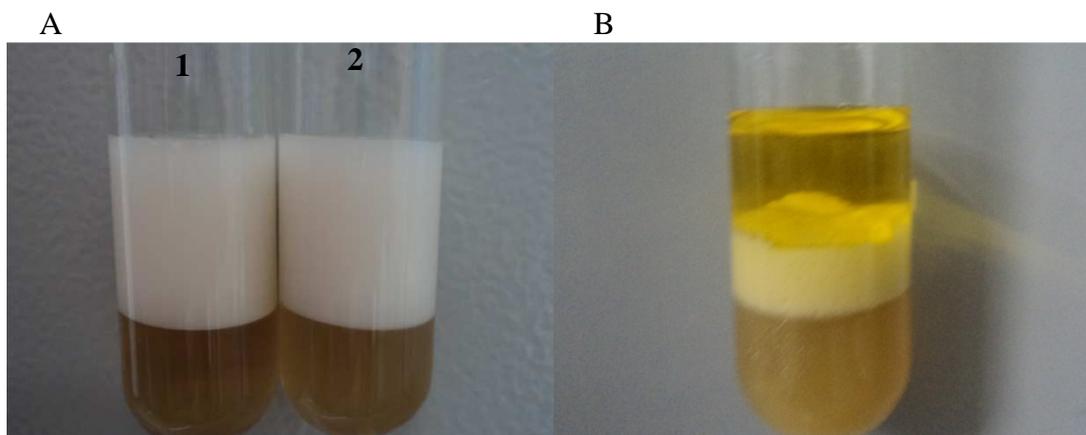
Os resultados demonstraram que *Bacillus* sp. P5 apresentou índice de emulsificação no sobrenadante após crescimento em meio BHI de 59% para tolueno. Para o óleo mineral este índice ( $E_{24}$ ) foi de 42%, índices estes, considerados elevados pela literatura (Figura 10A). Para biodiesel de soja o índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) foi de 24% para o sobrenadante resultante do crescimento em meio BHI (Fig 10B), enquanto que para xileno não foi detectada emulsificação.

Para os sobrenadantes após crescimento em meio de Landy suplementado com glutamato igualmente para *Bacillus* sp. P5 houve emulsificação para xileno com índice de 60%. E para o teste com biodiesel de soja tanto os sobrenadantes dos cultivos em meio de Landy com glutamato quanto com arginina apresentaram emulsificação de 1% (Tabela 10).

**Tabela 10.** Avaliação da produção de biossurfactantes em sobrenadantes de cultura de *Bacillus* sp. C3 e de *Bacillus* sp. C5 por meio da medida do índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) onde foram empregados compostos hidrofóbicos como fase orgânica.

Compostos hidrofóbicos	$E_{24}$ (%)			
	Tolueno	Xileno	Óleo Mineral	Biodiesel de Soja
Sobrenadante BHI de <i>Bacillus</i> sp. C3	SE	SE	39±0,5	SE
Sobrenadante Landy com glutamato de <i>Bacillus</i> sp. C3	4±0,2	SE	SE	SE
Sobrenadante Landy com arginina de <i>Bacillus</i> sp. C3	SE	SE	SE	SE
Sobrenadante BHI de <i>Bacillus</i> sp. P5	59±0,5	SE	42±0,5	24±0,0
Sobrenadante Landy com glutamato de <i>Bacillus</i> sp. P5	SE	60±0,2	SE	1±0,5
Sobrenadante Landy com arginina de <i>Bacillus</i> sp. P5	SE	SE	SE	1±0,5

SE: sem emulsificação.



**Figura10.** Índice de emulsificação. Emulsão obtida com sobrenadante ( $E_{24}$  de 59 %) (A1) e cultura ( $E_{24}$  de 57 %, dados não mostrados) (A2) de *Bacillus* sp. P5 e tendo o tolueno como fase orgânica. Emulsão ( $E_{24}$  de 24 %) (B) de *Bacillus* sp. P5 e tendo o biodiesel de soja como fase orgânica.

### 5.2.2.3 Medição da tensão superficial

Neste ensaio foi observada a redução da tensão superficial do meio de cultura BHI de  $48,4 \pm 2,4 \text{ mN m}^{-1}$  (meio de cultura não inoculado) para  $45,1 \pm 2,7 \text{ mN m}^{-1}$  no sobrenadante após crescimento de *Bacillus* sp. C3 e para  $29,2 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$  no sobrenadante após crescimento de *Bacillus* sp. P5, sugerindo a produção de compostos tensoativos pelas bactérias, especialmente por *Bacillus* sp. P5.

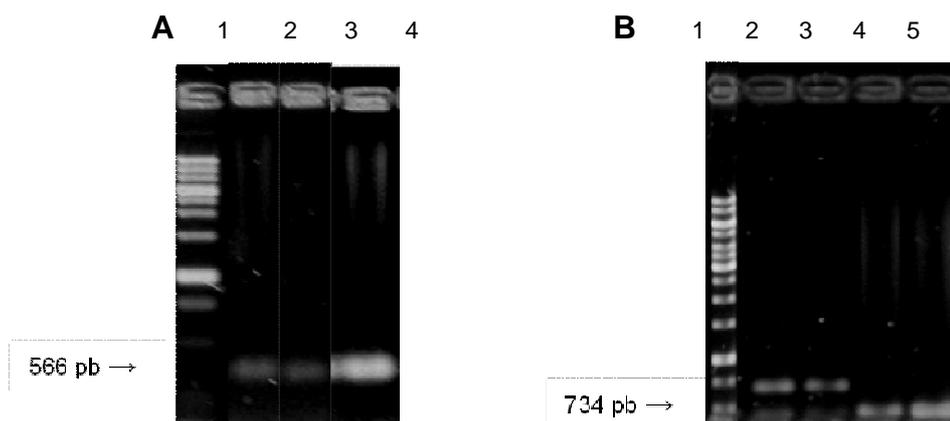
Quando foi utilizado o meio de cultura de Landy suplementado com arginina houve redução de  $65,40 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$  (meio de cultura não inoculado) para  $56,95 \pm 0,9 \text{ mN m}^{-1}$  para *Bacillus* sp. C3 e de  $29,06 \pm 0,4 \text{ mN m}^{-1}$  para *Bacillus* sp. P5, conferindo, mais um vez, destaque para *Bacillus* sp. P5 em detrimento de *Bacillus* sp. C3. E, por fim, quando utilizou-se o meio de cultura de Landy com glutamato não ocorreram reduções significativas na medição da tensão superficial apresentando  $55,32 \pm 0,1 \text{ mN m}^{-1}$  o meio de cultura com crescimento de *Bacillus* sp. C3 e  $52,60 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$  o meio de cultura com crescimento de *Bacillus* sp., sendo que o valor anterior do meio de cultura não inoculado era de  $64,93 \pm 0,1 \text{ mN m}^{-1}$ .

Utilizou-se como padrões água destilada ( $72 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$ ) e etanol ( $24 \pm 0,5 \text{ mN m}^{-1}$ ).

### 5.2.3 Pesquisa de genes de surfactina, iturina A, subtilosina A e subtilina

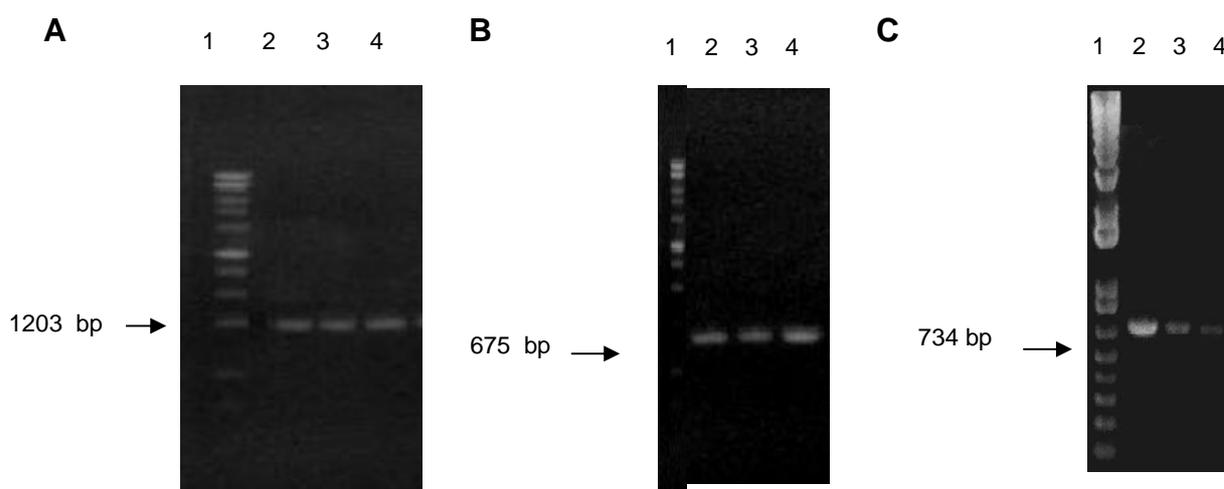
*Bacillus* sp. C3 mostrou um fragmento de 566 pb correspondente ao gene *spaS* (subtilina) e um fragmento de 734 pb correspondente ao suposto gene *sboA* (subtilosina A).

Os fragmentos foram sequenciados e mostraram uma elevada homologia (pelo menos 98% de identidade para *spaS* e, pelo menos, 93% de identidade com *sboA*), com o suposto gene terminador da transcrição (Figura 11). No entanto, os supostos genes *sfp* (surfactina) e *ituD* (iturina A) não foram amplificados por PCR em *Bacillus* sp. C3.



**Figura 11.** Perfil dos produtos de PCR de subtilina - *spaS* (A) e de subtilosina A - *sboA* (B). Em A: 1, Peso Molecular (1kpb); 2, *Bacillus* sp. C3; 3, *Bacillus subtilis* DSM 3258; 4, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e em B: Peso Molecular (1kpb); 2 e 3, *Bacillus* sp. C3; 4, *Bacillus subtilis* DSM 3258; 5, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Avaliações por PCR mostraram que *Bacillus* sp. P5 exibiu um fragmento de 675 pb, potencial para o gene *sfp* (surfactina). O fragmento foi sequenciado e análises demonstraram uma elevada homologia (identidade mínima de 98%) com o suposto gene terminador transcricional. Além disso, também foram encontrados fragmentos de 1203 pb, potencial para o gene *ituD* (iturina A) e de 734 pb potencial para o gene *sboA* (subtilosina A) (Figura 12). Os fragmentos foram seqüenciados e análises demonstraram uma elevada homologia (identidade mínima de 98% para *sboA* e 99% para *ituD*), com o suposto gene terminador transcricional, o que indica grande potencial para estudo e produção/aplicação desta substância. Para *Bacillus* sp. P5 não foi encontrado o suposto gene para subtilina (*spaS*).



**Figura 12.** Perfil dos produtos de PCR de (A) iturina D - *ituD*, (B) surfactina - *sfp* e (C) subtilosina A - *sboA*. 1, Peso Molecular; 2, *Bacillus* sp. P5; 3, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 4, *Bacillus subtilis* DSM 3258.

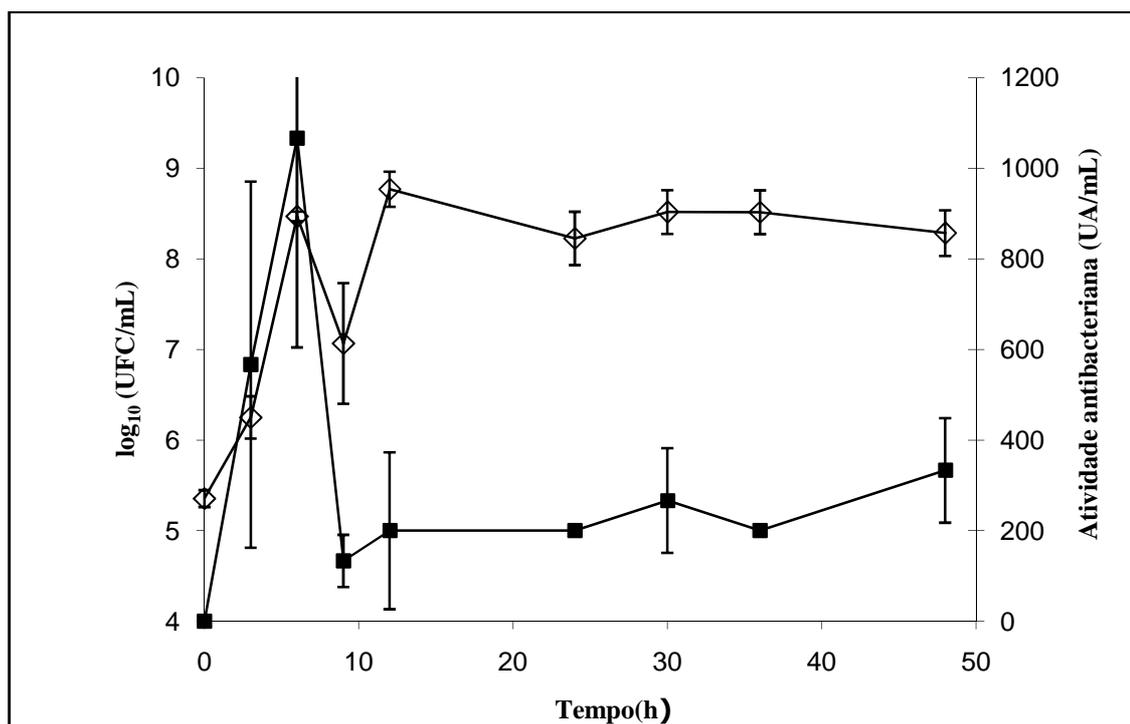
Tendo em vista estes resultados, escolheu-se o *Bacillus* sp. P5 para prosseguir com os demais testes propostos em detrimento do *Bacillus* sp. C3, pois o primeiro apresentou inibição contra 62,2% (28 de um total de 45) dos micro-organismos enquanto *Bacillus* sp. C3 inibiu apenas 15,3% (4) dos micro-organismos e somente com halos parciais/“nublados”.

#### 5.2.4 Curva de crescimento e produção de substâncias tensoativas e antimicrobianas

A curva de crescimento de *Bacillus* sp. P5 mostra os resultados da determinação de UFC/mL, atividades antibacteriana e antifúngica e de biosurfactantes e determinação do pH, sendo o acompanhamento realizado em intervalos regulares conforme mostra as figuras 13 a 15.

##### 5.2.4.1 Determinação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

A curva de crescimento da linhagem P5 foi determinada em  $\text{Log}_{10}$  (UFC/mL). Neste ensaio foi observado que após 12h foi atingida a fase estacionária da cultura bacteriana e a fase de declínio ou morte da cultura foi detectada após 48 horas de incubação (Figura 13).



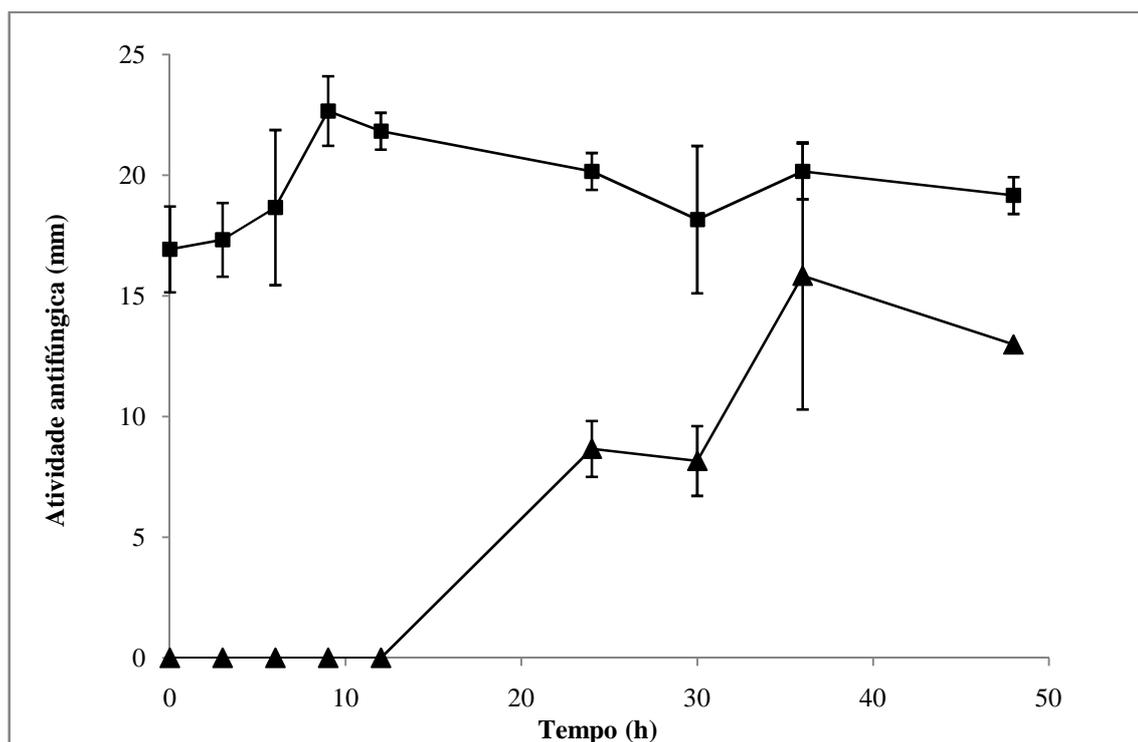
**Figura 13.** Curva de crescimento e de atividade antibacteriana de *Bacillus* SP. P5, a partir do inóculo (24h a 42 °C em *shaker* com 125 rpm), para determinação do número de UFC/mL ( $\diamond$ ) e da atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 ( $\blacksquare$ ) realizada em meio BHI, por até 48h. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três repetições.

#### 5.2.4.2 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana, utilizando-se *B. cereus* ATCC 14579 como espécie indicadora desta atividade, apresentou máxima atividade em 6 h de crescimento, coincidindo com a fase de crescimento exponencial e posteriormente reduzindo e mantendo-se estável até o final do experimento (48 h) (Figura 13).

#### 5.2.4.3 Determinação da atividade antifúngica

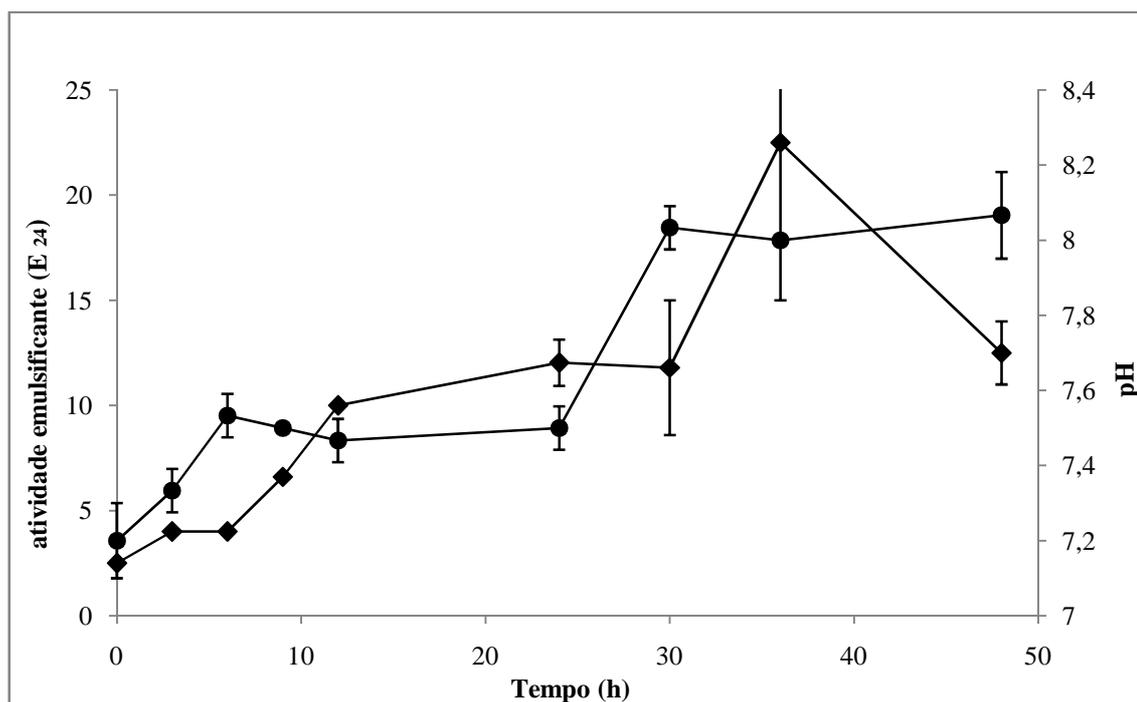
A atividade antifúngica observada com o sobrendante dos cultivos inoculados após a centrifugação realizada sob a forma de um *spot* no ágar BDA, já com este fungo filamentoso inoculado, foi observada apenas após 24 h de crescimento, com valores máximos em 36 h. A atividade antifúngica das células de *Bacillus* sp. P5 apresentou um pico de atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em 9 h de cultivo e outro, menor, em 36 h de cultivo (Figura 14).



**Figura 14.** Curvas de atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* representando as médias dos halos do teste com as células bacterianas (■) e as médias dos halos do teste com o sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 (▲) monitorados durante o crescimento por 48 h com incubação realizada a 42 °C, 125 rpm. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três repetições.

#### 5.2.4.4 Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante (E24) foi determinada a partir dos mesmos pontos da curva de crescimento e de atividade antimicrobiana. Os valores de E24 variaram ao longo da curva de 2,5 a 22,5%, atingindo o valor máximo de produção em 36 h, coincidindo com a fase estacionária tardia e a máxima atividade antifúngica testada com o sobrenadante de *Bacillus* sp. P5. (Figura 15).



**Figura15.** Curva de atividade emulsificante ( $E_{24}$ ,  $\blacklozenge$ ) e de pH ( $\bullet$ ) de *Bacillus* sp. P5 realizada em meio BHI e medida através de ensaio de  $E_{24}$  e eletrodo de pH, respectivamente. Incubação realizada a 42 °C, 125 rpm por 48 h. Cada ponto representa a média de três repetições. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três repetições.

#### 5.2.4.5 Determinação do pH

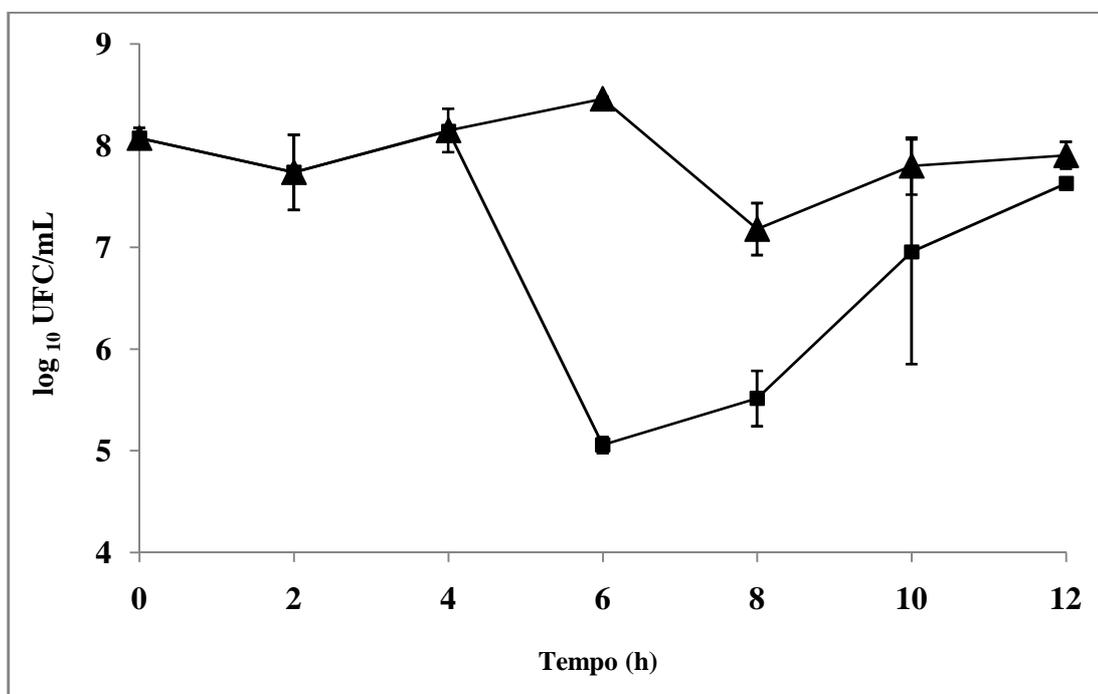
Durante a realização das curvas de crescimento, foi realizado também o acompanhamento do pH dos cultivos, sendo as alíquotas coletadas nos mesmos intervalos descritos anteriormente. Observou-se que o pH inicial foi de 7,2 e, que no decorrer do crescimento de *Bacillus* sp. P5, houve um aumento do pH até este estabelecer-se em 8,07 (Figura15).

#### 5.2.5 Efeito do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 sobre o crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *B. cereus* ATCC 14579 (Curva dose-resposta)

Neste ensaio foi avaliado o efeito das substâncias antagonistas (antimicrobianas) presentes no sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 sobre o crescimento de *B. cereus* ATCC 14579 e de *L. monocytogenes* ATCC 7644.

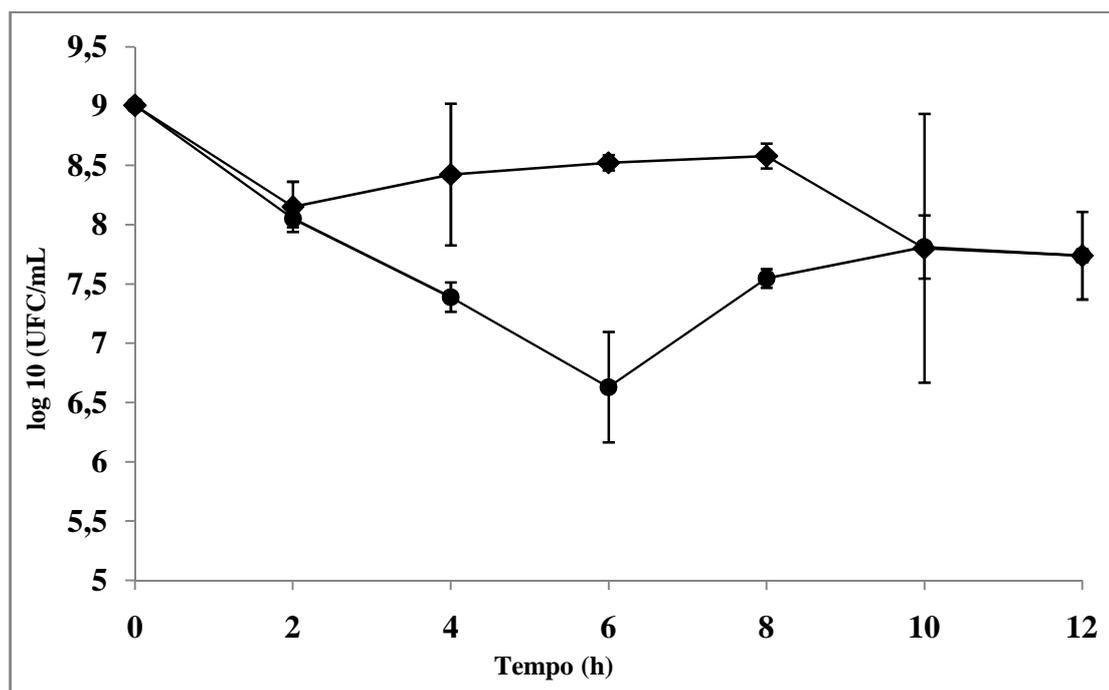
Após a adição do sobrenadante da cultura ocorreu uma redução de 3 e 2,6 ciclos logarítmicos nos números das células viáveis (UFC/mL) de *B. cereus* ATCC 14579, nos

tempos de 6 e 8 h de cultivo, respectivamente (Figura 16). Entretanto, após 10 h de cultivo observou-se o aumento do número de UFC/mL, atingindo valores próximos ao da cultura sem adição do sobrenadante, no tempo de 12 h.



**Figura 16.** Efeito do sobrenadante filtrado de *Bacillus* sp. P5 sobre o número de UFC/mL de células viáveis *B. cereus* ATCC 14579, crescido em meio BHI a 42 °C. A adição do sobrenadante foi realizada após 4h de cultivo. Crescimento de *B. cereus* ATCC 14579, sem adição de sobrenadante (▲) e com a adição de sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 (■). Cada ponto representa a média de duas repetições.

O efeito da adição do sobrenadante filtrado de *Bacillus* sp. P5 à cultura de *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 é mostrado na figura 17. Observou-se decréscimos de 1,04 e 2,4 ciclos logarítmicos do número de UFC/mL quando comparado com a curva controle após 4 e 6 h de cultivo, respectivamente. Após 6 h de cultivo verificou-se um aumento do número de UFC/mL da cultura de *L. monocytogenes* com adição de sobrenadante, alcançando os valores observados para a cultura controle.



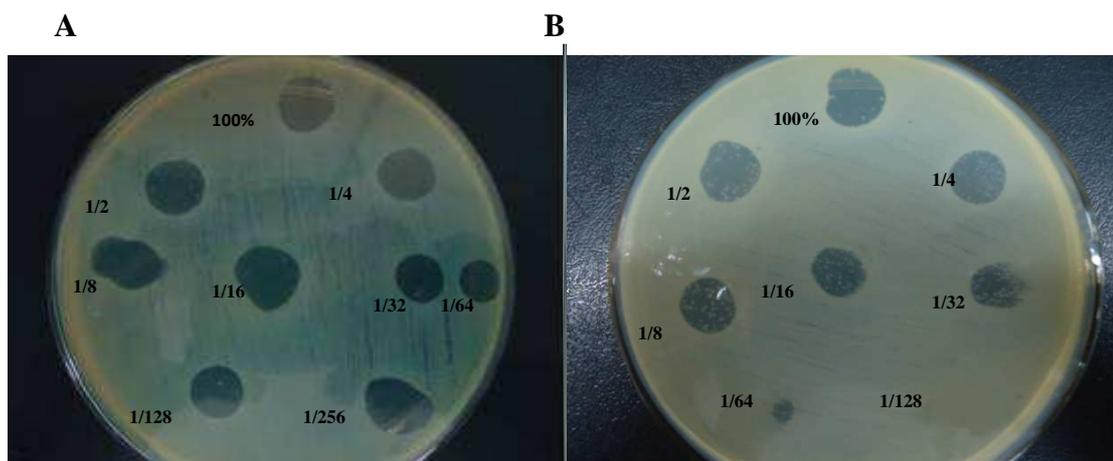
**Figura 17.** Efeito do sobrenadante filtrado de *Bacillus* sp. P5 sobre o número de UFC/mL de células viáveis de *Listeria monocytogenes* ATCC 6477, crescida em meio BHI a 42 °C. A adição do sobrenadante foi realizada após 4h de cultivo. Crescimento de *Listeria monocytogenes* ATCC 6477, sem adição de sobrenadante (◆) e com a adição de sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 (●). Cada ponto representa a média de duas repetições.

### 5.2.6 Produção da substância antimicrobiana avaliando a ativação e/ou estímulo para a sua produção

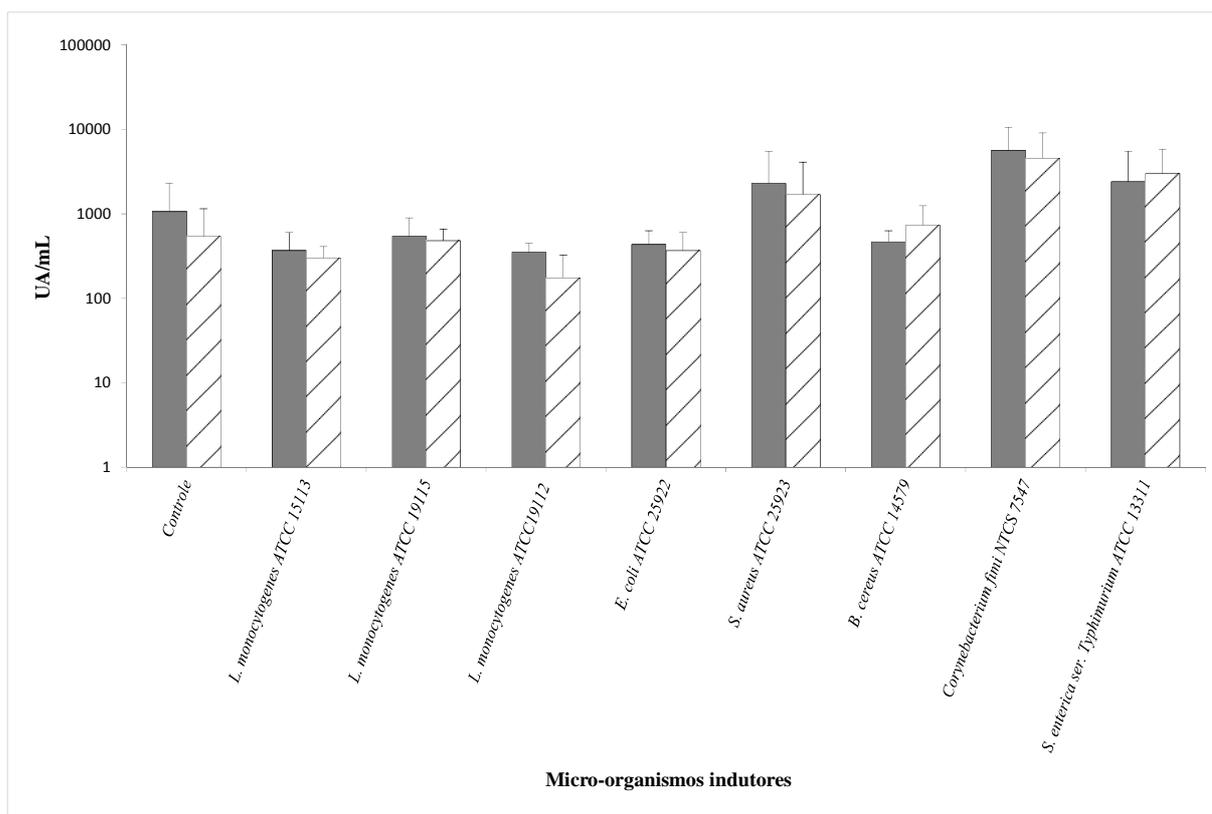
Os resultados das induções com os micro-organismos patogênicos demonstraram que, quando a linhagem produtora selecionada para os estudos (*Bacillus* sp. P5) foi induzida em co-cultivo com *Corynebacterium fimi* NTCS 7547 (Figura 18A), as atividades antimicrobianas frente a *B. cereus* ATCC 14579 foram estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) com média de título de 5.600 UA/mL quando comparados aos cultivos da amostra controle da produtora (média de título de 1.060 UA/mL) e aos cultivos induzidos com *L. monocytogenes* ATCC 15313 (366,7 UA/mL), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (540 UA/mL), *L. monocytogenes* ATCC 19112 (350 UA/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922 (433,4 UA/mL), *S. aureus* ATCC 25923 (2.300 UA/mL), *B. cereus* ATCC 14579 (466,7 UA/mL), *Diplodia* sp. (150 UA/mL) e *Penicillium roqueforti* (750 UA/mL). Quando a linhagem produtora foi estimulada por crescimento em co-cultivo com as células mortas de fungos filamentosos, a indução com *Aspergillus fumigatus* apresentou atividade antimicrobiana estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) com média de título de 6.400 UA/mL,

quando comparada com todos os outros cultivos com os demais micro-organismos testados, com exceção de *C. fimi* NTCS 7547 em que apresentou título de 5.600 UA/mL, não havendo diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). O resultado da atividade antimicrobiana utilizando-se como micro-organismo indicador *L. monocytogenes* ATCC 6477 para o micro-organismo indutor *C. fimi* NTCS 7547 apresentou atividade maior (de 4582 UA/mL -  $p < 0,05$ ) quando comparado à indução com *L. monocytogenes* ATCC 15313 (300 UA/mL), com *L. monocytogenes* 19112 (175 UA/mL) e com *E. coli* ATCC 25922 (366,7 UA/mL) (Fig. 18). Estes resultados indicam que há influência de possíveis fatores de indução na produção da atividade antimicrobiana por *Bacillus* sp. P5.

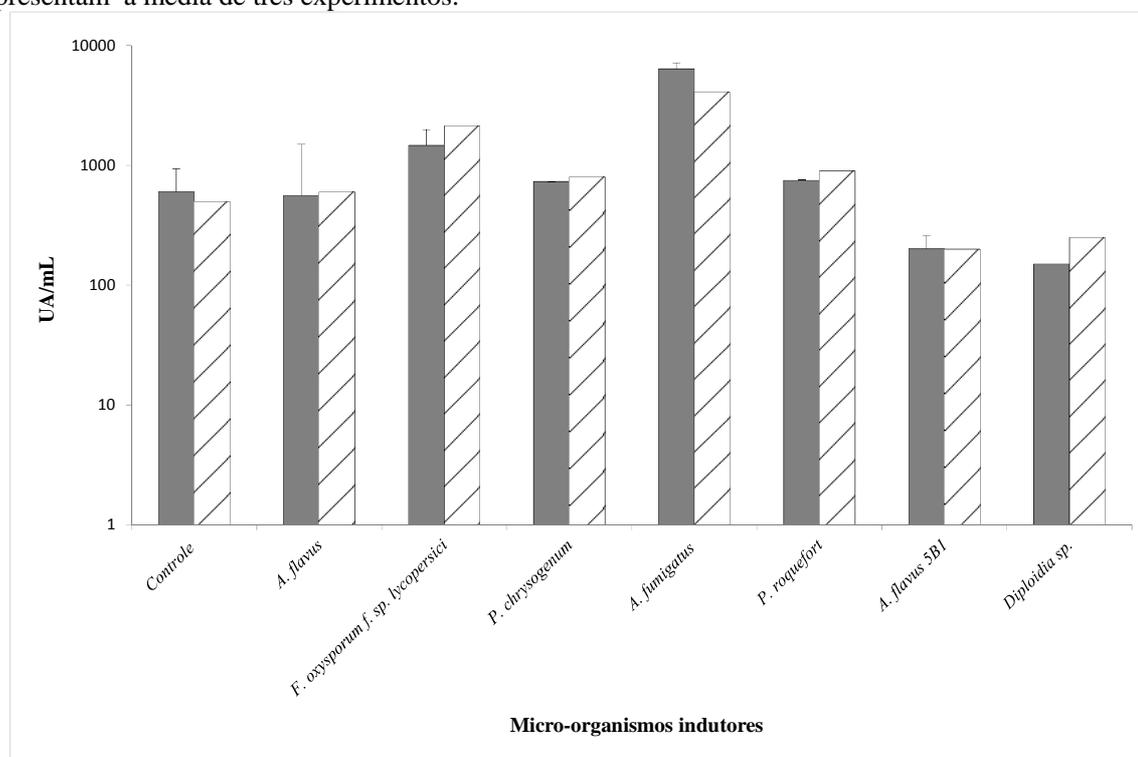
As comparações estatísticas foram realizadas somente entre os fungos (Figura 18B) e bactérias patogênicas que melhor que foram capazes de induzir, ou que possuíram a atividade indutora para *Bacillus* sp. P5, totalizando 15 espécies microbianas indutoras além do controle (Figuras 19 e 20).



**Figura 18.** Indução/ativação da atividade antibacteriana, em crescimento de *Bacillus* sp. P5 em co-cultivo com *Corynebacterium fimi* NTCS 7547 (A) e antifúngica, em crescimento de *Bacillus* sp. P5 em co-cultivo com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersic* (B) em meio BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C) contra *B. cereus* ATCC 14579. Título de 12.800 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *Corynebacterium fimi* NTCS 7547 e de 3200 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersic*.

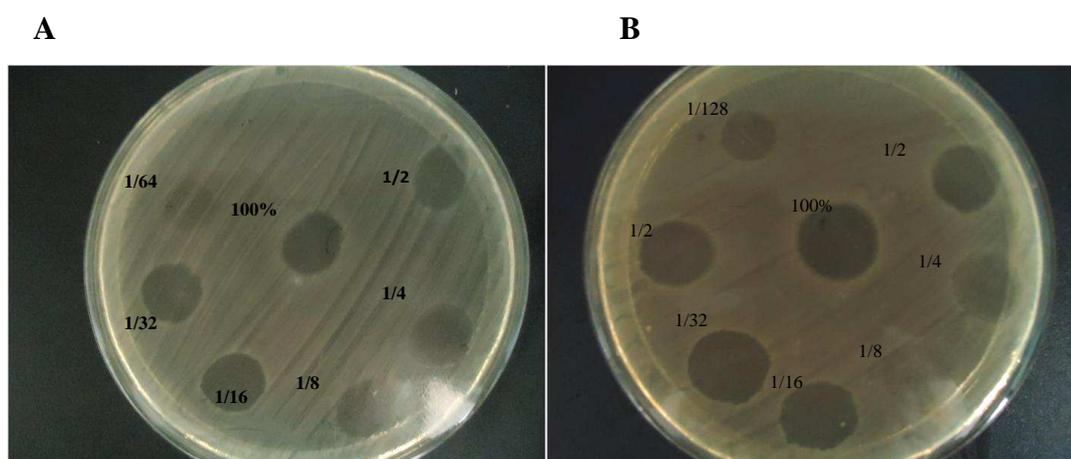


**Figura 19.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com bactérias indutoras em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos.

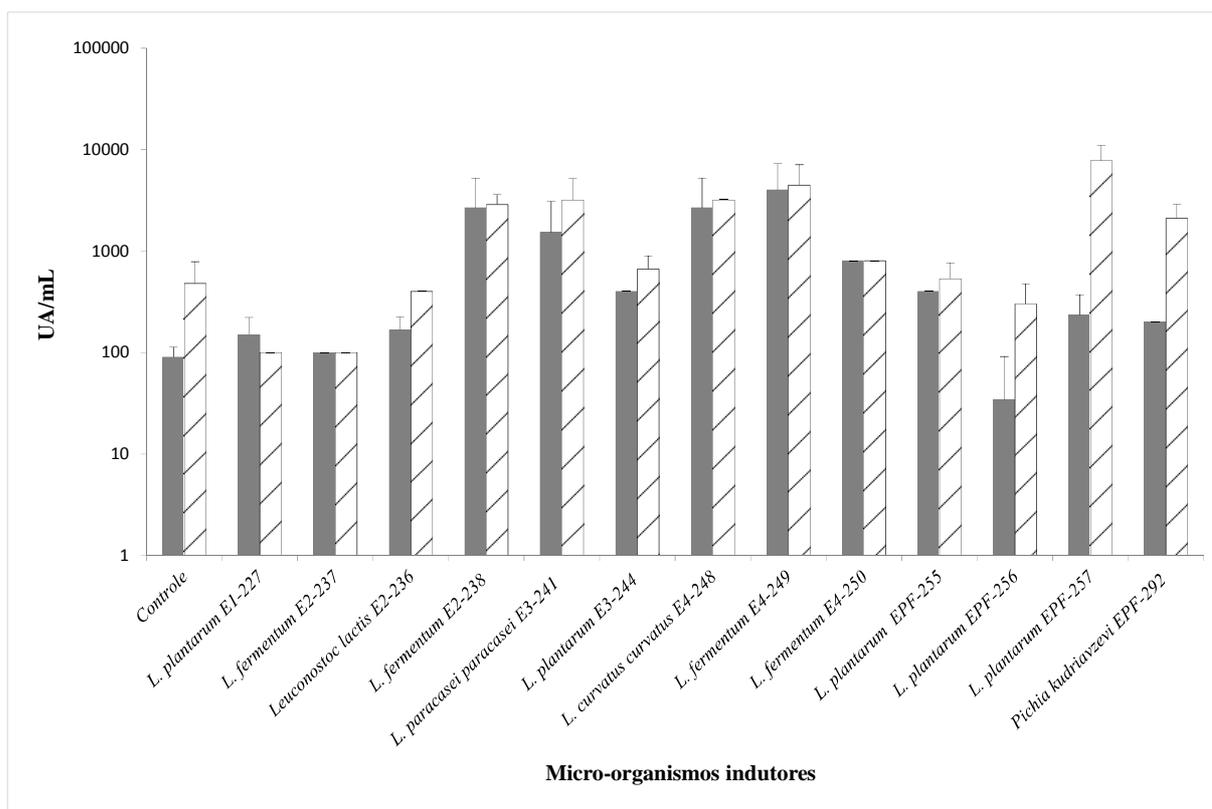


**Figura 20.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com fungos filamentosos indutores em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos.

Posteriormente, foram realizadas medidas de atividade antimicrobiana utilizando-se bactérias lácticas isoladas da puba e uma levedura (*Candida tropicalis*) como espécies indutoras. Os resultados mostraram que as atividades antimicrobianas foram superiores ( $p < 0,05$ ) quando o cultivo de *Bacillus* sp. P5 foi induzido com células mortas de micro-organismos que foram isolados do mesmo lote de puba que esta bactéria foi isolada (CRISPIM et al., 2013) (Figura 22). A atividade antimicrobiana frente a *B. cereus* ATCC 14579 alcançou 4000 UA/mL quando utilizado *L. fermentum* E4-249, e 7771 UA/mL contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando utilizado *Lactobacillus plantarum* EPF-257. Este valor de 7771 UA/mL foi o resultado que mostrou maior inibição contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 dentre todas as espécies testadas (bactérias e fungos patogênicos e bactérias lácticas da puba). Testou-se também a atividade usando um fungo filamentososo como indicador, o resultado da atividade antifúngica utilizando-se *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicidemonstrou* que *L. curvatus* E4-248 (3240 UA/mL) apresentou melhor resultado de atividade contra este micro-organismo quando comparado ao tratamento controle (650 UA/mL) a um nível de significância de  $p < 0,05$  (Fig. 21).

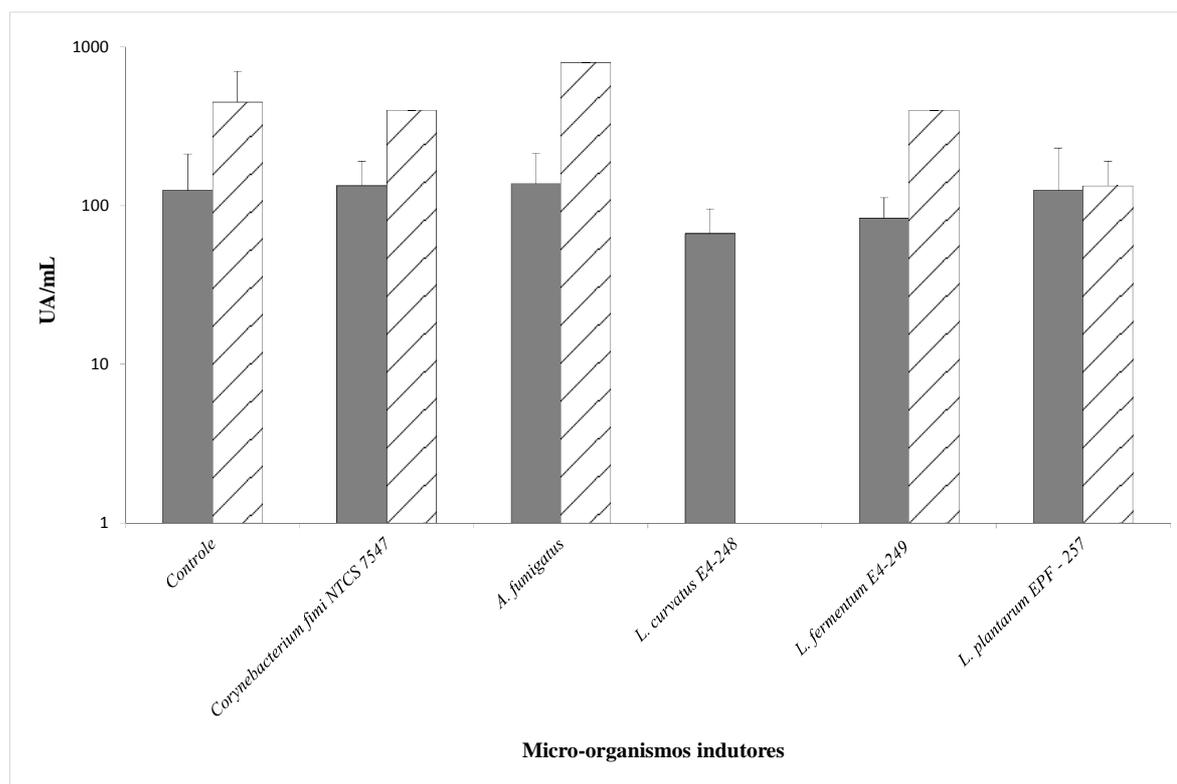


**Figura 21.** Indução/ativação da atividade antibacteriana, em crescimento de *Bacillus* sp. P5 em co-cultivo com *L. brevis* E2-248(A) e com *L. fermentum* E4 – 249 (B) em meio BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 6477. Título de 3200 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *L. brevis* E2-248 e de 3200 UA/mL para co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com células inativadas de *L. fermentum* E4 – 249.



**Figura 22.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com bactérias lácticas isoladas da puba e indutoras em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos.

Quando o cultivo de *Bacillus* sp. P5 foi induzido com os sobrenadantes e não com as células bacterianas, os resultados das atividades antimicrobianas foram bastante reduzidos, geralmente iguais ( $p < 0,05$ ) aos do cultivo controle. A indução utilizando sobrenadante de *A. fumigatus* foi mais significativa apresentando atividade de 800 UA/mL enquanto que a indução com os outros quatro micro-organismos apresentaram valores que variaram de 130 a 450 UA/mL quando testados contra *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (Figura 23).



**Figura 23.** Atividade antibacteriana contra *B. cereus* ATCC 14579 (barras escuras) e *Listeria monocytogenes* ATCC 6477 (barras hachuradas) de sobrenadante de cultivo de *Bacillus* sp. P5 com sobrenadantes dos micro-organismos indutores que mais aumentaram a atividade antimicrobiana, anteriormente testados em BHI (24h a 37 °C + 24h a 42°C). Títulos expressos em UA/mL. Os resultados representam a média de três experimentos.

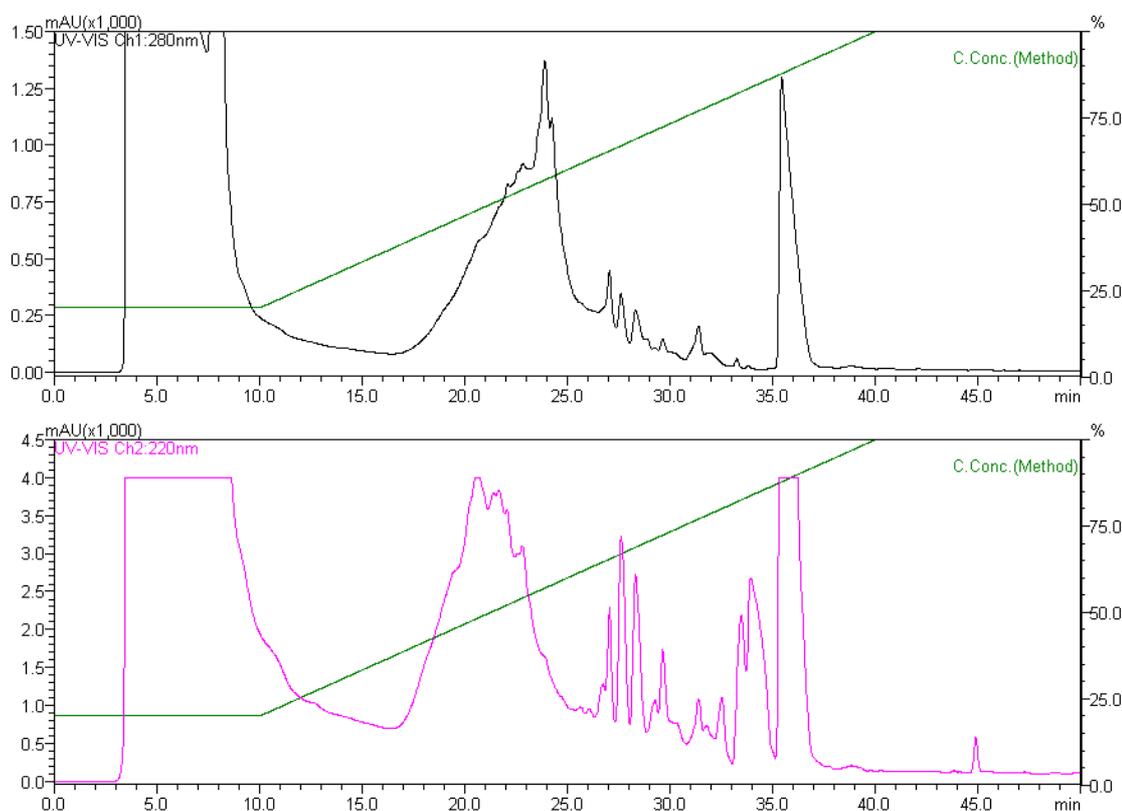
### 5.3 OBTENÇÃO DOS LIPOPEPTÍDEOS

#### 5.3.1 Purificação de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. P5 em meio de cultura

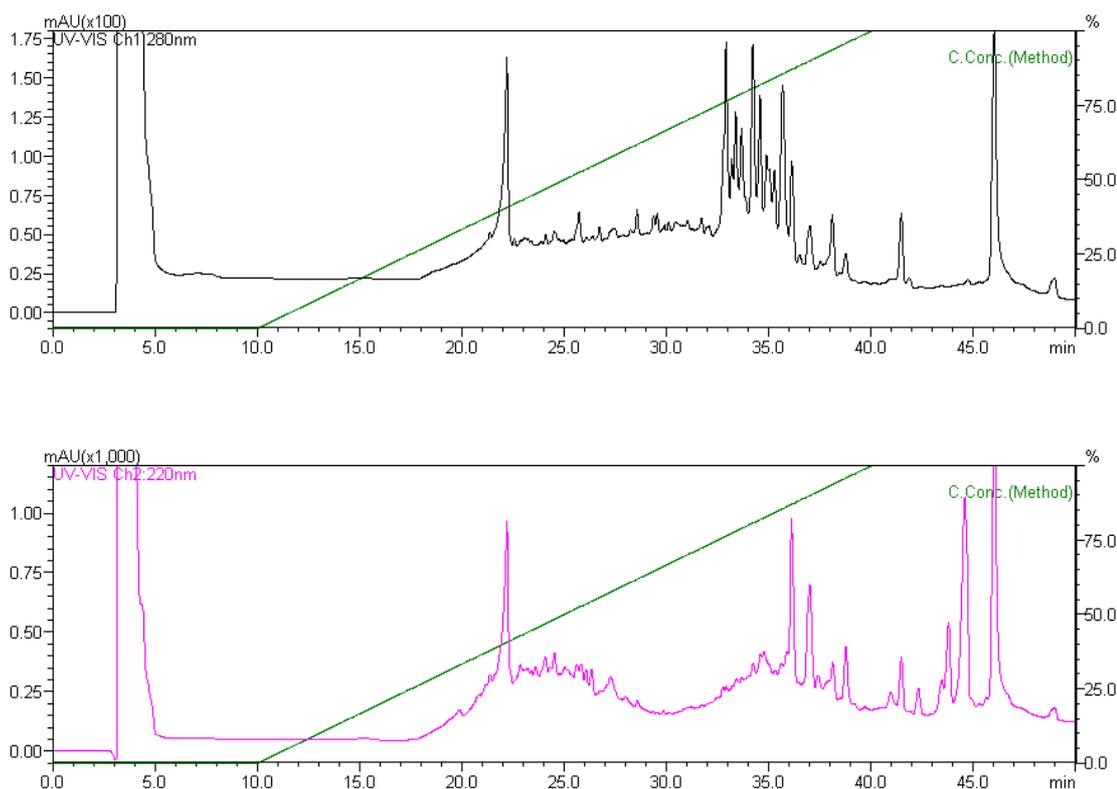
Foram realizadas 10 corridas cromatográficas nas quais os extratos butanólicos (n=7) ou de precipitação ácida (n=3) foram fracionados em dois tipos de colunas de fase reversa C18 acopladas ao HPLC.

Analisaram-se os sobrenadantes obtidos em três tempos de cultivo mais relevantes na produção de atividade antimicrobiana (6 e 36h) e biossurfactantes (30h) conforme previamente observado nas curvas de crescimento e produção. Foram realizadas duas corridas no tempo de 6h (uma a partir da extração ácida e outra com butanol, ambas para cultivos em BHI), cinco no tempo de 30h (quatro extratos butanólicos, sendo que três em meio BHI e um em meio Landy e uma precipitação ácida em meio Landy) e três corridas no tempo de 36 h de cultivo (dois extratos butanólicos e uma extração ácida).

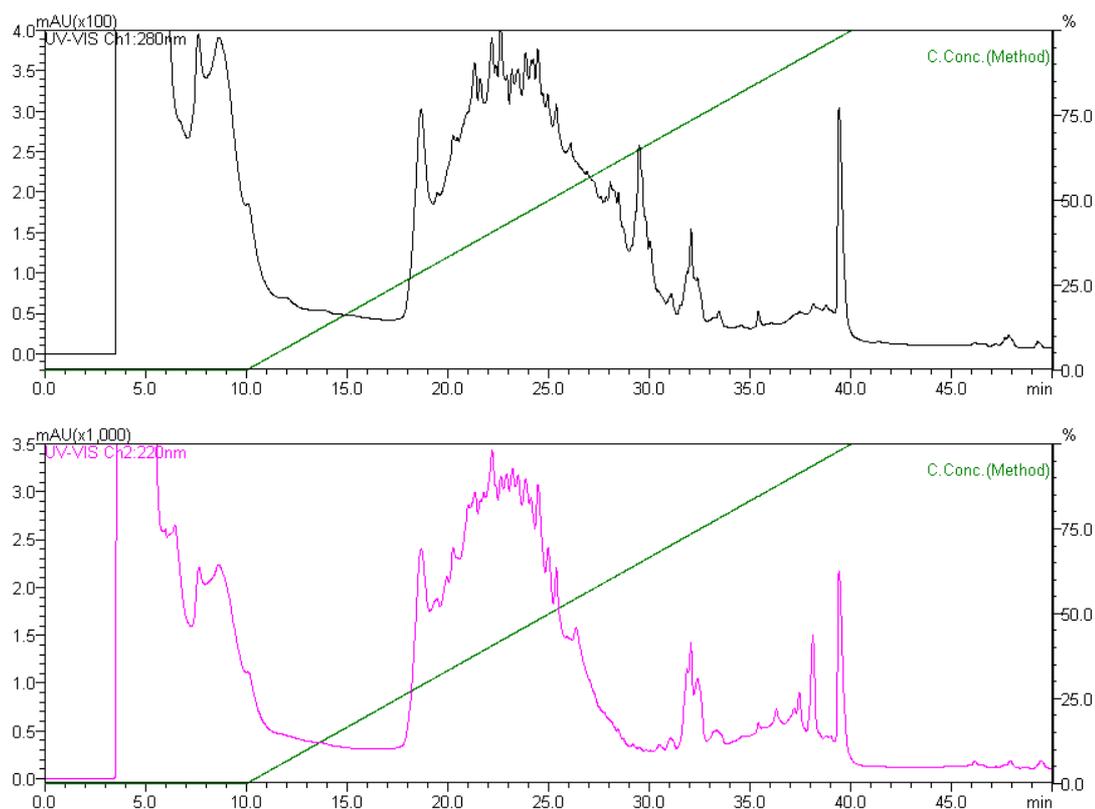
Nos extratos submetidos a cromatografia de fase reversa foram seleccionadas frações com atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579. Estas frações ativas foram posteriormente submetidas à espectrometria de massas MALDI-TOF e, diferentes famílias de lipopeptídeos e suas respectivas isoformas foram encontradas (Tabela 11). Os cromatogramas são apresentados nas figuras de 24 a 33. As diferentes condições de cada corrida como: tempo de cultivo do *Bacillus* sp. P5, tipo de extração, quantificação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, tipos de colunas e gradientes usados, bem como os lipopeptídeos detectados por MALDI-TOF são mostrados na tabela 11.



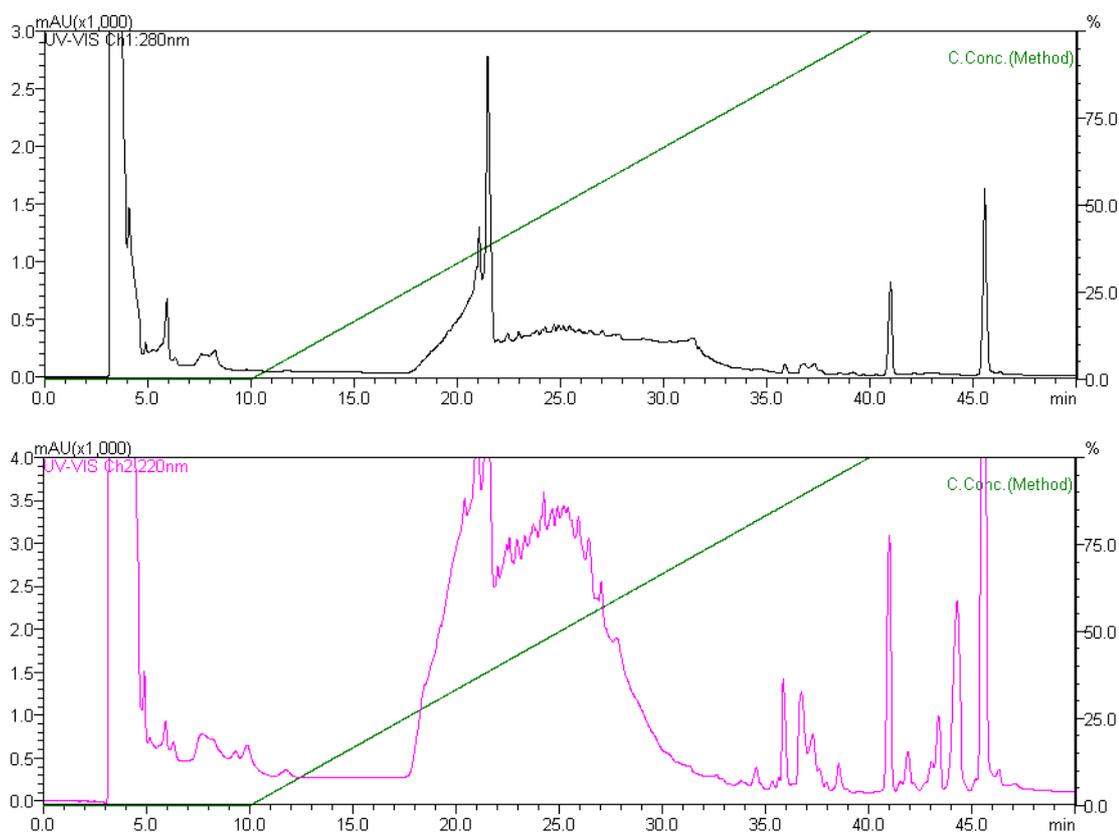
**Figura 24.** Corrida cromatográfica nº1: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 6 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior). Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 5 (void da coluna), 21 e 22.



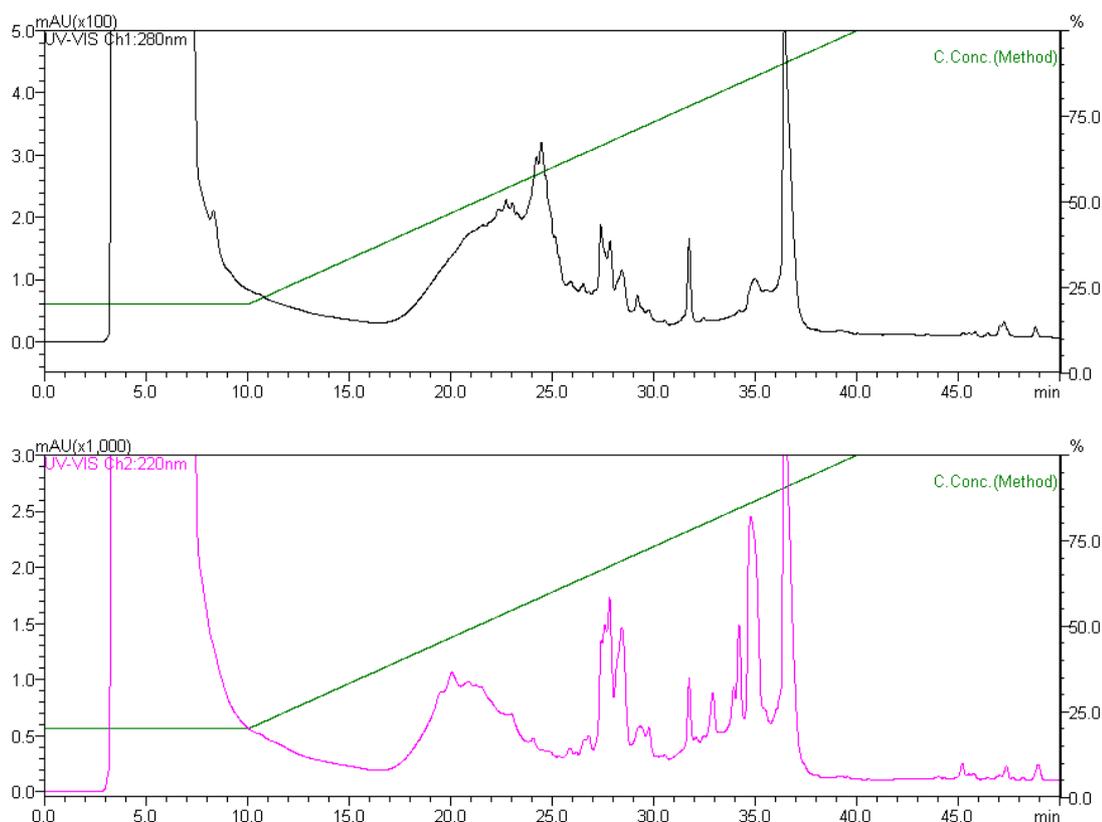
**Figura 25.** Corrida cromatográfica nº2: Perfil de eluição do precipitado ácido do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 6 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorvância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC14579: 4, 5 e 6 (void da coluna), 26, 27, 33 a 41, 43, 44, 45, 46 a 49.



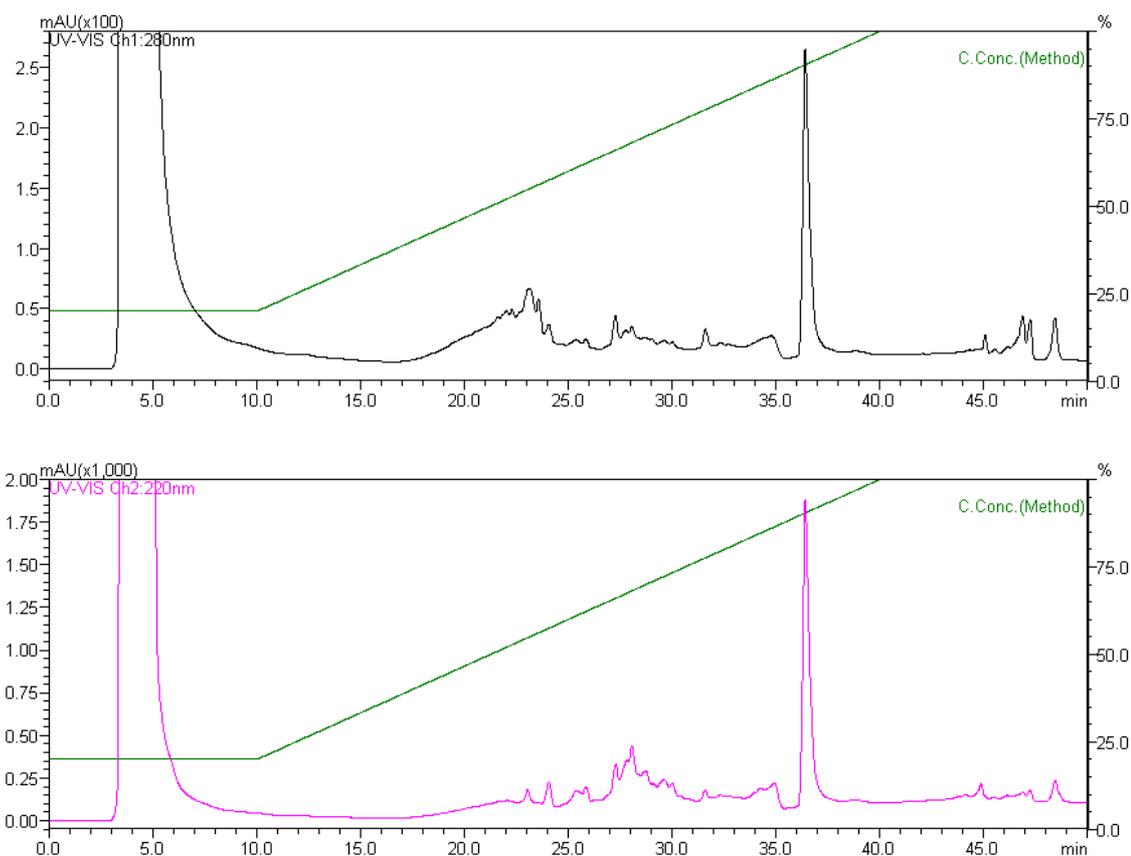
**Figura 26.** Corrida cromatográfica nº3: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%), fase móvel B (acetonitrila - ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, somente fase móvel A; 10-40 min gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorvância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 5 (void da coluna), 27 e 28.



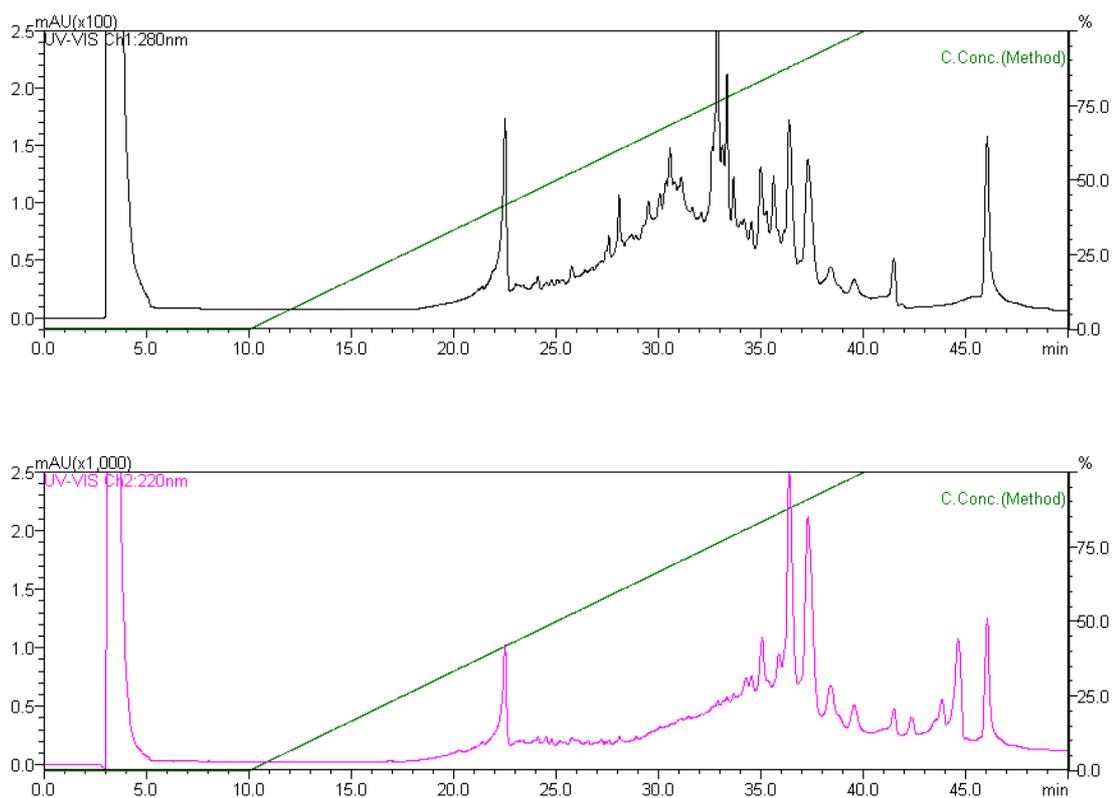
**Figura 27.** Corrida cromatográfica n°4: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%), fase móvel B (acetonitrila 100%). Gradiente: 0 a 10 min., somente fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 5 (void da coluna) e 42.



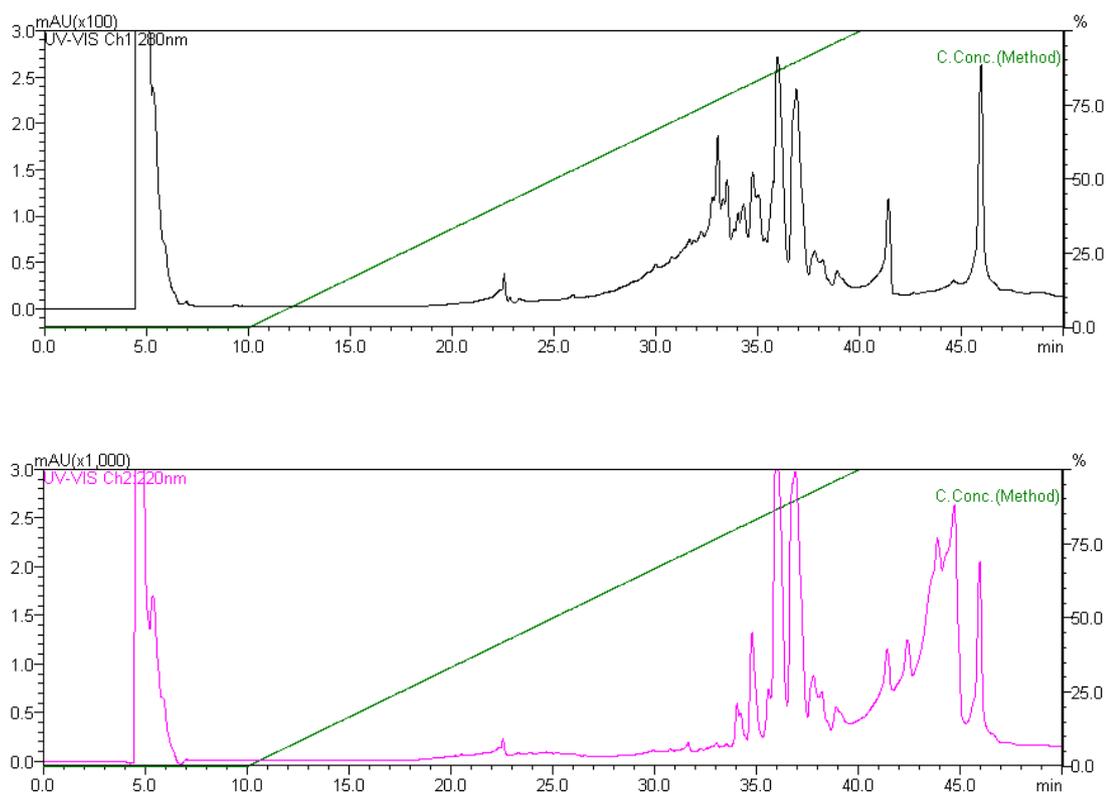
**Figura 28.** Corrida cromatográfica n°5: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., somente fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorvância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 5 (void da coluna), 22, 23 e 33.



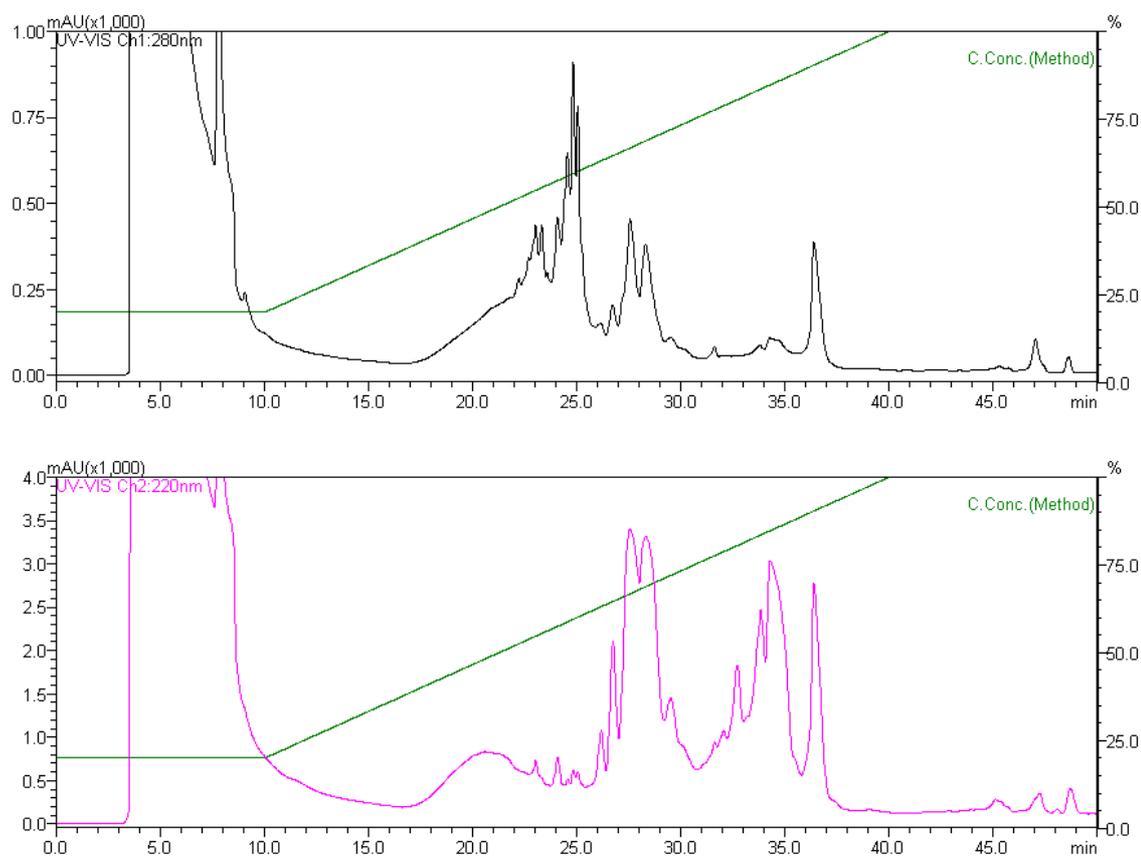
**Figura 29.** Corrida cromatográfica n°6: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio Landy, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05% ), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min, fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorvância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 5, 6 (void da coluna), 29 a 42, 45,46, 48, 50.



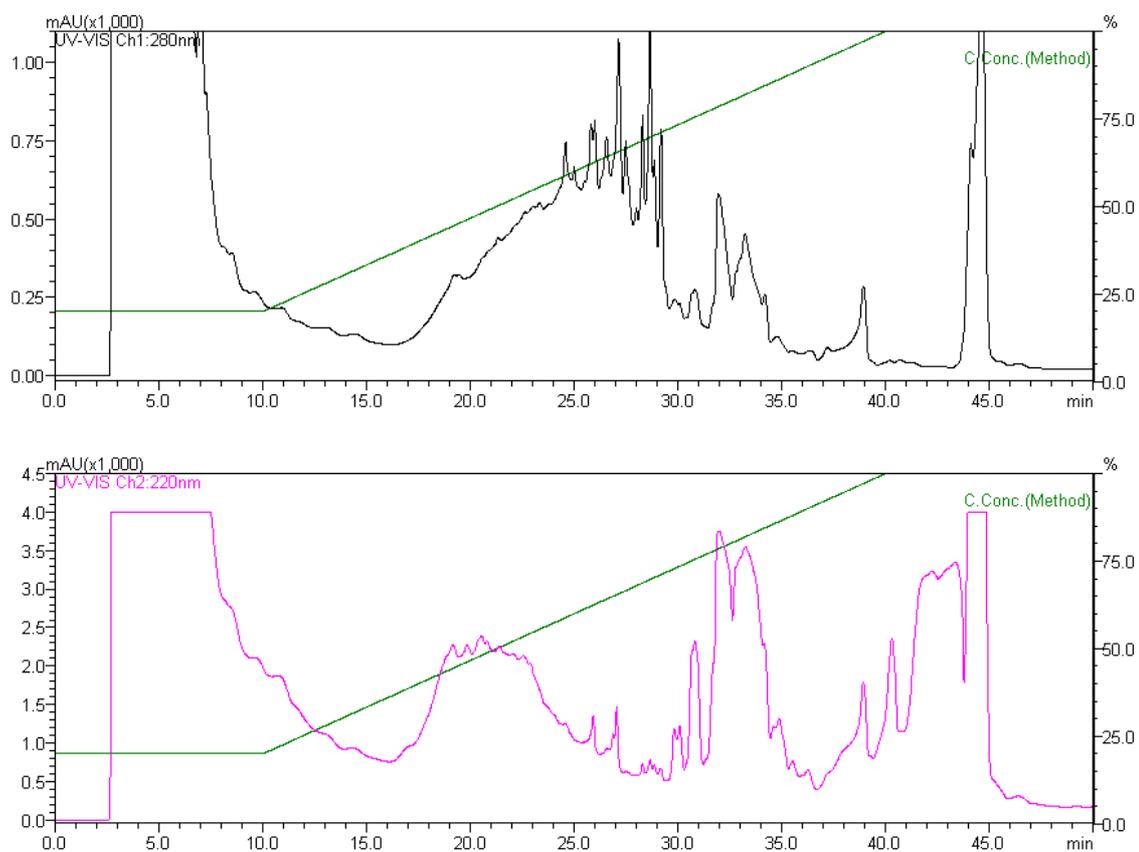
**Figura 30.** Corrida cromatográfica n°7: Perfil de eluição do precipitado ácido do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio Landy, após 30 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 5 e 6 (void da coluna), 16,17, 37 a 41.



**Figura 31.** Corrida cromatográfica n°8: Perfil de eluição do precipitado ácido do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 36 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05%) fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A; 10-40 min. gradiente linear de 0-100% fase móvel B e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorvância a 220 e 280 nm (leitura de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 40 a 46.



**Figura 32.**Corrida cromatográfica n°9: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 36 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shim-Pack C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05% ), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min. gradiente linear de 20-100% fase móvel B e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4, 8 (void da coluna), 23 e 24.



**Figura 33.**Corrida cromatográfica nº10: Perfil de eluição do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio BHI, após 36 h de cultivo. Fracionamento do extrato por cromatografia de fase reversa, utilizando coluna Shephasil™ Peptide C18 acoplada ao sistema HPLC. Fase móvel A (ácido trifluoracético - TFA 0,05% ), fase móvel B (ACN 100%). Gradiente: 0 a 10 min., fase móvel A + fase B (8:2 v/v); 10-40 min gradiente linear de 20-100% fase móvel B; e 40 a 50 min. somente fase móvel B. Volume das frações: 1 mL, coletadas em fluxo de 1mL/min. A absorbância a 220 e 280 nm (leituras de 280 nm - cromatograma superior e 220 nm - cromatograma inferior) e a atividade antimicrobiana foram determinadas para cada fração coletada. Frações ativas contra *L. monocytogenes* ATCC 6477 e *B. cereus* ATCC 14579: 4 (void da coluna), 24, 25 e 39.

**Tabela 11.** Fracionamentos dos extratos brutos em HPLC: tempo de cultivo e meio, atividade antimicrobiana do extrato bruto contra *B. cereus* ATCC 14579 (A) e *L. monocytogenes* ATCC 6477 (B), tipo de extração, de colunas C18 e de gradientes, frações ativas e atribuição dos lipopeptídeos detectados por espectrometria de massas MADJ-TOF.

Corrida	Tempo de cultivo (h)/meio	Atividade antimicrobiana do extrato bruto	Extração	Coluna C18/Gradiente	Número da fração ativa (F)	F/m/z (atribuição <sup>†</sup> )
1	6/BHI	800 UA/mL (A) e 12800 UA/mL (B)	Butanol	Shim-Pack/ 20-100% ACN	5, 21* e 22	F22/1121,6 (C <sub>18</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> )
2	6/BHI	50 UA/mL (A) e 12800 UA/mL (B)	Ácida	Shephasil <sup>TM</sup> / 0-100% ACN	4,5,6, 26*,27*, 33*, 34, 35, 36, 37*, 38*, 39, 40*, 41, 43, 44, 45, 46 47, 48 e 49.	F4 e 5/1058,5 (C <sub>15</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ) F4, 5 e 6/1485,6 (C <sub>16</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup> ) F6, 26, 27 e 33/1074,8 (C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ) F6 e 33/1485,8 (C <sub>16</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ) F33/1515,8 (C <sub>17</sub> fen, [M+K] <sup>+</sup> ou (C <sub>15</sub> fen-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F34/1529,7 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F37/1499,8 (C <sub>17</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup> ou (C <sub>15</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> ) F38/1491,7 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+H] <sup>+</sup> ) F39/1513,9 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> ) F40/1505,8 (C <sub>17</sub> fen-Val, [M+H] <sup>+</sup> ) F46/1058,5 (C <sub>15</sub> srf A [M+Na] <sup>+</sup> )
3	30/BHI	3200 UA/mL (A) e 6400 UA/mL (B)	Butanol	Shim-Pack/ 0-100% ACN	5, 27* e 28*	F27/1074,5 (C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ) F28/1008,5 (C <sub>13</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> )
4	30/BHI	3200 UA/mL (A) e 6400 UA/mL (B)	Butanol	Shephasil <sup>TM</sup> /0- 100% ACN	4,42*	F42/994,39 (C <sub>13</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> ) 1016,5 (C <sub>13</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) 1032,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) 1032,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) 1064,68 (possível C <sub>17</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ) F4/1527,0 (C <sub>17</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> ) F4/1079,57 (C <sub>15</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup> ) F23/1008,5 (C <sub>13</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> ) F23/1121,6 (C <sub>18</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F23/1135,6 (C <sub>19</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1016,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1030,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1046,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) F33/1058,6 (C <sub>15</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1074,5 (C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> )
5	30/BHI	3200 UA/mL (A) e 6400 UA/mL (B)	Butanol	Shim-Pack /20-100% ACN	4,5,22,23 e 33*	F42/994,39 (C <sub>13</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> ) 1016,5 (C <sub>13</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) 1032,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) 1032,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) 1064,68 (possível C <sub>17</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ) F4/1527,0 (C <sub>17</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> ) F4/1079,57 (C <sub>15</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup> ) F23/1008,5 (C <sub>13</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> ) F23/1121,6 (C <sub>18</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F23/1135,6 (C <sub>19</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1016,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1030,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1046,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) F33/1058,6 (C <sub>15</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ) F33/1074,5 (C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> )

6	30/Landy	50 UA/mL (A) 0 UA/mL (B)	Butanol	Shim-Pack / 20-100% ACN	4, 5, 6, 29*, 30*, 31*, 32*, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 40, 41*, 42, 45, 4t 48* e 50*.	F36/1022,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> , C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F32, 36, 37 e 38/1036,4 (C <sub>15</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ) F35, 36 e 37/1044,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F37 e 38/1050,8 (C <sub>16</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ) F36, 37 e 38/1058,5 (C <sub>15</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ) F35, 36 e 37/1060,4 (C <sub>14</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) F37 e 38/1072,5 (C <sub>16</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ) F43/1074,5 (C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ) F38/1079,5 (C <sub>15</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup> ) F37 e 38/1088,5 (C <sub>16</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ) F4, 5 e 6/1095,4 (C <sub>15</sub> itu, [M+K] <sup>+</sup> ) F29, 36 e 37/1463,7 (C <sub>16</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ) F29 e 31/1485,6 (C <sub>16</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup> ) F4, 5, 6 e 29/1501,6 (C <sub>16</sub> fen, [M+K] <sup>+</sup> ) F30 e 31/1543,8 (C <sub>17</sub> fen-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F29, 30 e 31/1477,8 (C <sub>17</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> feng-Val, [M+H] <sup>+</sup> ) F29 e 31/1491,7 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+H] <sup>+</sup> ) F29/1515,5 (C <sub>17</sub> fen, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> feng-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F30/1529,7 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F31/1505,5 (C <sub>17</sub> fen-Val, [M+H] <sup>+</sup> ) F31/1513,0 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> ) F29/1449,4 (C <sub>15</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ) F4, 5 e 6/1485,6 (C <sub>16</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup> ) F29 e 31/1499,8 (C <sub>17</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> )
7	30/Landy	3200 UA/mL (A) 6400 UA/mL (B)	Ácida	Shephasil™/ 0- 100 ACN	4, 5, 6, 16*, 17*, 37, 38, 39, 40 e 41.	F41/1074,8 (C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ) F4, F5, F6, F37, F38, F39, F40 e F41/1058,4 (C <sub>15</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ) F4, F5, F3/1485,5 (C <sub>16</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ) F4, F5, F6, F37, F38, F39/1543,5 (C <sub>17</sub> fen-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F5, F38/1449,4 (C <sub>15</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ) F5/1501,6 (C <sub>16</sub> fen, [M+K] <sup>+</sup> ) F6, F16 e F37/1463,/(C <sub>16</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ) F16/1477,8 (C <sub>17</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> feng-Val, [M+H] <sup>+</sup> ) F16 e F38/1515,7 (C <sub>17</sub> fen, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> feng-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F37/1529,7 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+K] <sup>+</sup> ) F38 e F39/1499,8 (C <sub>17</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup> ou (C <sub>15</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> )

8	36/BHI	3200 UA/mL (A) 6400 UA/mL (B)	Ácida	Shephasil™/ 0-100% ACN	40*, 41*, 42*, 43*, 44*, 45* e 46*.	F40/1513,0 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup> ) F41/1491,7 (C <sub>16</sub> fen-Val, [M+H] <sup>+</sup> )  F43/1030,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F44 e 45/1058,6 (C <sub>15</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ) F43/994,39 (C <sub>13</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ) F43/1008,5 (C <sub>13</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> ) F43/1016,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F43/1022,5 (C <sub>14</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> ) F43/1044,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F43/1060,4 (C <sub>14</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) F43/1074,5 (C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ) F23/1121,6 (C <sub>18</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F23/1065,5 (C <sub>14</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup> ) F23/1135,6 (C <sub>19</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F24/1043,3 (C <sub>14</sub> itu, [M+H] <sup>+</sup> ) F24/1057,4 (C <sub>15</sub> itu, [M+H] <sup>+</sup> ) F24/1079,3 (C <sub>15</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup> ) F24/1081,3 (C <sub>14</sub> itu, [M+K] <sup>+</sup> ) F24/1095,3 (C <sub>15</sub> itu, [M+K] <sup>+</sup> ) F4, 24 e 25/1079,5 (C <sub>15</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup> ) F24/1008,4 (C <sub>13</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup> ) F25/1135,6 (C <sub>19</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F39/1046,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> , C <sub>14</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> ) F04/1065,5 (C <sub>14</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup> ) F24/1121,6 (C <sub>18</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup> ) F24/1021,3 (C <sub>14</sub> bac, [M+H] <sup>+</sup> ) F25/1030,6 (C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F39/1449,5 (C <sub>15</sub> feng, [M+H] <sup>+</sup> ) F4/1095,3 (C <sub>15</sub> itu, [M+K] <sup>+</sup> ) F39/1016,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup> ) F39/1032,4 (C <sub>13</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup> )
9	36/BHI	3200 UA/mL (A) 6400 UA/mL (B)	Butanol	Shim-Pack/ 20-100% ACN	4, 8*, 23* e 24*	
10	36/BHI	3200 UA/mL (A) 6400 UA/mL (B)	Butanol	Shephasil™/ 20-100% ACN	4, 24*, 25* e 39*	

\* WANG et al., 2004; CHEN et al., 2008; STEIN, 2008.

Srf (surfactina), itu (iturina), mic (micosubtilina), bac (bacilomicina), fen (fengicina).

(A) *Bacillus cereus* ATCC 14579, (B) *Listeria monocytogenes* ATCC 6477\* halos não límpidos "fracos/nublados".

Comparando-se os tempos de cultivo e a quantidade de isoformas dos lipopeptídeos observa-se que há um aumento na diversidade em função do tempo. Em 6 h foram detectados três lipopeptídeos e suas isoformas (surfactina, micosubtilina e fengicina), em 30 h tem-se surfactina, micosubtilina, fengicina e iturina e suas isoformas e em 36 h ocorre a maior quantidade de lipopeptídeos, num total de 5 (surfactina, iturina, micosubtilina, bacilomicina e fengicina) e suas isoformas (Tabela 12).

Analisando-se cada um dos tempos em relação à forma de extração empregada bem como o tipo de coluna C18 de fase reversa que foi utilizada temos que, no tempo de 6 h de cultivo quando foi utilizada a coluna Shim-Pack C18 como primeira etapa de purificação após a extração com butanol foram encontradas três frações com atividade antimicrobiana e destas três uma fração ativa que quando submetida à espectrometria de massas apresentou pico e  $m/z$  compatível com micosubtilina C<sub>18</sub>. Já quando foi utilizada a coluna Shephasil™ Peptide C18 e a extração por precipitação ácida encontraram-se 21 picos ativos. Destes picos, três encontraram-se no *void* da coluna e também foram encontradas espécies moleculares monoprotônicas e aductos de íons sódio e potássio de surfactina e fengicina.

Foram realizadas cinco corridas cromatográficas no tempo de cultivo de 30 h, sendo utilizados dois meios de cultura (BHI e Landy), dois tipos de colunas C18 e dois gradientes diferentes. Em todas as corridas cromatográficas foram encontradas frações ativas contendo lipopeptídeos.

Com relação às extrações realizadas em 30 h de cultivo foi encontrada maior diversidade de lipopeptídeos na corrida utilizando-se da coluna Shim-Pack C18 com gradiente 20% ACN (surfactina, fengicina, iturina e micosubtilina). Entretanto, também foram encontrados lipopeptídeos nas corridas efetuadas em outras colunas e meios de cultura. Observou-se que com o gradiente de 20% de ACN até 100% de ACN mais espécies moleculares de lipopeptídeos foram encontradas. Já quando a extração ácida e a coluna Shephasil™ Peptide C18 foram utilizadas, nenhum lipopeptídeo nem substâncias com  $m/z$  desconhecidas foram detectados, tanto para cultura em BHI ou Landy.

As extrações e corridas cromatográficas e espectrométricas realizadas em 36 h de cultivo demonstraram que utilizando-se de extração com butanol e coluna Shephasil™ Peptide C18 com gradiente 20% ACN houve o maior número de lipopeptídeos encontrados (surfactina, iturina, fengicina, micosubtilina e bacilomicina). Este resultado não foi o mesmo quando utilizadas a coluna Shim-Pack C18 ou a extração ácida, demonstrando claramente a

influência do tipo de extração realizado no sobrenadante sobre a recuperação de lipopeptídeos.

#### *5.3.1.1 Análises por espectrometria de massas MALDI-TOF de lipopeptídeos produzidos por Bacillus sp. P5 em meio de cultura e na matriz alimentar de puba*

Foram detectados diferentes lipopeptídeos, por espectrometria de massas MALDI-TOF, nas frações ativas dos extratos obtidos por precipitações ácidas ou extrações butanólicas. Para a detecção da massa molecular de possíveis bacteriocinas e de lipopeptídeos foi realizada varredura no intervalo de  $m/z$  700 - 4500. Os lipopeptídeos foram detectados no intervalo de  $m/z$  994,4 – 1529,7 nos diferentes tempos de cultivo. As possíveis bacteriocinas da classe dos lantibióticos, cuja faixa de massa molecular esta compreendidas entre 3-3,5 kDa, foram detectadas nas seguintes corridas: 9 ( $m/z$  3049,1); 1 e 3 ( $m/z$  3147,7) e 4 ( $m/z$  3181,6). A baixa intensidade do sinal dos íons das possíveis bacteriocinas não permitiu a fragmentação.

Os homólogos das famílias dos lipopeptídeos detectados neste trabalho foram agrupados de acordo com os íons moleculares monoprotonados e seus adutos de sódio e potássio e são mostrados na tabela 12.

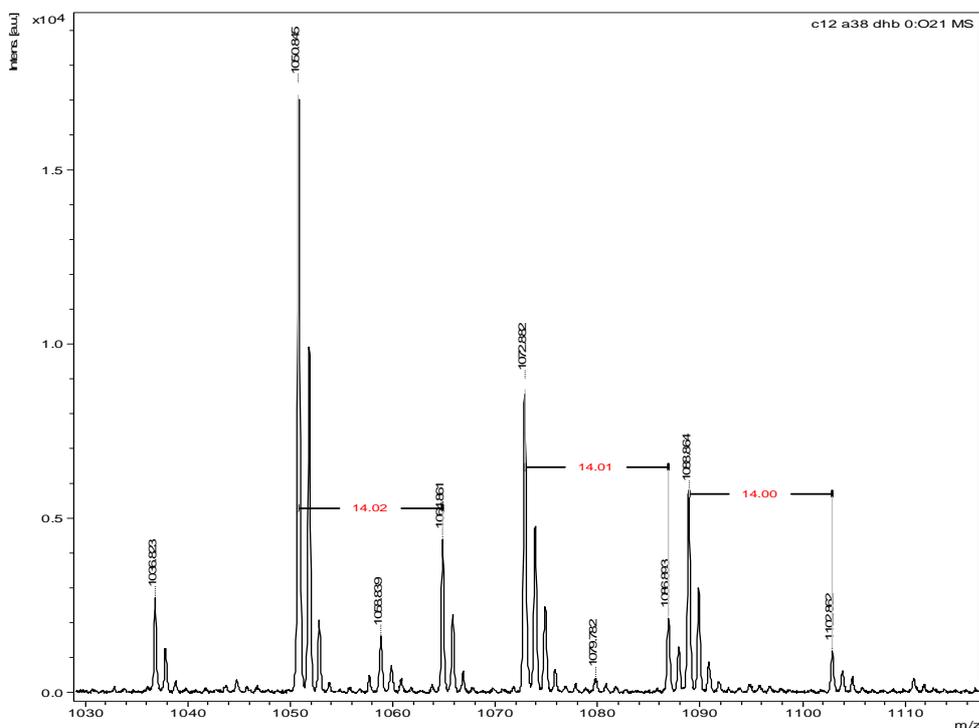
**Tabela 12.** Atribuição dos lipopeptídeos detectados, por espectrometria de massas MALDI-TOF, no extrato butanólico da matriz alimentar puba e nos extratos butanólicos ou naqueles obtidos por precipitação ácida dos meios de culturas nos tempos de 6, 30 e 36 h.

<i>m/z</i>	Atribuição *	Puba	Meio de cultura		
			Tempo (h)		
			6	30	36
994,4	C <sub>13</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1016,5	C <sub>13</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup>	-	+	+	+
1032,4	C <sub>13</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1008,5	C <sub>13</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1030,6	C <sub>13</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1046,6	C <sub>13</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>14</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1022,5	C <sub>14</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> srf B, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	+	-
1044,6	C <sub>14</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> srf B, [M+Na] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1060,4	C <sub>14</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> srf B, [M+K] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1036,4	C <sub>15</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	+	-
1058,6	C <sub>15</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup>	-	+	+	+
1074,5	C <sub>15</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1050,8	C <sub>16</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	+	-
1072,5	C <sub>16</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup>	-	-	+	-
1088,5	C <sub>16</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup>	-	+	+	+
1064,8	C <sub>17</sub> srf A, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	+	-
1086,8	C <sub>17</sub> srf A, [M+Na] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1102,8	C <sub>17</sub> srf A, [M+K] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1043,3	C <sub>14</sub> itu, [M+H] <sup>+</sup>	+	-	-	+
1065,5	C <sub>14</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup>	+	-	-	+
1081,3	C <sub>14</sub> itu, [M+K] <sup>+</sup>	+	-	-	+
1057,4	C <sub>15</sub> itu, [M+H] <sup>+</sup>	+	-	+	+
1079,57	C <sub>15</sub> itu, [M+Na] <sup>+</sup>	+	-	+	+
1095,3	C <sub>15</sub> itu, [M+K] <sup>+</sup>	+	-	+	+
1021,3	C <sub>14</sub> bac, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	-	+
1121,6	C <sub>18</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup>	-	+	+	+
1135,6	C <sub>19</sub> mic, [M+Na] <sup>+</sup>	-	-	+	+
1449,5	C <sub>15</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup>	+	-	+	+
1463,7	C <sub>16</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup>	+	-	+	-
1485,6	C <sub>16</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup>	+	-	+	-
1501,6	C <sub>16</sub> fen, [M+K] <sup>+</sup>	+	+	+	
1477,8	C <sub>17</sub> fen, [M+H] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> feng-Val, [M+H] <sup>+</sup>	+	+	+	-
1499,8	C <sub>17</sub> fen, [M+Na] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> feng-Val, [M+Na] <sup>+</sup>	-	+	+	-
1515,8	C <sub>17</sub> fen, [M+K] <sup>+</sup> ou C <sub>15</sub> feng-Val, [M+K] <sup>+</sup>	+	-	+	-
1491,7	C <sub>16</sub> fen-Val, [M+H] <sup>+</sup>	-	+	+	-
1513,9	C <sub>16</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup>	-	+	+	-
1529,7	C <sub>16</sub> feng-Val, [M+K] <sup>+</sup>	-	+	+	-
1505,8	C <sub>17</sub> fen-Val, [M+H] <sup>+</sup>	-	-	+	-
1527,0	C <sub>17</sub> fen-Val, [M+Na] <sup>+</sup>	-	+	+	-
1543,8	C <sub>17</sub> fen-Val, [M+K] <sup>+</sup>	-	-	+	-

\*WANG et al., 2004; CHEN et al., 2008; STEIN, 2008.

Srf (surfactina), itu (iturina), mic (micosubtilina), bac (bacilomicina), fen (fengicina).

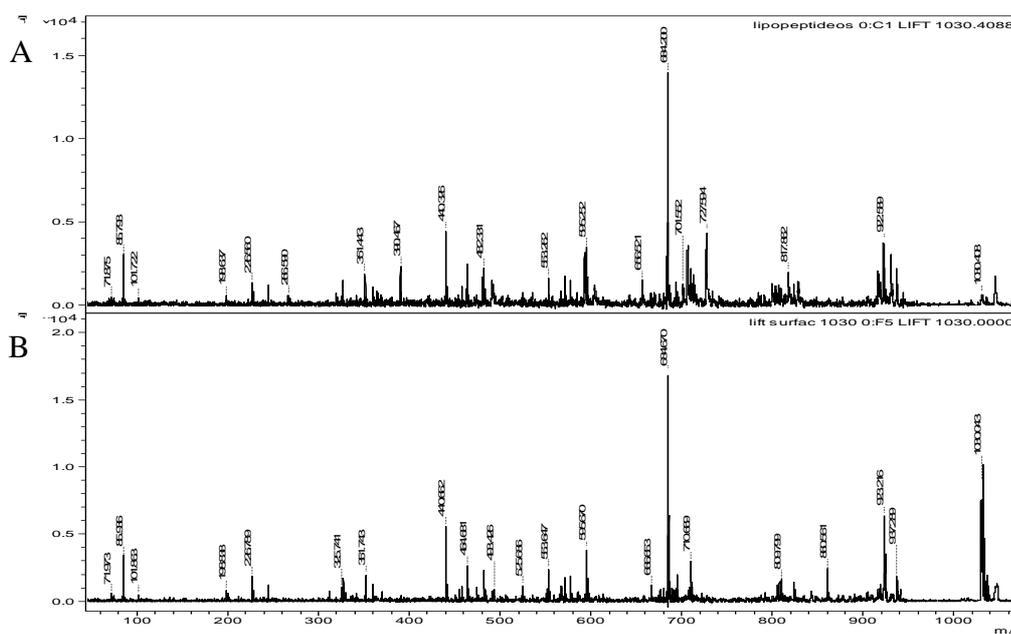
Apenas alguns espectros representativos de MS e MS/MS foram selecionados. A figura 34 mostra o espectro MS da fração de número 38, obtida após a cromatografia de fase reversa do extrato butanólico do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P5 em meio Landy, no tempo de 30 h (corrida 6). Os picos detectados na faixa de  $m/z$  entre 1030-1110 correspondem a moléculas monoprotônicas  $[M+H]^+$  e os seus respectivos monoaddutos de sódio  $[M+Na]^+$  e de potássio  $[M+K]^+$ . As massas  $m/z$  (1036,8; 1058,8; 1074) são compatíveis com SrfA C<sub>15</sub> e as de  $m/z$ (1050,8; 1072,8; 1088,8) com SrfA C<sub>16</sub> nas formas protonadas e seus adutos, respectivamente. Três picos adicionais ( $m/z$  1064,8; 1086,8 e 1102,8) diferem da série de Srf A C<sub>16</sub> por  $m/z$  14 Da. Possivelmente, trata-se de uma série homóloga de moléculas diferindo apenas pelo número de grupos metílenos ( $m/z$  14 Da) na cadeia alifática, o que sugere uma nova série de surfactinas C<sub>17</sub>.



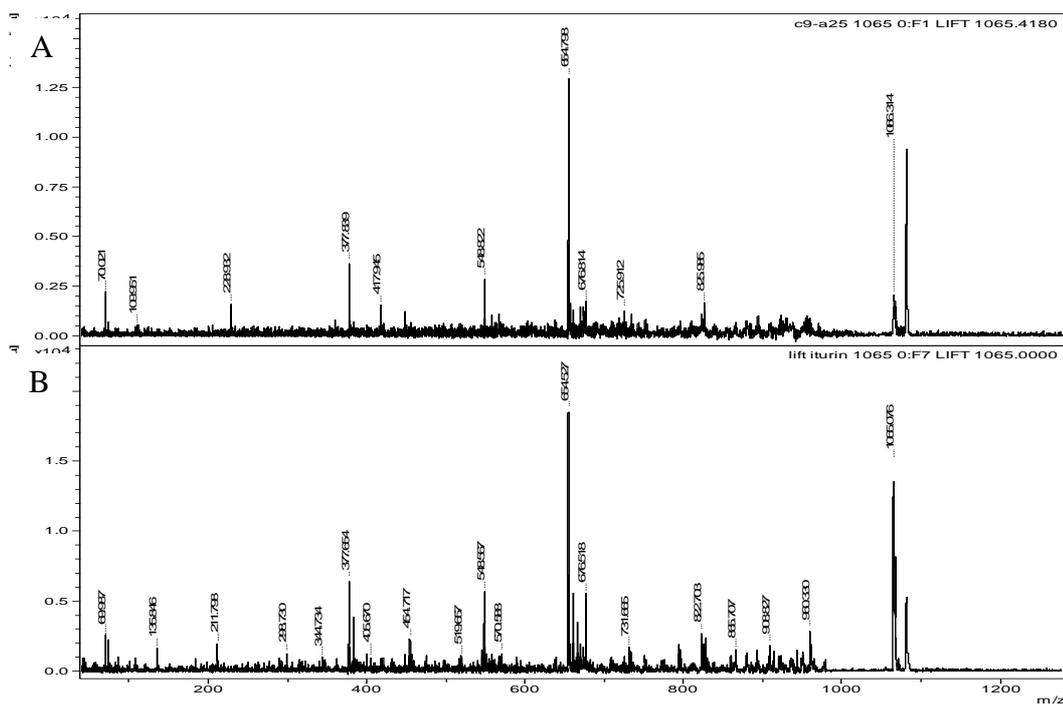
**Figura 34.** Espectro MS da fração ativa 38 proveniente da cromatografia de fase reversa C<sub>18</sub> HPLC (corrida 6). Atribuição dos picos ( $m/z$ : Srfactina (Srf) A C<sub>15</sub> (1036,8  $[M+H]^+$ , 1058,8  $[M+Na]^+$ , 1074,8  $[M+K]^+$ ); Srf A C<sub>16</sub> (1050,8  $[M+H]^+$ , 1072,8  $[M+Na]^+$ , 1088,8  $[M+K]^+$ ) e possivelmente Srf A C<sub>17</sub> (1064,8  $[M+H]^+$ , 1086,8  $[M+Na]^+$ , 1102,8  $[M+K]^+$ ).

Para a surfactina e iturina, que possuem padrões comerciais, foram feitas fragmentação MS/MS de alguns íons moleculares destes padrões. A fragmentação MS/MS foi também feita para íons moleculares de extratos obtidos em diferentes corridas cromatográficas. Os melhores resultados foram selecionados e são mostrados nas figuras 35 e 36 para surfactina e iturina, respectivamente. A figura 35A mostra o perfil de fragmentação

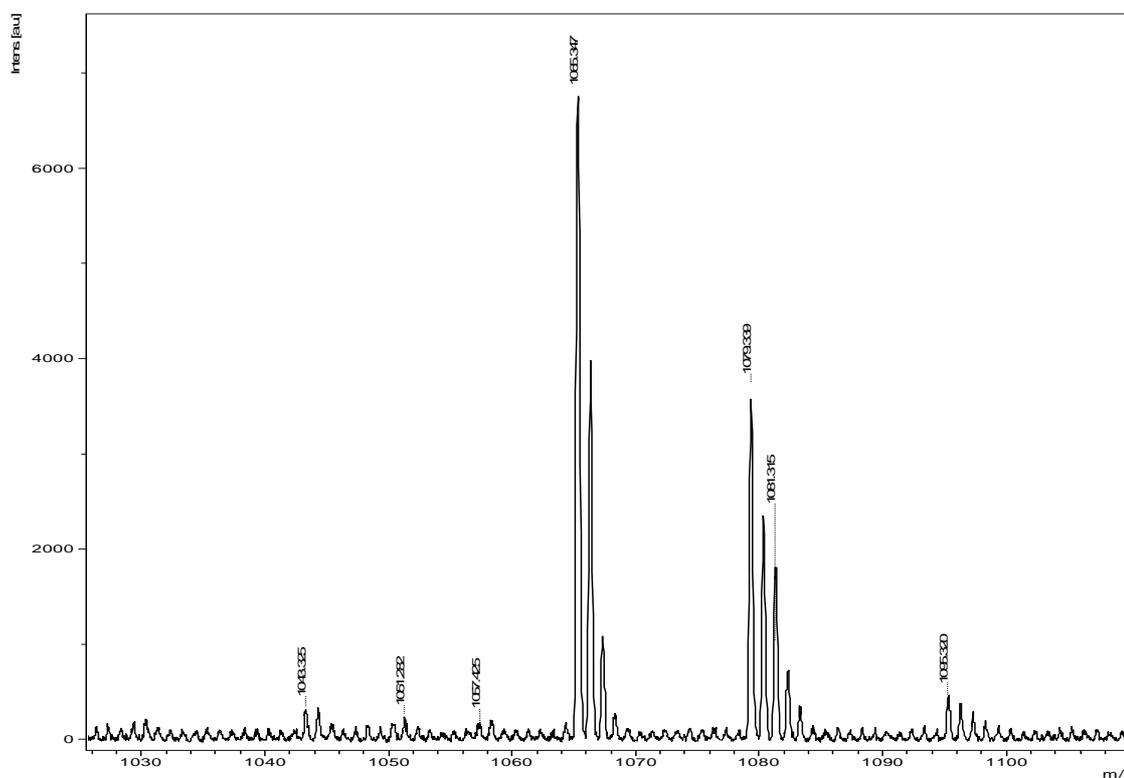
do íon precursor  $m/z$  1030,4 obtido da fração ativa 4 da cromatografia de fase reversa (corrida 7). A figura 35B mostra a fragmentação do íon molecular  $m/z$  1030,0 do padrão comercial de surfactina Na. Na comparação destes espectros MS/MS observa-se íons produtos em comuns:  $m/z$  923, 684 (pico base), 595, 553, 440, 351, 227, 199, 102, 86 e 72. As fragmentações dos íons precursores de iturina  $m/z$  1066,3 da fração ativa 25 (corrida 10) e do padrão comercial (Sigma-Aldrich) são mostrados na figura 36 A e B, respectivamente. Pode-se observar íons produtos comuns:  $m/z$  677, 655 (pico base), 549 e 378.



**Figura 35.** Comparação dos perfis de fragmentação MS/MS do íon precursor  $m/z$  1030,4 (Srf A  $C_{14}$  ou Srf B  $C_{15}$   $[M+Na]^+$ ) de uma fração ativa obtida por cromatografia de fase reversa (A) ao perfil de fragmentação do íon  $m/z$  1030,0 do padrão Sigma-Aldrich (B).



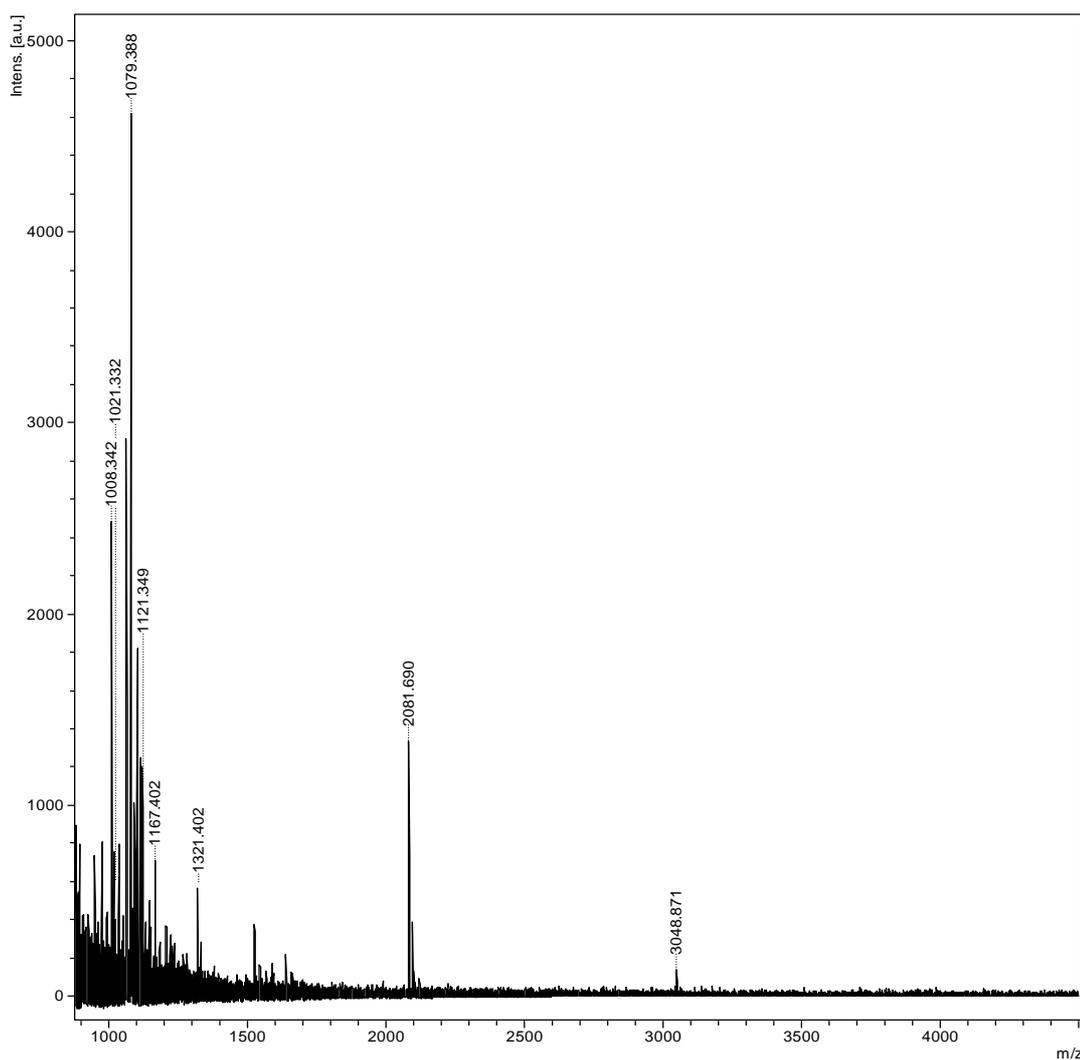
**Figura 36.** Comparação dos perfis de fragmentação MS/MS do íon precursor  $m/z$  1066,3 (iturina  $C_{14}$  ou  $[M+Na]^+$ ) de uma fração ativa obtida por cromatografia de fase reversa (A) ao perfil de fragmentação do íon  $m/z$  1066,1 do padrão Sigma-Aldrich (B).



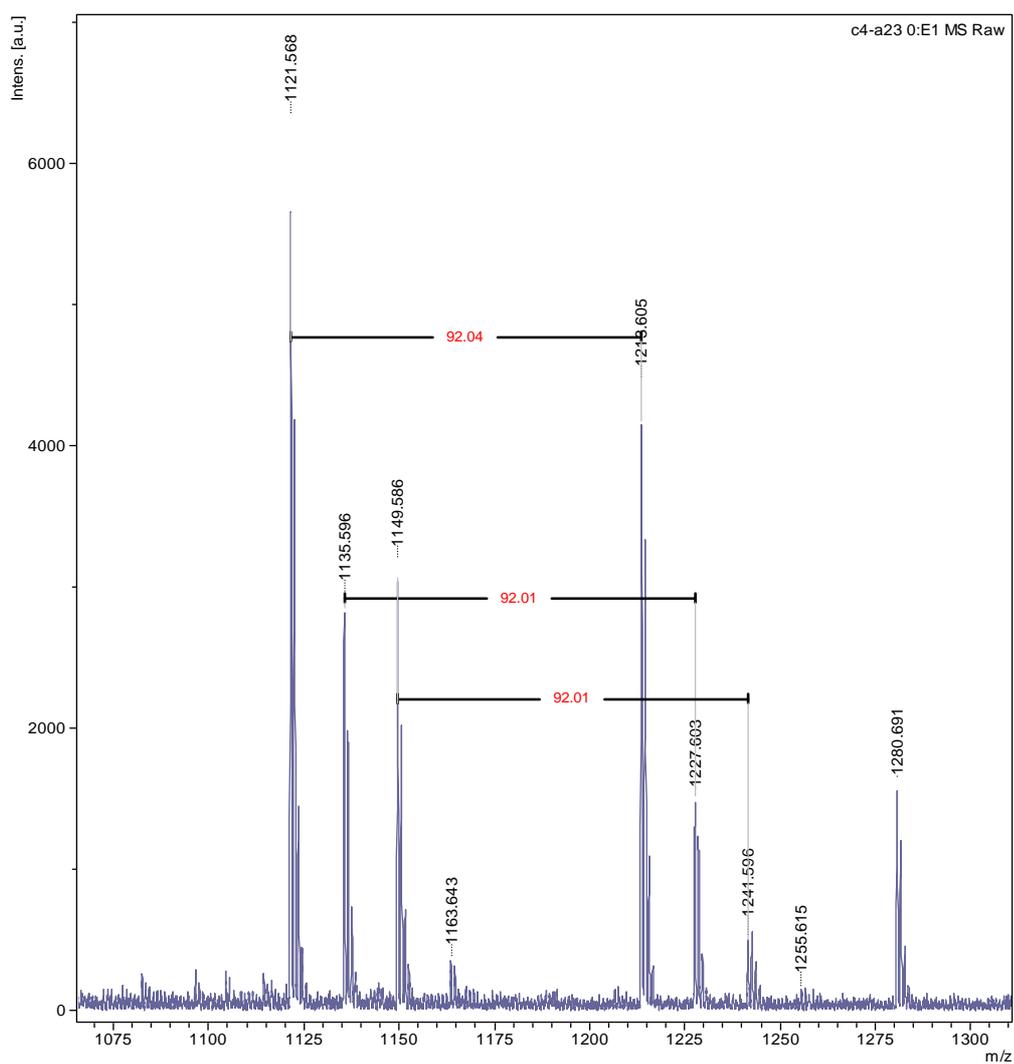
**Figura 37.** Espectro MS da fração ativa 24 proveniente da cromatografia de fase reversa  $C_{18}$  HPLC (corrida 8). Atribuição dos picos ( $m/z$ : 1043,3 ( $C_{14}$  iturina  $[M+H]^+$ ); 1057,4 ( $C_{15}$  iturina  $[M+H]^+$ ); 1065,3 ( $C_{14}$  iturina  $[M+Na]^+$ ); 1079,3 ( $C_{15}$  iturina  $[M+Na]^+$ ); 1081,3 ( $C_{14}$  iturina  $[M+K]^+$ ); 1095,3 ( $C_{15}$  iturina  $[M+K]^+$ ).

A figura 37 mostra um exemplo de espectro MS da fração ativa 24 obtida do extrato butanólico do sobrenadante de cultura de *Bacillus* sp. P5 no tempo de cultivo de 36 h (corrida 9). Foram detectados os seguintes íons moleculares:  $m/z$  1043,3 (C14 iturina  $[M+H]^+$ ); 1065,3 (C14 iturina  $[M+Na]^+$ ); 1081,3 (C14 iturina  $[M+K]^+$ ); 1057,4 (C15 iturina  $[M+H]^+$ ); 1079,3 (C15 iturina  $[M+Na]^+$ ); e 1095,3 (C15 iturina  $[M+K]^+$ ). Íons moleculares cujas atribuições correspondem a componentes da família da iturina como a bacilomicina ( $m/z$  1021,3 C<sub>14</sub> bac,  $[M+H]^+$ ) foram detectados apenas na fração 24 da corrida 10, encontrando-se também nesta mesma fração a micosubtilina ( $m/z$  1121,6 C<sub>18</sub> mic,  $[M+Na]^+$ ). Este resultado é mostrado na figura 38. A micosubtilina foi, ainda, encontrada nas corridas de número 3, 4, 8 e 10, e outro exemplo é mostrado na figura 39.

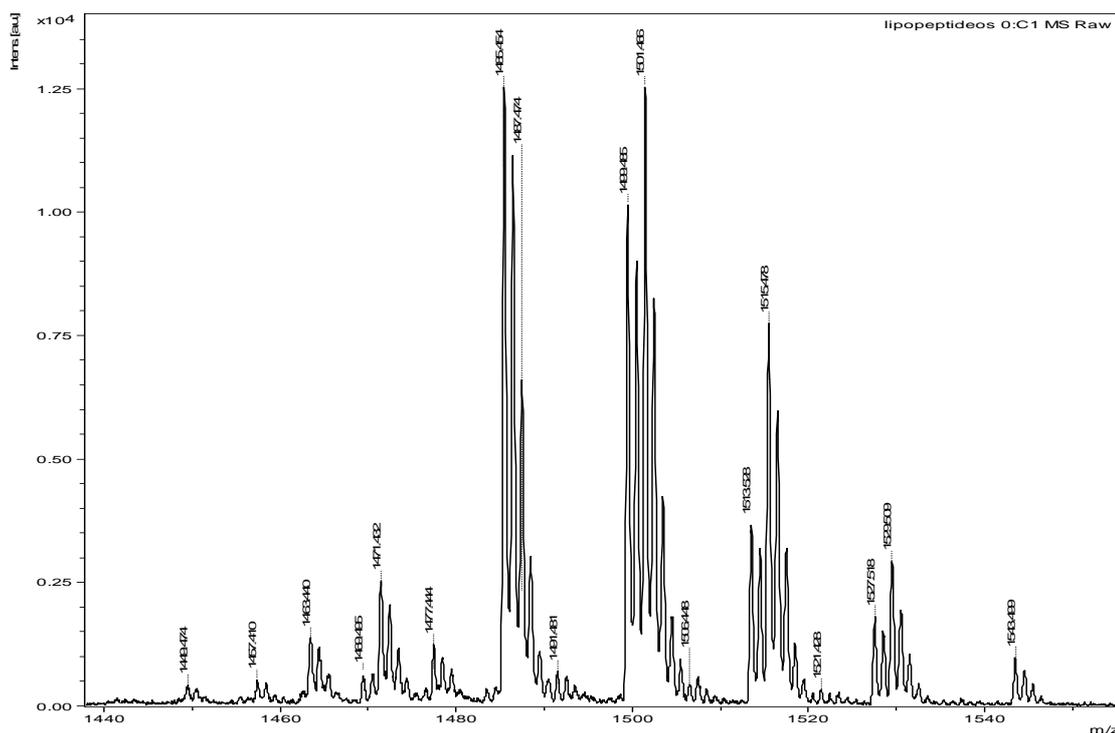
A figura 39 mostra o espectro proveniente da corrida 5, fração ativa 23, no qual se observa os picos (1135,6; 1121,3; 1149,6 e 1163,6) que diferem entre si de 14 Da, sendo que apenas os dois primeiros têm atribuições conhecidas C<sub>19</sub> mic,  $[M+Na]^+$  e C<sub>18</sub>  $[M+Na]^+$ , respectivamente. Além disso, os picos citados diferem da série (1213,6; 1227,6; 1241,6; 1255,6) em 92 Da, sugerindo que esse conjunto de 8 picos represente uma série homóloga.



**Figura 38.** Espectro MS da fração ativa 24 proveniente da cromatografia de fase reversa C18 HPLC (corrida 9). Atribuição dos picos ( $m/z$ : Surfactina (Srf) A C<sub>13</sub> ou (Srf) B C<sub>14</sub> (1008,3 [M+H]<sup>+</sup>), Bacilomicina (bac) C<sub>14</sub> (1021,3 [M+H]<sup>+</sup>, Micosubtilina (mic) C<sub>18</sub> (1121,3 [M+Na]<sup>+</sup>). Os picos 1167,4; 1321,4; 2081,7 e 3048,9 não possuem atribuições conhecidas.



**Figura 39.** Espectro MS da fração ativa 23 proveniente da cromatografia de fase reversa C18 HPLC (corrida 5). Atribuição dos picos ( $m/z$ : Micosubtilina (mic) C<sub>18</sub> (1121,3 [M+Na]<sup>+</sup>), (mic) C<sub>19</sub> 1135,6 [M+Na]<sup>+</sup>).



**Figura 40.** Espectro MS da fração ativa 37 de uma cromatografia de fase reversa C18 HPLC (corrida 7). Atribuição dos picos de fengicina  $m/z$ : 1449,5 C<sub>15</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1463,4 C<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1471,4 C<sub>15</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1477,4 C<sub>17</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1485,4 C<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup> (pico base); 1487,5 C<sub>15</sub> [M+K]<sup>+</sup>; 1491,5 C<sub>16</sub> Val [M+H]<sup>+</sup>; 1499,5 C<sub>17</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1501,4 C<sub>16</sub> [M+K]<sup>+</sup>; 1506,4 C<sub>17</sub> Val [M+H]<sup>+</sup>; 1513,5 C<sub>16</sub> Val [M+Na]<sup>+</sup>; 1515,5 C<sub>17</sub> [M+K]<sup>+</sup>; 1527,5 C<sub>17</sub> Val [M+Na]<sup>+</sup>; 1529,5 C<sub>16</sub> Val [M+K]<sup>+</sup>; 1543,5 C<sub>17</sub> Val [M+K]<sup>+</sup>.

A figura 40 mostra o espectro MS da fração 37 obtida por precipitação ácida do sobrenadante da cultura no tempo de cultivo de 30 h (corrida 7). As seguintes séries homólogas de fengicina foram detectadas:

- 1) Séries contendo Ala<sup>6</sup> (Fgy A), espécies monoprotonada e adutos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>: (1449,5 C<sub>15</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1471,4 C<sub>15</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1487,5 C<sub>15</sub> [M+K]<sup>+</sup>); (1463,4 C<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1485,4 C<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1501,4 C<sub>16</sub> [M+K]<sup>+</sup>); (1477,4 C<sub>17</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1499,5 C<sub>17</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1515,5 C<sub>17</sub> [M+K]<sup>+</sup>);
- 2) Séries contendo Val<sup>6</sup> (Fgy B), espécie monoprotonada e adutos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>: (1477,4 C<sub>15</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1499,5 C<sub>15</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1515,5 C<sub>15</sub> [M+K]<sup>+</sup>); (1491,5 C<sub>16</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1513,5 C<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1529,5 C<sub>16</sub> [M+K]<sup>+</sup>); (1506,4 C<sub>17</sub> [M+H]<sup>+</sup>; 1527,5 C<sub>17</sub> [M+Na]<sup>+</sup>; 1543,5 C<sub>17</sub> [M+K]<sup>+</sup>).

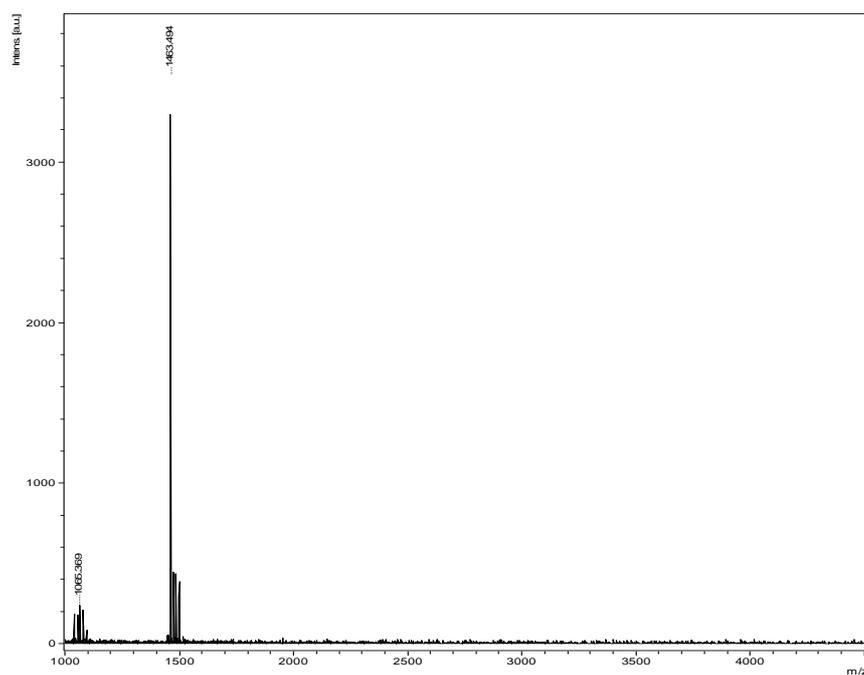
Os íons moleculares de  $m/z$  1477, 1499 e 1515 podem ser atribuídos a Fgy A C<sub>17</sub> ou Fgy B C<sub>15</sub>.

#### 5.3.1.1.1 Detecção de lipopeptídeos na matriz alimentar puba

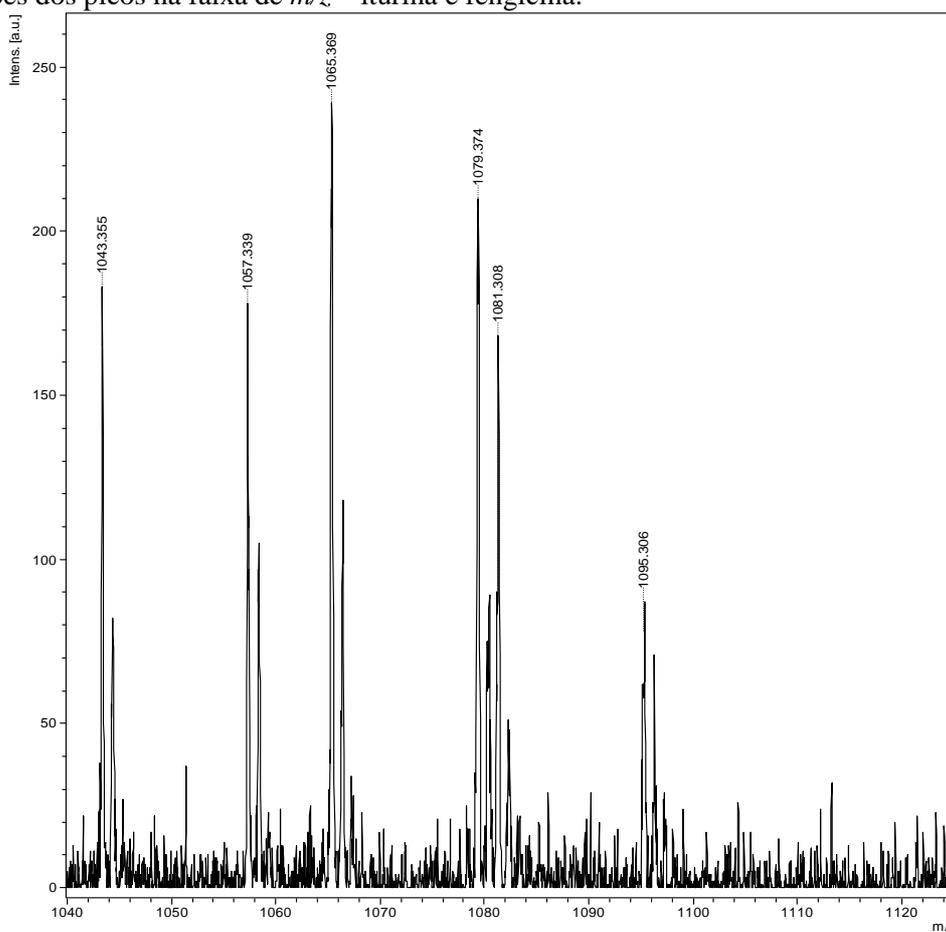
Na matriz alimentar puba foram encontrados picos com  $m/z$  correspondente a espécies moleculares monoprotionadas e adutos  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  dos lipopeptídeos iturina e fengicina. Os melhores resultados foram obtidos a partir do extrato da suspensão aquosa de puba quando comparado ao extrato da puba suspensa apenas em butanol. Serão mostrados apenas os cromatogramas obtidos da suspensão aquosa de puba. Na figura 41 são observados dois grupos de íons moleculares que podem ser atribuídos às iturinas ( $m/z$  1043-1095) e às fengicinas ( $m/z$  1449,5 - 1515,4), não sendo detectados íons para surfactina (994-1088) e nem para as possíveis bacteriocinas (3000-4500). O espectro MS ampliado para a faixa de  $m/z$  prevista para iturinas é mostrado na figura 42 com os seguintes íons moleculares:  $m/z$  1043,4 (iturina C14  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ); 1057,33 (iturina C15  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ); 1065,36 (iturina C14  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ); 1079,37 (iturina C15  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ); 1081,30 (iturina C14  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ) e 1095,30 (iturina C15  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ).

O espectro  $m/z$  para a região das fengicinas é mostrado na figura 43 e os seguintes íons moleculares foram detectados: 1449,5 (fengicina C15  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ); 1463,5 (fengicina C16  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ); 1477,5 (fengicina C17- Ala ou fengicina C15 - Val  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ); 1501,5 (fengicina C16 - Ala  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ); 1515,5 (fengicina C15 - Val  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ).

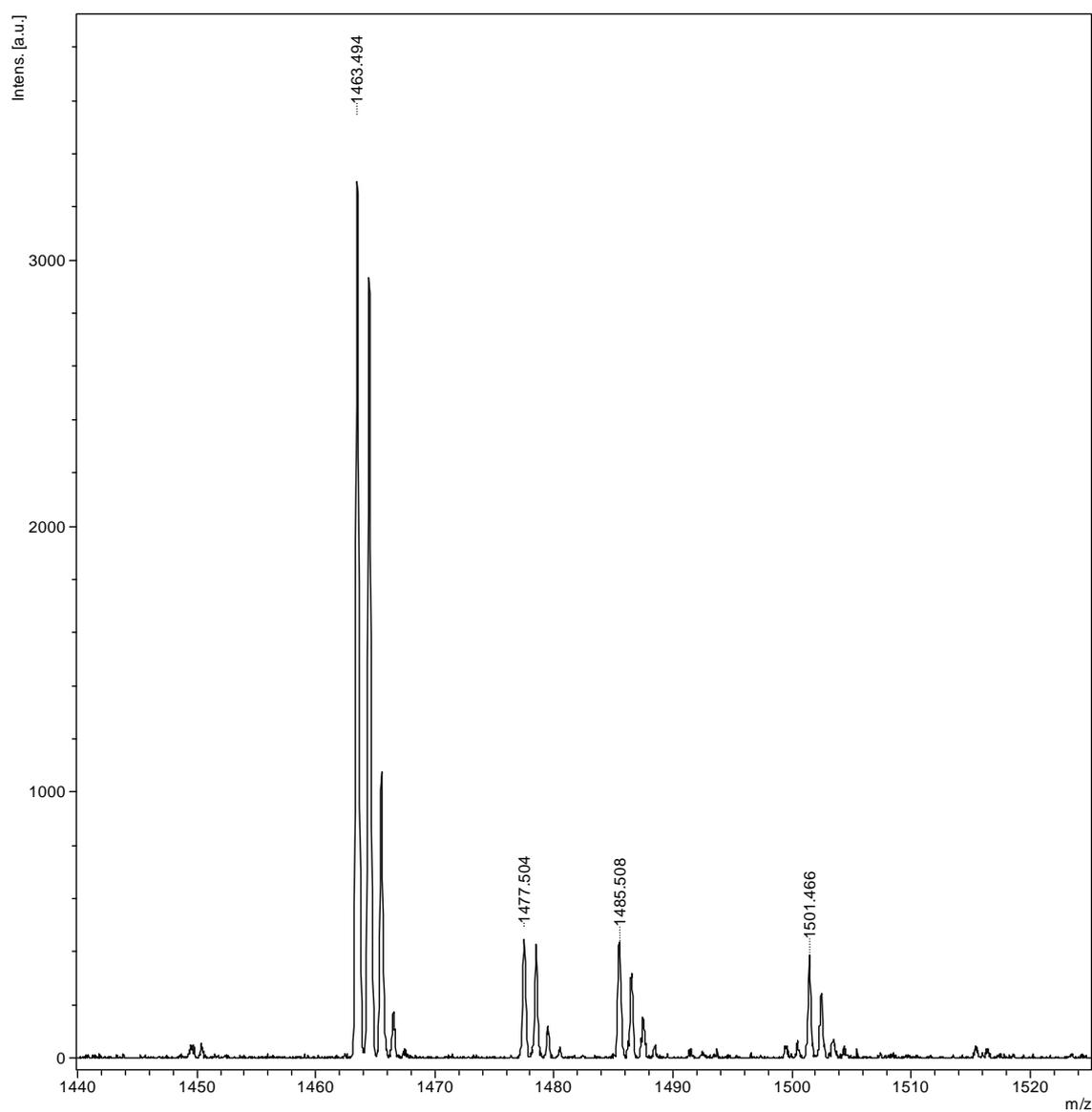
A figura 44 mostra que a fragmentação do íon precursor 1478,5 (C15 fengicina A - presença de Ala na posição 6 do anel peptídico) gerou os íons produtos  $m/z$  1079,9 e 965,8. A figura 45 mostra que a fragmentação do íon precursor 1492,9 (C16 fengicina B - presença de Val na posição 6 do anel peptídico) gerou apenas o íon produto  $m/z$  994,1, não sendo detectado o íon  $m/z$  1108. Os biomarcadores de *B. globigii* (*B. subtilis niger*) correspondentes às massas ( $m/z$  1463,5 e 1477,5) foram detectados tanto na puba quanto no meio de cultura.



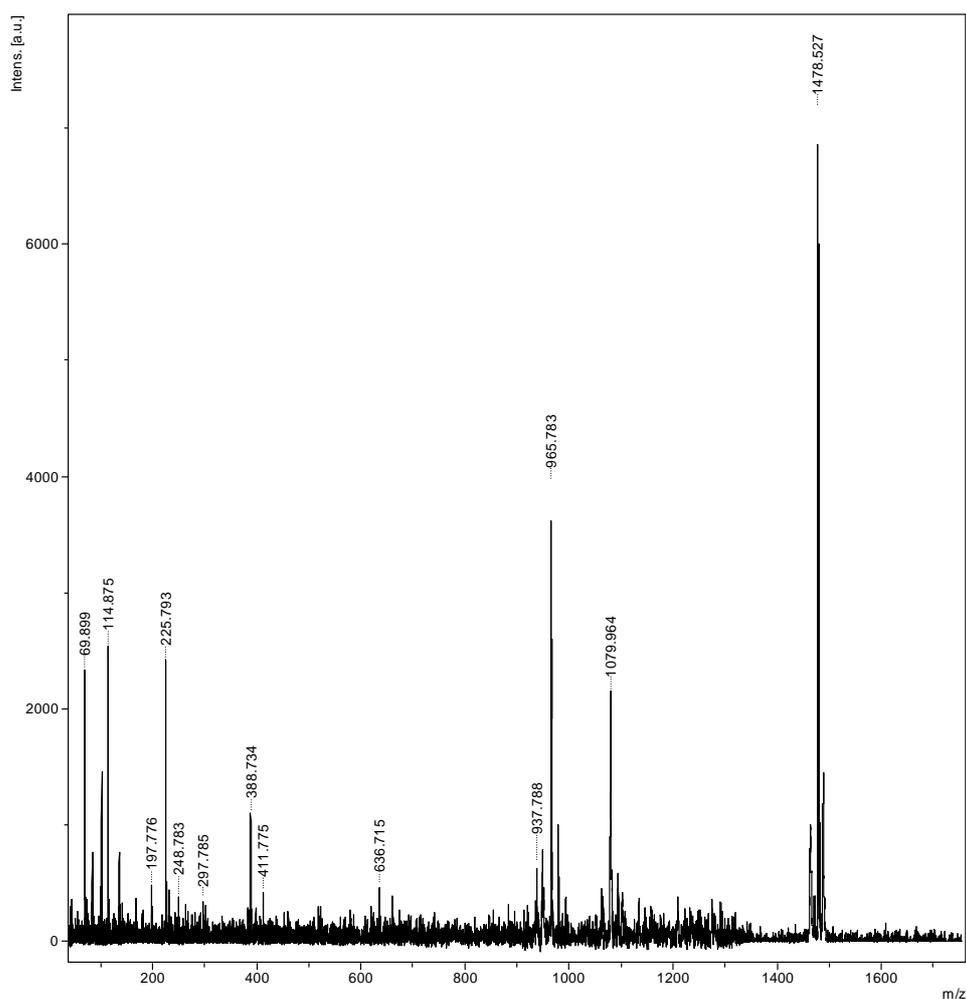
**Figura 41.** Espectros MS da suspensão aquosa de puba extraída por butanole concentrada em ZipTip® C18. Atribuições dos picos na faixa de  $m/z$  – iturina e fengicina.



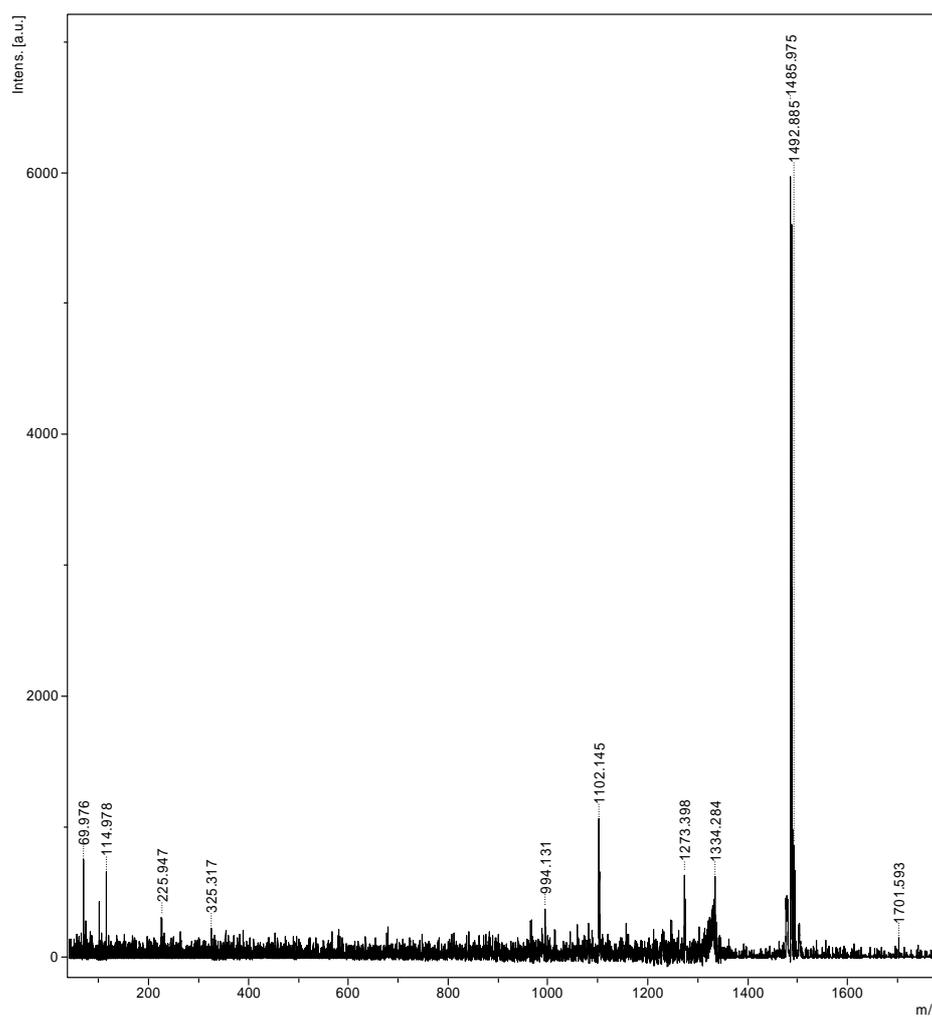
**Figura 42.** Espectros MS da suspensão aquosa de puba extraída por butanole concentrada em ZipTip® C18. Atribuições dos picos  $m/z$  – Iturina (Itu)  $C_{14}$ (1043.4  $[M+H]^+$ , 1065.5  $[M+Na]^+$ , 1081.5  $[M+K]^+$ ); Itu  $C_{15}$ (1057.5  $[M+H]^+$ , 1079.6  $[M+Na]^+$ , 1095.5  $[M+K]^+$ ).



**Figura 43.** Espectros MS da suspensão aquosa de puba extraída por butanole concentrada em ZipTip® C18. Atribuições dos picos  $m/z$  – Fencicina (Fen) C<sub>16</sub> (1463.5 [M+H]<sup>+</sup>; Fen C<sub>17</sub>-Ala ou Fen C<sub>15</sub>-Val 1477,5[M+H]<sup>+</sup>; 1485.5 [M+Na]<sup>+</sup>; 1501.5 [M+K]<sup>+</sup>).



**Figura 44.** Perfil de fragmentação MS/MS do íon precursor 1478,5 (C15 fengicina A – presença de Ala na posição 6 do anel peptídico) gerou os íons produtos biomarcadores de fengicina A:  $m/z$  1079,9 e 965,8.



**Figura 45.** Perfil de fragmentação MS/MS do íon precursor 1492,9 (C16 fengicina B – presença de Val na posição 6 do anel peptídico) gerou o íon produto biomarcador de fengicina B:  $m/z$  994,1.

## 6 DISCUSSÃO

Uma variedade de lipopeptídeos e de bacteriocinas produzidos por bactérias Gram-positivas têm atraído a atenção para o seu uso potencial em diversas áreas. *Bacillus* spp. parecem ser uma fonte relativamente abundante de compostos antimicrobianos, uma vez que muitas espécies deste gênero sintetizam peptídeos e lipopeptídeos com esta importante atividade biológica (GEBHARDT et al., 2002; STEIN, 2005). Além disso, as bacteriocinas produzidas por *Bacillus* spp. demonstram uma diversidade distinta em suas atividades inibitórias e têm sido estudadas em espécies diferentes, incluindo *Bacillus subtilis* (KAWULKA et al., 2004; TAMEHIRO et al., 2002), *Bacillus licheniformis* (PATTNAIK et al., 2001), *Bacillus cereus* (BIZANI; BRANDELLI, 2002) entre outros.

Neste trabalho, dois isolados, identificados como *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5, foram recuperados de puba, um alimento naturalmente fermentado de raízes de mandioca. Embora a microbiota dominante da puba seja constituída por bactérias lácticas e por leveduras (CRISPIM et al., 2013), diferentes espécies de bacilos foram isoladas de produtos brasileiros fermentados de mandioca como o polvilho azedo (LACERDA et al., 2005), o cauim (ALMEIDA et al., 2007) e o caxiri (SANTOS et al., 2012). O isolamento de bacilos também foi observado em produtos africanos similares à puba, como *lafum* (OYEWOLE; ODUNFA, 1988; PADONOU; HOUNHOUGAN; NAGO et al., 2009) e *foo-foo* (OKAFOR et al. 1984). Provavelmente, a razão de o gênero *Bacillus* ocorrer em diferentes alimentos naturalmente fermentados de mandioca seja devido a colonização endofítica das raízes de mandioca por estes micro-organismos. Teixeira et al. (2007) isolaram diferentes espécies como *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* e *B. sphaericus* das raízes, caules e folhas de mandiocas coletadas nos estados de São Paulo, Bahia e Amazonas. *Bacillus* sp. P5 foi selecionado para estudos posteriores e apresentou destaque em diversos testes tendo algumas substâncias isoladas.

A identificação de bacilos no nível de espécie é complexa e usualmente técnicas fenotípicas, quimiotaxonômicas e genotípicas são usadas. Desta forma, as três abordagens foram empregadas para identificar as colônias recuperadas a partir da massa puba. A identificação presuntiva das colônias isoladas no agar MPY como sendo *Bacillus* spp. foi confirmada pelos testes fenotípicos. A chave dos recursos de diagnóstico considerados para a contagem das linhagens de *B. cereus* baseiam-se na sua capacidade de provocar hidrólise da

lecitina e em uma incapacidade de fermentar o manitol. Embora estes testes tenham melhorado a identificação presuntiva de *B. cereus*, linhagens atípicas para estas duas características que foram descritas levariam a erros de identificação. Por exemplo, em torno de 1% das linhagens de *B. cereus* são positivas para a fermentação do manitol de acordo com os perfis API (API manual, Biomérieux). Além disso, a transcrição de várias proteínas extracelulares, incluindo fosfolipases, proteases e hemolisinas em *B. cereus* e *B. thuringiensis* está sob o controle de um regulador pleiotrópico codificado pelo gene *plcR*. Mutações nesse gene têm sido associadas ao fenótipo de hemólise negativa em *B. anthracis* ou fenótipo de hemólise e lecitinase negativas no grupo *B. cereus* (AGAISSE et al. 1999). Além disso, hemólise, em ágar sangue também tem sido descrita em isolados de alimentos pertencentes a espécies que não são incluídos no grupo *B. cereus*, como *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* (OUOBA et al. 2008).

Os isolados *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5 apresentaram resultados positivos para fermentação da glicose, motilidade, redução de nitrato, hemólise em ágar sangue e catalase. Para o teste de Voges-Proskauer, que tem o objetivo de determinar a capacidade dos microorganismos produzirem produtos finais não ácidos ou neutros, como o acetilmetilcarbinol, a partir dos ácidos orgânicos que resultam da metabolização da glicose, o teste foi positivo para *Bacillus* sp. P5, enquanto que para *Bacillus* sp. C3 foi negativo. Para *Bacillus cereus* ATCC 14579 este teste é positivo, assim como para *B. mycoides* e *B. anthracis*. Para *B. thuringiensis* este teste apresenta de 11 a 89% de linhagens que são positivas (SNEATH, 1986). O teste de resistência a lizozima mostrou positividade para *Bacillus* sp. P5 enquanto para *Bacillus* sp. C3 foi negativo, porém *B. cereus* é positivo para este teste. Nenhuma das duas linhagens apresentou crescimento rizoidal característico de *B. mycoides* e também não apresentou cristais de toxina (cristal para-esporo) que é característico para a maioria das linhagens de *B. thuringiensis* (11 a 89% de linhagens) (SNEATH, 1986).

Deste modo os testes bioquímicos, na maioria dos casos identificam apenas “*B. cereus* e *B. subtilis* no nível de grupo”, ou mesmo apenas no nível de gênero (MARTÍNEZ-BLANCH et al., 2011). Este fato foi também afirmado por outros autores. Guinebretière et al. (2001) observaram discrepâncias entre a identificação por API e por métodos moleculares (sequenciamento de 16S rRNA) em 23% das linhagens de *B. cereus*. Neste estudo a análise de perfis obtidos por API e naqueles baseados em PCR não separou as linhagens de diferentes espécies ou mesmo entre os biotipos *B. cereus* 1 e *B. cereus* 2. Assim, nossos dados mostraram que a identificação pelos kits API 50 CHB e API

20E, também, não permitiram separar o isolado C3, que foi identificado posteriormente como *Bacillus cereus* 1/*thuringiensis* (99,1% ID) e o isolado P5, que foi identificado como *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (99.8% ID).

A identificação quimiotaxonômica por meio do Sistema de Identificação Microbiana (MIS, MIDI) baseia-se na análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). É um método padrão para a identificação de micro-organismos, especialmente para isolados ambientais. Nesta técnica os ácidos graxos de células inteiras são convertidos em ésteres metílicos e analisados por cromatografia de fase gasosa. A composição de ácidos graxos do micro-organismo desconhecido é comparada a uma biblioteca com organismos conhecidos, a fim de se encontrar a correspondência mais próxima. Este sistema é capaz de identificar mais de 1500 espécies de bactérias comparando-se os picos obtidos pela análise cromatográfica da bactéria a ser identificada através de nomeação precisa de picos, algoritmos sofisticados de reconhecimento de padrões e extenso banco de dados microbiano (TESKA et al., 2003; BUYER, 2006), constituindo assim uma ferramenta bastante útil no auxílio à identificação de espécies do gênero *Bacillus*. O isolado C3 foi identificado por esta técnica como *Bacillus thuringiensis* GC subgrupo A, enquanto o isolado P5 não pode ser identificado por apresentar SI <0,5.

Observa-se que a composição celular de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) dos isolados demonstrou como principais ácidos graxos apresentados por *Bacillus* sp. C3 iso-C15:0 e iso-C17:0, enquanto que para o *Bacillus* em sp. P5 foi anteiso-C15:0; iso-C15:0, iso-C17:0 e anteiso-C17:0. Guerra-Cantera; Raymundo (2005) também observaram que a maior proporção de ácidos graxos presentes nos 58 isolados de *Bacillus* depositados na Coleção Nacional de Micro-organismos das Filipinas foi iso-C15:0, bem como iso-C14:0, iso-C16:0, anteiso-C17:0 e iso-C17:0 como componentes menores. Outros isolados apresentaram anteiso-C15:0, como o principal ácido graxo, exatamente como foi encontrado para o nosso isolado de *Bacillus* sp. P5. As espécies identificadas, por este grupo nas Filipinas, compreenderam *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *Paenibacillus larvae*, *P. lentimorbus* e *Brevibacillus laterosporus*.

Quanto à identificação por meio de técnicas moleculares, mesmo com as melhorias recentes na aplicabilidade de abordagens moleculares para filogenia microbiana, como o sequenciamento baseado na análise de 16S rDNA, este não tem sido capaz de discriminar espécies intimamente relacionadas dentro deste grupo (YAMADA et al., 1999; LOGAN et al., 2009). Assim, através do sequenciamento do gene rRNA 16S obtivemos 99% de identidade

com as espécies *B. cereus* e *B. thuringiensis* com 1507 pb e 1420 pb, para *Bacillus* sp. C3 e *Bacillus* sp. P5, respectivamente. Filogeneticamente *Bacillus* sp. C3 foi agrupado em conjunto com os membros do grupo *B. cereus*, com uma similaridade de 100%, demonstrando uma identidade de 76% com *B. thuringiensis*, enquanto que *Bacillus* sp. P5 apresentou 92% de identidade com *B. amyloliquefaciens*.

A identificação bacteriana baseada na análise da sequência do gene 16SrRNA apresenta algumas limitações como, por exemplo, a presença de múltiplas cópias desse gene numa mesma linhagem bacteriana que podem diferir na sequência, levando a identificação de múltiplos ribotipos de um único micro-organismo. A extensão da heterogeneidade intragenômica do gene 16S rRNA entre bactérias varia de 0 a 11,6% de divergência na sequência para 1 a 15 cópias do gene 16S rRNA, o que parece afetar a escala fina da filogenia de organismos próximos (CASE et al., 2007). Outra limitação desta metodologia é o fato de espécies diferentes poderem compartilhar identidade completa da sequência do gene 16S rRNA (SATOMI; La DUC; VENKATESWARAN, 2006, LOGAN et al., 2009).

Deste modo, é recomendada a análise da sequência de outros genes conservados do genoma bacteriano (genes *housekeeping*) para análises taxonômicas e identificação, complementando a informação obtida com o sequenciamento do gene 16S rRNA (STACKEBRANDT et al., 2002, WANG et al., 2007, LOGAN et al., 2009). Dentre os genes conservados, os genes codificadores de proteína vêm sendo utilizados como critério molecular para delimitação de espécies, juntamente com o sequenciamento do gene 16S rRNA e com a hibridização DNA-DNA (STACKEBRANDT et al., 2002). Como exemplos de genes que oferecem possibilidades de serem utilizados para fins taxonômicos e de identificação de várias espécies bacterianas estão: *rpoB*, *gyrB*, *groEL*, *recA* entre outros (PETTI, 2007). O uso de um gene cópia única para análise de comunidades é um marco importante na ecologia microbiana porque isso pode permitir uma medição acurada da diversidade e da relação filogenética, evitando perda na resolução filogenética e falhas na medição da diversidade devido à presença de heterogeneidade intragenômica. Um bom marcador filogenético não pode ser transferido horizontalmente e apresenta algumas regiões conservadas que decifram relações filogenéticas entre organismos distantes e também regiões mais variáveis, que são usadas para diferenciar relações entre organismos fortemente relacionados (CASE et al., 2007). No entanto, a análise da sequência desses genes *housekeeping* apresenta como limitação a ausência de sequências de referência em bancos de dados.

De fato, a taxonomia do denominado grupo *B. cereus* não foi ainda completamente elucidada. Espécies deste grupo compreendem, atualmente, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. mycoides* apresentando uma estreita e notável proximidade genética. Devido às características fenotípicas indistinguíveis e as características genotípicas destes organismos, Ash et al. (1991) consideram que *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. anthracis* são subespécies de *B. cereus*. Mais recentemente, o denominado grupo *Bacillus cereus*, também chamado de *B. cereus latu sensu*, foi proposto por Maughan e Auwera (2011) como taxonomicamente ambíguo e incluindo seis espécies estreitamente relacionadas *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. cytotoxicus*. A identificação inequívoca do *B. cereus sensu stricto* em nível de espécie exige assim técnicas mais sofisticadas como hibridização DNA/DNA, só possível em laboratórios especializados e não é adequado para a rotina de análises em indústrias de alimentos, por exemplo (MARTÍNEZ-BLANCH et al., 2011).

Da mesma forma, a taxonomia do grupo *B. subtilis*, o grupo mais extensivamente estudado dentro deste gênero, é complexa e difícil de separar incluindo espécies como, por exemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. vallismortis* e *B. atrophaeus*. Interessantemente, a maioria destas espécies, compartilham um nível extraordinariamente elevado de similaridade na sequência do gene rRNA 16S (frequentemente 99% ou mais) com *B. subtilis* mesmo que os valores de hibridação DNA-DNA estejam abaixo de 70% (ROONEY et al., 2009). Assim, refere-se a estas bactérias como um conjunto complexo de espécies do grupo *B. subtilis* demonstrando que os métodos moleculares, depois que as fronteiras entre as espécies membros deste grupo são difíceis de definir, obrigam-nos a repensar nossas descrições atuais destas e de outras espécies de *Bacillus* (MAUGHAN; AUWERA, 2011). Outras análises como a detecção de genes como *gyrA* e/ou *gyrB* e hibridização DNA/DNA seriam necessárias para a confirmação e identificação final das espécies estudadas neste trabalho.

Neste estudo, *Bacillus* sp. P5 foi selecionado para estudos posteriores, uma vez que demonstrou atividade inibitória *in vitro* contra várias linhagens de micro-organismos Gram-positivos e alguns Gram-negativos, com destaque para bactérias intimamente relacionadas, como as do gênero *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) bem como para diversas linhagens de *Listeria monocytogenes*, além de inibir *Listeria innocua*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, os fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Aspergillus fumigatus* e a levedura *Candida tropicalis*.

*Bacillus* sp. C3 inibiu poucos micro-organismos e, ainda, alguns destes tiveram um halo de inibição parcial que foram denominados de halos nublados. Alguns valores de halos de inibição encontrados neste trabalho para *Bacillus* sp. P5 foram bastante semelhantes aos encontrados por Singh; Cameotra (2004) que encontraram, para *B. subtilis* MTCC 121 e *Candida albicans*, halos variando entre 9-11 mm para os dois micro-organismos, enquanto que, os nossos resultados, para a inibição de cinco linhagens distintas de *B. subtilis* variaram de 6 a 13 mm e para *Candida* sp. foi de 10 mm.

Motta (2006) também encontrou inibição de bactérias do mesmo gênero como *Bacillus cereus*, assim como várias linhagens de *Listeria* sp., incluindo *Listeria monocytogenes* e outros patógenos importantes do ponto de vista de segurança alimentar por uma linhagem de *Bacillus* sp. P34. Resultados semelhantes foram encontrados também por Bizanni; Brandelli (2002) onde uma espécie de *Bacillus cereus* 8A, posteriormente caracterizada e identificada como produtora de uma bacteriocina denominada cereína, inibiu diversos micro-organismos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* e diversas espécies de *Bacillus*, além de inibir *Streptococcus bovis* e *Micrococcus luteus*. Espécies de *Bacillus* são amplamente conhecidas como produtoras de metabólitos com propriedades antimicrobianas. Normalmente, as três diferentes classes de peptídeos bioativos que podem ser distinguidas são compostos tais como peptídeos antifúngicos como bacilisina erizotocina; peptídeos antifúngicos como surfactinas, iturinas e fengicinas e polipeptídeos, tais como antimicrobianos como a subtilina (PABEL et al.2003).

A sensibilidade das linhagens de *L. monocytogenes* observada sugere a elevada efetividade da possível bacteriocina não purificada, bem como da surfactina parcialmente purificada, produzida por *Bacillus* sp. P5 como agente antimicrobiano contra este importante patógeno. Conforme anteriormente já descrito por Motta (2006), a bacteriocina produzida por *Bacillus* sp. P34 possui efeito bactericida e bacteriolítico sobre *L.monocytogenes* ATCC 7644 pela diminuição das células viáveis durante a fase exponencial de crescimento celular bacteriano. Outras bacteriocinas como a bacteriocina 8AI produzida por *Bacillus cereus* 8A também demonstrou efeito anti-listerial. Esta bacteriocina também inibiu *L.monocytogenes* ATCC 7644 quando incorporada em embalagens de polietileno e poliestireno expandido usadas na industrialização de alimentos (BIZANI; MORRISY; BRANDELLI, 2002). De Araujo (2011) e Sabaté; Audisio (2013) demonstraram que a surfactina também possui atividade contra *L. monocytogenes*.

Bacteriocinas produzidas por *B. thuringiensis* também têm sido descritas em diversos estudos e podem apresentar diferentes configurações estruturais. Esta espécie é amplamente empregada na agricultura produzindo uma diversidade de compostos extracelulares como fosfolipases, quitinases, proteases, exotoxinas, proteínas com propriedades inseticidas e compostos antibióticos com propriedades antifúngicas. Quanto à sua importância biotecnológica e sua versatilidade como agente de controle biológico, poucas linhagens bacteriocinogênicas têm sido caracterizadas. Thuricina 7 é uma bacteriocina produzida por *B. thuringiensis* BMG1.7 isolado do solo. Este composto apresentou atividade contra outras espécies do gênero *Bacillus*, *Streptococcus pyogenes* e *Listeria monocytogenes*. Bacturicina F4 é uma bacteriocina que apresentou estabilidade frente a uma ampla faixa de pH e temperatura. Sua atividade antimicrobiana foi observada contra outras espécies de *B. thuringiensis* e bactérias Gram-positivas, sendo menos ativa frente às Gram-negativas (KAMOUN et al., 2005). Em um outro estudo foram observados dois peptídeos com atividade inibitória, porém com massas moleculares diferentes. De acordo com suas características biológicas e químicas, foi identificada a Thuricina B439 (AHERN, VERSCHUEREN, VAN SINDEREN, 2003).

O estudo da influência da temperatura e do pH sobre a atividade das bacteriocinas vem interessando a comunidade científica. Também sabe-se que os meios de cultura influenciam na produção de bacteriocinas. Embora o crescimento proeminente de *Bacillus* sp. P5 foi observado neste estudo, tanto em BHI quanto em TSB, não houve relação entre a atividade da provável BLIS e a biomassa já que o cultivo em TSB produziu menor atividade antimicrobiana. A correlação entre a biomassa e a atividade antimicrobiana foi observada para *Lactococcus lactis* (DE VUYST, 1995) e *Brevibacterium linens* (MOTTA; BRANDELLI, 2003). No entanto, o crescimento celular nem sempre resulta em maiores níveis de produção da atividade antimicrobiana (KIM, HAL, DUNN, 1997). Krier et al. (1998) mostrou que a temperatura e o pH tiveram uma forte influência sobre a produção de duas bacteriocinas por *Leuconostoc mesenteroides*. A atividade antimicrobiana de *Lactobacillus curvatus* foi afetada pela manipulação de pH e temperatura (MATARAGAS et al, 2003). Nesses casos, as condições que causaram as taxas de crescimento relativamente lentas estimularam a produção de substâncias antimicrobianas. O pH baixo funcionava como fator indutor e o valor ideal para o crescimento resultou em menor atividade antimicrobiana (LEROY; DE VUYST, 2002).

Nossos resultados demonstram que a produção desta substância antimicrobiana podem ser afetada por fatores ambientais. Para a produção das substâncias antimicrobianas estudadas foram encontradas como melhores condições as temperaturas de 37 °C (24h) para *Bacillus* sp. P5 para o pré-inóculo e de 42 °C (24h) para inóculo. Motta (2004) demonstrou através de Análise de Superfície de Resposta que a máxima produção da atividade antimicrobiana ocorreu a pH inicial entre 6.0 e 8.0 e temperaturas entre 25 e 37°C. Mudanças nas condições ambientais são relevantes quando se considera o potencial para aplicações biotecnológicas destas substâncias nos alimentos e ao testar novos isolados para produção de bacteriocinas.

O monitoramento da produção de substâncias antimicrobianas por *Bacillus* sp. P5 ao longo da curva de crescimento mostrou um pico de atividade antibacteriana na fase logarítmica, enquanto que a atividade antifúngica foi detectada apenas na fase estacionária tardia (36h) quando utilizou-se o sobrenadante de *Bacillus* sp. inoculado sob a forma de um *spot*. Quando *Bacillus* sp. P5 foi inoculado sem centrifugação (com as células) a atividade antifúngica apresentou um pico contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em 9 h de cultivo e outro, menor, em 36 h de cultivo. Uma das hipóteses que poderia explicar este fato seria de que possivelmente quando se utiliza as células vivas de *Bacillus* sp. P5, esta bactéria consegue exportar algum(ns) composto(s) intracelular(es) e a atividade antifúngica aumenta, outra possibilidade seria a adsorção destes compostos pela superfície celular. Já quando em contato apenas com o sobrenadante, este composto encontra-se também presente mas só consegue ser detectado, com mensuração de atividade antifúngica, somente a partir da fase estacionária de crescimento. Atenta-se também para o fato de que as substâncias com atividade antifúngica, como iturina e fengicina são metabólitos secundários e são produzidos na fase estacionária, enquanto que as bacteriocinas são metabólitos primários e detectadas na fase logarítmica de crescimento (COTTER; HILL; ROSS, 2005 b; COUTTE et al., 2010; KIM et al, 2010; HOEFLER et al., 2012).

As medidas dos valores de pH ao longo da curva mostraram uma alcalinização do meio de cultura. Este resultado deve-se ao fato de que diversas espécies de *Bacillus* são micro-organismos proteolíticos e, no processo de degradação de proteínas e aminoácidos, ocorre a desaminação destes, promovendo a liberação de amônia para o meio, o que leva a alcalinização do meio de cultura.

Quando testou-se a ação das substâncias produzidas por *Bacillus* sp. P5 observou-se que, quando houve adição do sobrenadante filtrado de *Bacillus* sp. P5 após 6 h de cultivo

diretamente nas culturas em crescimento de *Bacillus cereus* ATCC 14579 e de *L. monocytogenes* ATCC 6477, houve uma redução mais intensa do crescimento da primeira espécie. Entretanto, quando utilizado o sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 sobre o cultivo desta última espécie patogênica, a redução apesar de menos drástica, foi mais rápida após o contato inicial com o sobrenadante em 4 h de incubação, já havendo uma redução significativa neste tempo. Estes acompanhamentos com contagem de UFC/mL no crescimento das culturas indicadoras, em relação aos experimentos controles relevaram um efeito inibitório ou bacteriostático tanto sobre *B. cereus* ATCC 14579 quanto sobre *L. monocytogenes* ATCC 6477. Pesquisas sobre efeito e modo de ação destas substâncias tem sido realizadas e, inclusive, Lisboa (2006) observou o mesmo efeito bacteriostático para um peptídeo produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 contra  $10^6$  UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 6477. Assim, o efeito das bacteriocinas e outras substâncias produzidas por espécies de bactérias pode ser bacteriostático, bactericida ou bacteriolítico e, este efeito, pode ser influenciado por diversos fatores como concentração e grau de pureza da bacteriocina, concentração da espécie de bactéria indicadora, meio de cultivo e tipo de espécie indicadora (BOUCABEILLE et al., 1997; MOTTA; BRANDELLI, 2002). Em uma outra pesquisa Boucabeille et al., 1997 também estudaram o efeito e modo de ação da linenscina OC2 contra *L. innocua* CIP8811, observando que o efeito da bacteriocina sobre uma cultura na fase exponencial de crescimento foi dependente da concentração da bacteriocina utilizada. Com altas doses de bacteriocina foram observadas perda de 50% de viabilidade celular em 70 min. e diminuição da absorvância de 50% em 130 min. evidenciando os efeitos bactericida e bacteriolítico, respectivamente. Com doses baixas de bacteriocina um efeito bacteriostático foi observado com inibição de *L. innocua* pois após 210 min. de cultivo a absorvância não havia diminuído e não havia perda da viabilidade celular. A atividade da bacteriocina também foi testada na fase estacionária de crescimento quando as células não foram afetadas.

Este estudo também mostrou evidências da interferência de fatores de indução na produção e otimização da possível bacteriocina produzida por *Bacillus* sp. P5. Isso se deve ao cultivo de *Bacillus* sp. P5 na presença de células mortas (inativadas termicamente) de outros micro-organismos que aumentaram a atividade antibacteriana do micro-organismo produtor *Bacillus* sp. P5, com destaque para o cultivo utilizando *Corynebacterium fimi* NTCS 7547 e também para o co-cultivo de *Bacillus* sp. P5 com o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* quando testou-se diversas bactérias (tipo ATCCs) e alguns fungos filamentosos. Quando *Bacillus* sp. P5 foi cultivado juntamente com cepas mortas de bactérias lácticas, isoladas do

mesmo lote de puba, houve aumento pronunciado da atividade antimicrobiana e/ou antifúngica especialmente quando a espécie produtora foi induzida com *L. fermentum* E4-249, *Lactobacillus plantarum* EPF-257 e *L. curvatus* E4-248. O perfil das atividades antimicrobianas frente a *B. cereus* ATCC 14579 quando utilizou-se *L. fermentum* E4-249 como espécie indutora foi estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) do que quando foi realizado o cultivo controle, apenas com a espécie produtora *Bacillus* sp. P5. Além disso, quando a produtora foi estimulada por crescimento em conjunto com as células inativadas de *Lactobacillus plantarum* EPF-257, os resultados das atividades antimicrobianas contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 foram superiores ( $p < 0,05$ ) aos co-cultivos com todas as outras onze bactérias lácticas isoladas da puba, exceto quando cultivadas juntamente com *L. fermentum* E4-249. E por fim, o resultado da atividade antifúngica utilizando-se como micro-organismo indicador *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicon* demonstrou que *Bacillus* sp. P5 quando cultivado com células inativadas termicamente de *L. curvatus* E4-248 apresentou melhor resultado de atividade contra este fungo filamentososo quando comparado ao tratamento controle ( $p < 0,05$ ).

Benitez et al. (2011) também encontrou aumento na atividade antibacteriana de *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 quando em cultivo com *Escherichia coli* ATCC 25922 e quando somente o sobrenadante da cultura foi usado como fator de indução, nenhuma atividade indutora foi observada, sugerindo que o fator de indução está associado com as células microbianas, sendo o mesmo observado neste estudo, já que os valores das atividades antimicrobianas, quando se utilizou diferentes sobrenadantes separadamente como fatores de indução e o tratamento controle não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Como já enfatizado anteriormente, os membros do grupo *B. subtilis* *sensu lato* incluem uma variedade de espécies importantes industrialmente que possuem um histórico de utilização segura na indústria de alimentos e são considerados bons produtores de antimicrobianos, incluindo bacteriocinas, substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS) e lipopeptídeos (ABRIOUEL et al., 2011; STEIN, 2005). A natureza protéica das bacteriocinas implicam em uma degradação no trato gastrointestinal de animais e humanos, o que sugere a sua utilização como conservantes naturais em alimentos (BIZANI; DOMINGUEZ; BRANDELLI, 2005; CLEVELAND et al., 2001). Assim, subtilina (BANERJEE; HANSEN, 1988), subtilosina A (STEIN et al., 2004; SUTYAK et al., 2008 b), ericina (STEIN et al., 2002) e sublancina (PAIK et al., 1998) são bacteriocinas produzidas por espécies do grupo *B. subtilis*. Já os lipopeptídeos provavelmente representam a classe mais comum de metabólitos

secundários produzidos por *Bacillus* spp. (STACHELHAUS et al., 2002; COMPAORÉ et al., 2013) e basicamente, são classificados em três famílias diferentes, dependendo da sequência de aminoácidos: surfactinas/lichenisinas, iturinas (micosubtilina, iturina A e bacilomicina) e fengicinas/plipastatinas (ONGENA; JACQUES, 2008).

Neste estudo, foram detectados genes de bacteriocinas correspondentes ao genes *spaS* (subtilina) e ao suposto gene *sboA* (subtilosina A) em *Bacillus* sp. C3. Este fato é notável, pois embora já tenha sido registrado a presença de genes para subtilina em *Bacillus subtilis* e para subtilosina A em *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. atrophaeus*, esse é o primeiro registro da presença destes genes para a espécie *Bacillus thuringiensis/B. cereus*, espécie a que possivelmente pertence *Bacillus* sp. C3. Em *B. subtilis* 168 onde foi também observada a produção de subtilosina A, estudos de correlação entre a produção do composto e a formação de esporos mostraram que não há nenhuma relação entre os dois fenômenos. Dentre os peptídeos produzidos por outras espécies de *Bacillus* verificou-se que a subtilina produzida por *B. subtilis* ATCC 6633 possui tamanho e mecanismos de síntese semelhantes à subtilosina A, o que sugere que a produção destes compostos é dispensável para o processo de formação de esporos (BABASAKI et al., 1985).

Em *Bacillus* sp. P5 a presença de genes para os lipopeptídeos surfactina, iturina e da bacteriocina subtilosina A foram evidenciados. Os lipopeptídeos surfactina e iturina A também foram identificados em diferentes linhagens de *Bacillus* isolados de ambientes aquáticos da bacia amazônica brasileira. Estas bactérias demonstraram atividade antifúngica contra espécies que causam perdas econômicas importantes na agricultura como *A. flavus*, *A. niger*, *A. phoenicis*, *Biopolaris sorokiniana*, *F. graminearum* e *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (VELHO et al., 2011), além da inibição de patógenos como *L. monocytogenes* e *B. cereus* por estas linhagens já ter sido previamente descrita (MOTTA et al., 2004).

Pattnaik et al. (2001) descreveram a lichenina, composto do tipo bacteriocina produzido por *B. licheniformis* que possui atividade surfactante e massa molecular de aproximadamente 1400 daltons. Bechard et al. (1998) isolaram uma espécie de *B. subtilis* da maçã e observaram a produção de um lipopeptídeo com propriedades antimicrobianas. Esse lipopeptídeo apresentou um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e estreito espectro de atividade contra Gram-positivas, sendo ativo contra um dos dois fungos filamentosos testados. Seu efeito sobre *Agrobacterium vitis* mostrou-se bactericida, porém não sendo associado com lise celular. O lipopeptídeo apresentou uma massa molecular de 1,5 kDa, mas quando este formou agregado, uma massa de 20 kDa foi observada. As

características deste lipopeptídeo foram similares aos peptídeos antibióticos classificados como surfactantes. A surfactina produzida por *B. subtilis* é um lipopeptídeo antimicrobiano cíclico, também classificado como biosurfactante. Suas propriedades antivirais e antibacterianas são conhecidas. Seu modo de ação foi estudado por Vollenbroich et al. (1997 a) e observou-se a desintegração da membrana citoplasmática de micoplasmas assim como sua baixa citotoxicidade para células de mamíferos. Isto permitiu a inativação específica dos micoplasmas, sem efeito deletério para o metabolismo celular e para as células do hospedeiro. Produção de um biosurfactante por *B. licheniformes* F2.2 foi observado em um outro estudo. O isolado foi capaz de produzir um novo biosurfactante BL1193, assim como outros dois lipopeptídeos plipastatina e surfactina. Para a produção destes compostos, diferentes requerimentos nutricionais têm sido observados, predispondo a produção de um ou de outro (THANIYAVARN et al., 2003).

Yoshida et al., (2001) atribuiu à uma linhagem de *B. amyloliquefaciens*, encontrada na amoreira, a produção de um composto que impede a proliferação de bactérias e fungos fitopatogênicos. *B. amyloliquefaciens* é conhecido como produtor de iturina, uma família de antibióticos lipopeptídeos cíclicos (HIRADATE et al., 2002). Linhagens de *B. amyloliquefaciens* produtoras de iturina A2 têm sido usadas como agentes de controle biológico para suprimir patógenos fúngicos de plantas (YOSHIDA et al., 2001, YU et al., 2002). A linhagem de *B. amyloliquefaciens* B94 foi usada como um agente de controle biológico para suprimir *Rhizoctonia solanis* e outros fungos fitopatogênicos. Três componentes antifúngicos foram isolados da cultura do micro-organismo e identificados como isoformas da iturina A. O grupo é formado por iturina A-E, bacilomicina D, F e L e micosubtilina (YU et al., 2002). A subtilosina, bacteriocina relatada em estudos anteriores como sendo produzida apenas por *B. subtilis*, foi encontrada em uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* isolada a partir de um produto lácteo fermentado. A proteína foi ativa contra *L. monocytogenes* e os isolados clínicos *Gardnerella vaginalis* e *Streptococcus agalactiae*, sem provocar danos à microbiota indígena, levando os autores da pesquisa a propor sua utilização no tratamento de infecções, especialmente no caso da *G. vaginalis* que tem se mostrado capaz de desenvolver resistência às drogas de escolha (SUTYAK et al., 2008 b). Elevada atividade inibitória *in vitro* contra múltiplos fungos e oomicetos patógenos de plantas foi encontrada para a linhagem de *B. amyloliquefaciens* GA1. Quando utilizada no tratamento de sementes, apresentou diminuição de doenças nas plântulas pela antibiose direta contra patógenos oriundos do solo. Além disso, reduziu a infecção pós-colheita de maçãs por

*Botrytis cinerea*, o agente causal da doença do mofo cinzento. Os dados apresentados neste último estudo sugeriram a secreção de múltiplos antibióticos e demonstraram o potencial da cepa GA1 de *B. amyloliquefaciens* para ser usada como agente de biocontrole (TOURE et al., 2004; ARGUELLES-ARIAS et al., 2009).

Neste estudo, a linhagem de *Bacillus* sp. P5 que apresentou os genes *ituD* e *sfp* demonstraram atividade inibitória contra *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida tropicalis* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Os peptídeos do grupo das iturinas e fengicinas são capazes de alterar a estrutura e a permeabilidade da membrana celular (DELEU et al. 2005). A produção de iturina por linhagens de *Bacillus* é frequentemente um fator importante por conferir atividade antifúngica. Da mesma forma, bacilomicina F e fengicinas foram relatadas na inibição de fungos patogênicos para plantas (MOYNE et al., 2001; RIVARDO et al., 2009). Os resultados sugerem que a atividade antifúngica de *Bacillus* sp P5 é associada com lipopeptídeos do grupo das iturinas juntamente com surfactina. Caldeira et al., (2006) também relataram que *Bacillus* sp. CCM1 1051 produz metabólitos com atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cephalosporium* sp., *Cladosporium* sp., *C. cladosporioides*, *C. resinae*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Penicilium expansum*, *Rhizopus* sp., *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii* e *T. koningii*.

A atividade antifúngica do *Bacillus* sp. P5 pode ser devida a produção de iturina A e fengicina, uma vez que se detectou a presença de genes precursores para estas substâncias, através da técnica de PCR seguida de sequenciamento do amplicon e por espectrometria de massa, foi possível identificar diversos *clusters* de iturina e também de fengicina, no meio de cultura BHIe, também, diretamente na matriz alimentar de puba de onde isolou-se *Bacillus* sp. P5.

A surfactina é o biotensioativo mais ativo (ROSENBERG; RON, 1999), com excelentes propriedades de superfície e também, como já afirmado anteriormente, com atividade contra *L. monocytogenes* (SABATÉ; AUDISIO, 2013) além de *Enterococcus faecalis* ATCC 2912, *Lactococcus garviae* KCCM 40698, *Streptococcus parauberis* DSM 6631, *Flexibacter tractuosus* ATCC23168 e *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (KIM et al., 2009). Para iturina e fengicina há relatos demonstrando inibição de diversas espécies de fungos incluindo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (YUAN et al., 2013). A subtilina é muito similar à nisina, que é a mais importante bacteriocina do grupo dos lantibióticos lineares e é usada como um conservante de alimentos. Já o peptídeo antimicrobiano subtilosina A foi

isolado pela primeira vez a partir das bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* 168 (BABASAKI et al., 1985) e, subsequentemente, mostrou-se ser produzido também por outras linhagens de *B. subtilis*, bem como *Bacillus amyloliquefaciens* (STEIN et al, 2004; SUTYAK et al, 2008 b) e *Bacillus atrophaeus* (STEIN et al., 2004). Assim, subtilosina A foi considerada única devido ao seu processo de maturação e estrutura molecular incomuns (KAWULKA et al., 2004), que apoiam a sua inclusão como uma subclasse distinta dentro do sistema de classificação de bacteriocinas de *Bacillus* (ABRIOUEL et al., 2011).

A co-produção de dois lipopeptídeos pela mesma linhagem bacteriana pode ser vantajosa, uma vez que um efeito sinérgico pode ocorrer. A produção simultânea de surfactina e iturina só foi relatada para *B. subtilis* (SANDRIN et al 1990; AHIMOU et al., 2000) e, possivelmente, para *B. amyloliquefaciens* (SOUTO et al. 2004). A co-produção de surfactina e bacilomicina foi relatada para *B. subtilis* (ZHANG et al., 2008). Co-produção de três ou mais lipopeptídeos antibióticos não é usual, mas tem sido descrita. Kim et al. (2010) demonstraram a produção de iturina, fengicina e surfactina de *B. subtilis* CMB32, semelhante ao que foi observado também por Velho et al. (2011) para a linhagem *Bacillus* sp. P7 e ao nosso estudo, em que encontramos co-produção de surfactina, iturina e subtilosina A para *Bacillus* sp. P5, quando da detecção através de possíveis genes produtores destas substâncias, por PCR seguido de sequenciamento dos amplicons. Estes resultados concordam com o fato de que a produção de lipopeptídeos antimicrobianos por *Bacillus* spp. está sob regulação complexa e uma mesma linhagem bacteriana pode produzir diferentes peptídeos (YAO et al., 2003; STEIN, 2005). Além disso, a co-produção de diferentes lipopeptídeos por *Bacillus* spp. pode dificultar as tentativas de purificação e a enorme variabilidade estrutural de diferentes lipopeptídeos e de seus homólogos torna complexa a identificação definitiva destas substâncias (CALDEIRA et al., 2008; CHEN et al.; 2008).

Os biosurfactantes apresentam uma vantagem sobre surfactantes sintéticos porque a maioria são biodegradáveis e, geralmente, menos tóxicos (SINGH; CAMEOTRA, 2004). No entanto, o uso de biosurfactantes para as indústrias alimentares e químicas não é algo, geralmente, competitivo por causa do custo relativamente alto de produção. Assim, a identificação de linhagens mostrando níveis de produtividade compatíveis com as necessidades econômicas constitui um desafio atual de grande relevância, o que requer o desenvolvimento de métodos simples e confiáveis para selecionar linhagens produtoras de surfactina e de outros biosurfactantes. A linhagem de *Bacillus* sp. P5 causou hemólise em ágar sangue e mostrou capacidade emulsificante em óleo mineral e óleo de soja, além de

reduzir a tensão superficial do meio de cultura para níveis considerados baixos. A literatura atual considera estes dados como interessantes para a exploração de biossurfactantes.

Embora o método de Hsieh et al. (2004) tenha sido desenvolvido para investigar surfactina entre espécies afins de *B. subtilis*, a lise de eritrócitos do sangue pode estar relacionada com a produção de outros compostos ativos além de surfactina. O isolado de puba *Bacillus* sp. P5 apresentou hemólise em ágar sangue de carneiro.

Os resultados para produção de bioemulsificante destacam a linhagem de *Bacillus* sp. P5 que apresentou índice de emulsificação no sobrenadante de 59% para tolueno e de 40% para o óleo mineral, índices estes considerados elevados pela literatura. Para biodiesel de soja o índice de emulsificação foi de 24%. Para os sobrenadantes após crescimento em meio de Landy suplementado com glutamato igualmente para *Bacillus* sp. P5 houve emulsificação DE 60% para xileno. E, para o teste com biodiesel de soja tanto os sobrenadantes dos cultivos em meio de Landy com glutamato quanto com arginina, apresentaram emulsificação de apenas 1%. Bueno (2008) testou oito bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* para produção de índice emulsificante cujos caldos (sem a presença de células) apresentaram diminuição de tensão superficial de no mínimo 20% e o índice de emulsificação foi estável após 24 h. Velho et al. (2011) testou seis linhagens de *Bacillus* sp. que incluíram *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Bacillus* sp. P34, *Bacillus licheniformis* P40, *Bacillus* sp. P7, *Bacillus* sp. P11 e *Bacillus subtilis* P45B e que apresentaram índices de emulsificação variando de 43 a 48% em óleo mineral e de 20 a 45% em óleo de soja.

A medida da tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas e apresentou, para *Bacillus* sp. P5 um valor de  $29,2 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$ , através da medição em um tensiômetro digital reduzindo a tensão superficial do meio de cultura BHI ( $48,4 \pm 2,4 \text{ mN m}^{-1}$ ) de forma significativa. Já para *Bacillus* sp. C3 a redução de  $45,1 \pm 2,7 \text{ mN m}^{-1}$  foi insignificante. Quando foi utilizado o meio de cultura de Landy com arginina houve redução de  $65,40 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$  (meio de cultura não inoculado) para  $56,95 \pm 0,9 \text{ mN m}^{-1}$  para *Bacillus* sp. C3 e de  $29,06 \pm 0,4 \text{ mN m}^{-1}$  para *Bacillus* sp. P5, conferindo, mais um vez, destaque para *Bacillus* sp. P5 em detrimento de *Bacillus* sp. C3. E, por fim, quando utilizou-se o meio de cultura de Landy com glutamato não ocorreram reduções significativas na medição da tensão superficial para ambas as espécies testadas.

Nos ensaios realizados por Barros; Quadros; Pastore (2008) foi pesquisado a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* linhagem LB5a (DCA/FEA/Unicamp) quando cultivado em manipueira, resíduo líquido proveniente da fabricação de farinha de

mandioca, eos resultados mostraram que o biossurfactante exibiu uma excelente atividade tensoativa, reduzindo a tensão da água de 72,31 para 27,01 mN m<sup>-1</sup>, confirmando os dados reportados por Cooper et al. (1981), Peypoux; Bonmartin; Wallach (1999) e Nitschke; Pastore (2006).

*B. licheniformis* BAS50 foi capaz de produzir surfactantes que reduzem a tensão superficial da água a valores próximos de 29 mN m<sup>-1</sup>, apresentando ainda estabilidade em salinidades superiores a 40% (YAKIMOV et al., 1995). Da mesma forma, *B. licheniformis* JF-2 produziu biossurfactantes que reduziram a tensão superficial da água para valores inferiores a 27 mN m<sup>-1</sup> (JAVAHERI et al., 1985). *B. coagulans* B1 em um outro estudo foi capaz de reduzir a tensão superficial para 27,4 mN m<sup>-1</sup> (HUSZCKA; BURCZYK, 2006). A surfactina representa um dos agentes tensoativos mais efetivos e estudados até hoje, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mJ m<sup>-2</sup> em uma concentração de 0,05 % (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; COOPER et al., 1981).

Benitez et al. (2010) também isolaram um *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 que produz atividade antagônica contra bactérias patogênicas e fungos fitopatogênicos, incluindo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Bipolaris sorokiniana*. Na análise de PCR detectou-se a presença dos genes *ituD* e *sfp* que codificam para iturina e surfactina, respectivamente. A substância antimicrobiana produzida por esta linhagem foi isolada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de gel filtração e extração com 1-butanol. O espectro de MALDI-TOF de *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 indicou que este micro-organismo produz dois peptídeos antimicrobianos, com picos principais *m/z* 1058 Da e 1464 Da, o que corresponde a peptídeos semelhantes a iturina e fengicina.

Velho et al. (2011) também encontraram atividade biológica e a presença de genes *sfp* e *ituD* (surfactina e iturina A) entre as cepas de *Bacillus* isoladas da bacia amazônica. Foram testados seis espécies de *Bacillus* e todas as linhagens testadas produziram compostos tensoativos além de causarem inibição do crescimento de vários fungos patogênicos, incluindo *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Bipolaris sorokiniana*. Lipopeptídeos também foram isolados a partir de sobrenadantes de cultura e analisados por espectrometria de massa. Foram observados picos característicos *m/z* para surfactina e iturina e algumas estirpes também produziram fengicina e bacilomicina. Atribuiu-se que a atividade antifúngica notável está associada com a co-produção de três ou mais lipopeptídeos antibióticos pela mesma linhagem bacteriana.

O objetivo geral de um processo de purificação de proteínas não é apenas a remoção de contaminantes indesejados, mas também a concentração da proteína de interesse e sua transferência para um ambiente onde esta apresenta-se estável e adequada para a aplicação pretendida. A pureza de proteínas é pré-requisito para o estudo de suas estruturas e funções, ou para suas aplicações potenciais, sendo que o nível de purificação requerido depende do uso final da proteína. Alto grau de pureza é necessário para estudos estruturais ou aplicações terapêuticas e baixo ou moderado grau de pureza para aplicações industriais, como na indústria alimentícia ou na produção de detergentes domésticos (QUEIROZ et al., 2001).

O cultivo de *Bacillus* sp. P5 em caldo BHI foi centrifugado após três diferentes tempos de cultivo (6h, 30h e 36h), selecionados conforme os picos de atividade na curva de crescimento e produção e, o sobrenadante resultante, denominado extrato bruto, foi utilizado como fonte para extração de lipopeptídeos e de bacteriocinas no processo de purificação parcial. O processo de purificação consistiu em três etapas: precipitação ácida ou extração com butanol, cromatografia de fase reversa e espectrometria de massas. Testou-se também a precipitação ácida para isolamento de lipopeptídeos e/ou substâncias semelhantes a bacteriocinas, no entanto, os melhores resultados ocorreram para a extração com butanol, resultando em maiores atividades após submissão à cromatografia de fase reversa e de espectrometria de massas.

Barros; Quadros; Pastore (2008) em um estudo sobre as propriedades emulsificantes e a estabilidade de um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira realizaram fermentação, em fermentador piloto com capacidade para 80 L, utilizando-se manipueira pré-tratada como substrato. As condições de processo foram 35 °C, 20 L/hora de aeração e agitação de 150 rpm. A recuperação primária do surfactante foi realizada por meio da coleta da espuma produzida no interior do fermentador sendo a biomassa removida por centrifugação, o sobrenadante foi acidificado com solução 2 M de HCl para pH 2,0 e a biomassa, novamente centrifugada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em água. O pH foi elevado para 7,0 com solução 1 M de NaOH e o precipitado, seco em estufa a 50 °C. Após secagem do produto, foi feita extração com clorofórmio/metanol (65:15) e novamente seco em estufa. O produto obtido foi identificado como biossurfactante semipurificado.

A cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada ao HPLC, especialmente quando da utilização de gradiente de acetonitrila (ACN) iniciando em 20% demonstrou ser uma ferramenta importante no isolamento inicial de lipopeptídeos em *Bacillus* sp. P5. Com

relação aos tipos de colunas C18 que foram utilizadas, Shephasil™ Peptide ou Shim-Pack, não foram encontradas diferenças relevantes. A combinação entre cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada ao HPLC e juntamente com espectrometria de massas MALDI-TOF foram instrumentos utilizados como métodos eficientes para identificação dos peptídeos antimicrobianos, incluindo lipopeptídeos hidrofóbicos na faixa de 1-1,5 kDa (STEIN; 2008). Entretanto, a bacteriocina subtilosina A, cuja razão  $m/z$  descrita na literatura para a forma monoisotópica é de 3400,57, não foi encontrada nos extratos butanólicos como descrito por Stein (2008), embora o gene *sobA* tenha sido detectado (figura 11).

Existem diferentes isoformas para cada ipopeptídeo, que variam no comprimento da cadeia de ácidos graxos e resíduos de aminoácidos em seus anéis peptídicos. Por conseguinte, alguns dos valores correspondentes de  $m/z$  diferem por um valor de 14, o que corresponde a massa molecular de um grupo metileno  $\text{CH}_2$  (por exemplo, 1031, 1045 e 1059  $m/z$ ). A presença de adutos de sódio e de potássio também favorece diferenças de 22 Da (1031  $m/z$  e 1053  $m/z$ , 1045  $m/z$  e 1067  $m/z$ ) ou 38 Da (1,045  $m/z$  e 1083  $m/z$ ) nos picos.

A análise dos espectros de massas de lipopeptídeos antimicrobianos de *Bacillus* spp. no meio de cultura BHI indicaram picos característicos para isoformas de surfactina, fengicina, iturina, micosubtilina e bacilomicina incluindo íons  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  e  $[\text{M} + \text{K}]^+$ . Já iturina e fengicina foram detectadas tanto no meio de cultura de Landy quando na matriz alimentar da puba, tendo sido encontrado ainda no meio de Landy espécies moleculares monoprotonadas e adutos de íons sódio e potássio de surfactina.

A fragmentação de íons moleculares selecionados detectados neste trabalho,  $m/z$  1030 (surfactina A  $\text{C}_{14}$  ou surfactina B  $\text{C}_{15}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ) e  $m/z$  1079 (iturina  $\text{C}_{15}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ), foram comparados aqueles das amostras comerciais de iturina e surfactina (Sigma-Aldrich) e alguns íons produtos semelhantes foram encontrados para estes dois lipopeptídeos confirmando as atribuições moleculares deste estudo.

Para a surfactina, por exemplo, o íon produto  $m/z$  684,2 (pico base) detectado na fragmentação do íon molecular 1030, mostrado na figura 33 A e 33B, também foi encontrado em outros estudos (HUE et al., 2001; CHAPTER 4 -Characterization of surfactins..., 2010). O pico de  $m/z$  685,5 foi atribuído como sendo um fragmento interno protonado  $[(\text{H}) \text{Leu}^2\text{-Leu}^3\text{-Val}^4\text{-Asp}^5\text{-Leu}^6\text{-Leu}^7(\text{OH}) + \text{H}]^+$  do íon precursor intacto de homólogos de surfactina (CHAPTER 4 -Characterization of surfactins..., 2010). Por este íon ser ubíquo nas fragmentações de surfactina ele é utilizado como um marcador deste lipopeptídeo.

Os picos  $m/z$  1463,7069  $[M+H]^+$  característicos de fengicina  $C_{16}$  também foram relatados por Chen et al. (2010) e por Kim et al (2004), além de este último autor também ter encontrado  $m/z$  de 1477 e 1505 igualmente como foi encontrado por esta pesquisa, sugerindo que há uma série de moléculas homólogas para esta substância. O espectro de massas MALDI-TOF a partir da cultura de *Bacillus* sp. P5 revelou um *cluster* contendo várias moléculas que foram observados em  $[M+H]^+m/z = 1449,4; 1477,8; 1485,6; 1491,7; 1505,5$ . Além disso, também foram observados  $[M+K]^+m/z = 1501,6; 1515,5; 1529,7; 1543,8$  e  $[M+Na]^+m/z = 1485,6; 1499,8; 1513,0$  e  $1527,0$ . A relação  $m/z$  destes picos demonstraram alta semelhança com os homólogos de fengicina (STELLER; VATER, 2000; VATER et al, 2002; KIM et al, 2004, STEIN, 2008), sendo que 10 picos encontrados na presente pesquisa correspondem aos mesmos picos  $m/z$  encontrados por Vater et al. (2002) e a 13 picos  $m/z$  encontrados por Stein (2008). Foi possível também obter-se a fragmentação do íon precursor 1478,5 ( $C_{15}$  fengicina A – presença de Ala na posição 6 do anel peptídico) que gerou os íons produtos  $m/z$  1079,9 e 965,8 considerados pela literatura ( $m/z$  1080 e 966) como biomarcadores de fengicina A (WANG et al., 2004). Os biomarcadores de *B. globigii* (*B. subtilis niger*) correspondentes às massas ( $m/z$  1463,5 e 1477,5) foram detectados tanto na puba quanto no meio de cultura.

Para iturina o espectro de massas MALDI-TOF também revelou um *cluster* contendo várias moléculas que foram observados em  $[M+H]^+m/z = 1043,3$  e  $1057,4$ . Além de também terem sido observados  $[M+K]^+m/z = 1081,3$  e  $1095,3$  e  $[M+Na]^+m/z = 1065,5$  e  $1079,3; 1079,5; 1079,57$ .

Um pico de  $[M+H]^+m/z$  1021,3 correspondente a bacilomicina  $C_{14}$  também foi encontrado neste estudo. Do mesmo modo, Peypoux et al., 1984 relataram um espectro de massas FAB (*Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*) para bacilomicina L apresentando um dos principais picos com  $(M + H)^+m/z$  1021. Os pesos moleculares calculados a partir da fórmula anteriormente relatada  $C_{48}H_{71}N_9O_{17}$  é de  $M = 1021$  e, deste modo, a fórmula correta de bacilomicina L deve ser revista para  $C_{46}H_{72}N_{10}O_{16}$  (PEYPOUX et al., 1984). Já Stein (2008) relata o valor de  $[M+H]^+m/z$  1021,52 para bacilomicina L  $C_{14}$ .

Também foram detectados, nas corridas 5 e 10,  $[M+Na]^+m/z$  1121,6 e de 1135, 6 correspondentes a micosubtilina  $C_{18}$  e  $C_{19}$ , respectivamente. Stein (2008), por sua vez, encontrou igualmente  $[M+Na]^+m/z$  1121,60 e de 1135,61, além de ter encontrado também outros valores de  $m/z$  para micosubtilina.

Os picos  $m/z$  1044 e 1058 que foram encontrados nesta pesquisa concordam com as mesmas isoformas de surfactina descritos para *B. amyloliquefaciens* CCM1 1051 (CALDEIRA et al. 2008). Além disso, o espectômetro de massas MALDI-TOF revelou que há uma série de sequências homólogas nas várias moléculas que foram encontradas de surfactina de  $C_{13}$  a  $C_{17}$ :  $[M+H] m/z = 994,39; 1008,5; 1022,5; 1036,4; 1050,8$  e  $1064,68$ , esta última sendo possivelmente surfactina  $C_{17}$  tendo sido ainda pouco relatada (BATRAKOV et al., 2003; LIU et al., 2007). Assim, um total de 15 picos de  $m/z$  demonstraram ser iguais aos descritos por Stein (2008), com adutos de  $H^+$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  e variando de  $C_{13}$  a  $C_{16}$ , exceto a surfactina  $C_{17}$ , que não foi relatada por este autor e que foi encontrado no presente estudo.

A isoforma de surfactina  $C_{17}$  tem sido raramente descrita, tendo sido relatada no trabalho de Bacon et al. (2012) em três linhagens de *B. mojavensis* quando cultivados em caldo nutriente e dez linhagens do mesmo bacilo quando cultivados em caldo comercial Pharmamedia, sendo que a maioria dos pesquisadores encontram isoformas dos tipos  $C_{13}$  e  $C_{15}$ , a forma mais ativa biologicamente (ZHAO; YANG; MU, 2012).

Stein (2008) encontrou as bacteriocinas subtilina, subtilosina, ericina A e ericina S nos extratos butanólicos de cultura de *Bacillus subtilis*. Assim, a linhagem de *Bacillus* sp. P5 isolado de puba de mandioca mostrou produção de uma ampla gama de picos  $m/z$ , indicando que esta bactéria produz uma mistura complexa de lipopeptídeos antimicrobianos. Estes resultados sugerem que a atividade antifúngica desta linhagem está associada à iturina e/ou surfactina, bacilomicina e fengicina, bem como sua ação biosurfactante. Ação contra bactérias como *L. monocytogenes* e *B. cereus* pode ser explicada pela sua produção igualmente de surfactina e micosubtilina, esta última já tendo inibido *Micrococcus luteus* e surfactina diversas espécies bacterianas, dentre as quais *L. monocytogenes*.

Bacon et al., 2012 em um estudo de caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus mojavensis* e sua produção de isoformas de surfactina encontraram e caracterizaram, pela primeira vez linhagens de *B. mojavensis* capazes de produzir um número considerável de isoformas de surfactina, também tendo sido identificadas outras espécies de *Bacillus* como produtores de surfactinas, apoiando o fato de que, *a priori*, a biossíntese deste grupo de lipopeptídeo é característica de membros do gênero *Bacillus*. Os dados desse estudo indicaram que 93% dos isolados do gênero *Bacillus* foram capazes de produzir isoformas variadas do lipopeptídeo surfactina em um ou ambos os meios testados (caldo nutriente e meio comercial Pharmamedia), particularmente aquelas associadas com fortes características de biocontrole tais como como surfactina  $C_{15}$ , apesar de ter sido detectada a produção de uma

mistura de surfactinas que variaram o comprimento da cadeia de ácido graxo entre C<sub>11</sub> a C<sub>17</sub>. A maioria das espécies foi identificada como *Bacillusmojavensis* não havendo muita diversidade genotípica entre estes isolados. Esta espécie foi recentemente separada do grande grupo de bactérias de *B. subtilis* e foi possível determinar estas cepas como sendo endofíticas de milho e apresentando um potencial de biocontrole, devido à inibição de *Fusariumverticillioides* produtor de micotoxinas. No entanto, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que outras substâncias também podem estar envolvidas, indicando a necessidade de análises químicas adicionais das frações inibitórias.

Com relação às espécies produtoras de surfactina Geetha et al. (2010) isolaram uma bactéria de solo identificada como *B. subtilis* subsp. *subtilis*, que é capaz de sintetizar diferentes isoformas de surfactina bem como três isolados da mesma espécie e subespécie, *B. subtilis* subsp. *subtilis* C4, M1 e G2III foram caracterizados como produtores de surfactina, além de serem efetivamente ativos contra *L. monocytogenes*, incluindo também as linhagens que se tornaram irreversivelmente resistentes às enterocinas (IBARGUREN et al. 2010).

Em *B. pumilus*, endofítico de mandioca, isolado de etnovarietades de mandioca cultivada por tribos indígenas do Amazonas foi purificado o lipopeptídeo pumilacidina, um metabólito secundário com atividade antifúngica (MELO et al., 2009).

Nitschke; Pastore (2006) estudaram resíduos industriais alternativos para a produção de biosurfactantes e, dentre estes, a manipueira, quando inoculada com *B. subtilis* LB5a forneceu nutrientes necessários à produção de lipopeptídeo. A manipueira é composta por carboidratos como frutose, glicose, sacarose (40 a 60%) e por minerais como P, K, Mg, Mn, S, Fe, Cu, Zn, e Ca (CEREDA, 1994). Os sais mineirais são nutrientes importantes para a produção de surfactina por linhagens de *Bacillus* (COOPER et al., 1981). Quando a manipueira foi comparada com meio sintético e com alguns resíduos, tais como melão e soro de leite, segundo valores de tensão superficial final do meio de cultura, a manipueira foi o substrato no qual os menores valores de tensão foram encontrados (26 mNm<sup>-1</sup>) indicando, mais uma vez, que este sub-produto está entre os meios de cultura mais adequados para produção de biosurfactante (NITSCHKE et al, 2004; BARROS et al, 2007).

Da mesma forma, a puba um produto amiláceo, mostrou-se adequada ao crescimento de bacilos. As composições centesimais das amostras de pubas D e E utilizadas neste trabalho foram respectivamente: umidade (5,35±0,61 e 5,76±0,61); proteínas (0,3±0,02 e 0,6±0,02), cinzas (0,22±0,002 e 0,19±0,02); lipídeos ( 0,67±0,06 e 1,04±0,10); fibra detergente neutro (54,29±4,68 e 38,52±2,77); carboidrato (39,25±2,47 e 53,4±3,89). Este substrato forneceu

nutrientes adequados ao crescimento de *Bacillus* sp. C3 e P5(CRISPIM, 2013) e nele foi detectado lipopeptídeos fengicinas e iturinas.

Hwang et al. (2007) constataram que surfactina reduziu o número de células de *Escherichia coli* em camundongos infectados com o patógeno. Huang et al. (2007) relataram o efeito antagônico da surfactina em esporos de *B. cereus* e recomendaram o uso deste metabólito como um aditivo em produtos alimentares para evitar o crescimento do patógeno. Nitschke et al. (2009) e Zeraik; Nitschke (2010) estudaram o efeito da surfactina sintetizado por uma linhagem de *B. subtilis* isolada do solo. Eles analisaram o efeito do composto sobre as propriedades de aderência de *L. monocytogenes* em aço inoxidável e superfícies de polipropileno e observaram que surfactina diminuiu a adesão do agente patogênico. De Araujo et al. (2011) também constataram que surfactina reduziu a adesão do agente patogênico às superfícies de poliestireno, mas eles não relataram nenhum efeito significativo deste metabólito na viabilidade de *L. monocytogenes*. Estes resultados sugerem que a surfactina, como um composto microbiano, pode ser considerada como uma ferramenta natural para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir ou controlar *L. monocytogenes* na indústria de alimentos.

Nossos experimentos identificaram elevada produção de diferentes isoformas de surfactina (de C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>) incluindo a isoforma C<sub>15</sub>, que é biologicamente considerada a mais ativa e a isoforma C<sub>17</sub>, raramente descrita. No entanto, a inibição *in vitro* observada não necessariamente pode ser apenas relacionada com as concentrações totais de surfactina, sugerindo um mecanismo complexo para a inibição e/ou a presença de outros fatores desconhecidos.

Comparativamente aos diferentes tempos de cultivo (6h, 30h e 36h) e às diferentes técnicas de extração/colunas utilizadas para extração dos lipopeptídeos pode-se afirmar que, com o aumento no número de horas do cultivo houve uma maior quantidade de substâncias que foram isoladas, num total de cinco diferentes tipos: surfactina, iturina, fengicina, micosubtilina e bacilomicina. Já em 30 h, quatro substâncias foram isoladas: surfactina, iturina, fengicina e micosubtilina e, em 6 h, apenas três substâncias foram encontradas, sendo elas surfactina, fengicina e micosubtilina.

Comparativamente à curva de crescimento de *Bacillus* sp. P5 realizada em meio BHI, percebe-se que após extração e submissão à cromatografia de fase reversa e espectrometria de massas, após 6h de cultivo, encontraram-se mais substâncias relacionadas à atividade antifúngica e de biosurfactante, como fengicina e surfactina, além de micosubtilina com ação

contra fungos e também, como já afirmado, contra a bactéria *Micrococcus luteus* (PEYPOUX et al., 1979). Pode-se presumir que a presença de um pico de atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp. P5 contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 em 6h de cultivo esteja relacionada com a presença de micosubtilina, que também possui ação antagonista contra diversos patógenos e potente ação antifúngica, além de ter sido recentemente demonstrada ação de biocontrole contra patógenos de tomateiro do gênero *Pythium* (FICKERS et al., 2008; BÉCHET et al., 2013). Além disso, correlacionando estes resultados com a curva de crescimento realizada para a atividade antifúngica, utilizando-se as células da bactéria produtora, observou-se um pico de inibição em 6h de cultivo, que possivelmente, seja devido a ação de fengicinas. Assim como Touré et al. (2004) também demonstraram que em estudos cinéticos as fengicinas foram sintetizadas por *Bacillus subtilis* GA1 preferencialmente no final da fase logarítmica ou início da fase estacionária correspondentes a baixa taxa de crescimento celular, em contraste com os outros dois grupos de lipopeptídeos que são claramente produzidos durante o crescimento exponencial (surfactinas) ou ainda mais tarde, na fase estacionária (iturinas). Estes resultados também estão de acordo com as investigações relatadas por Lin et al. (1999), mostrando que a transcrição de genes de fengicina sintetase era ótima no final da fase exponencial de crescimento.

Já com a extração em 30h de cultivo, além das três substâncias mencionadas anteriormente para 6h (surfactina, fengicina e micosubtilina) há o aparecimento de iturina. Comparativamente, à curva de crescimento realizada para atividade antifúngica pode-se observar atividade antifúngica contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersi* a partir de 24h de incubação de *Bacillus* sp. P5, mantendo-se a mesma atividade antifúngica em 30h. Estes resultados também concordam com os resultados obtidos por Touré et al. (2004) e já mencionados acima de que os lipopeptídeos do grupo das iturinas são produzidos um pouco mais tarde, ou seja, na fase estacionária de crescimento.

Por fim, em 36h de cultivo observa-se, além dos lipopeptídeos mencionados acima, também a presença de bacilomicina, comprovadamente com ação antifúngica, além de haver uma correlação entre o aumento da atividade emulsificante ( $E_{24}$ ) e antifúngica, sobretudo quando utilizou-se células de *Bacillus* sp. P5. A presença de surfactina é visivelmente explicada pelo fato da atividade emulsificante estar presente de 3h a 48h de crescimento de *Bacillus* sp. P5. Cantu et al. (2008) afirmam que compostos tensoativos comprovadamente interferem com a análise por MS, uma vez que muitos desses componentes ionizam muito bem e quase sempre estão presentes em excesso na amostra. Afirmam ainda que, a

sensibilidade dos espectrômetros de massas para a análise de proteínas é consideravelmente menor que para peptídeos. Além disso, se o interesse da análise é a identificação das proteínas, informação inerente à seqüência é necessária e, nesse sentido, os espectrômetros de massas são mais eficientes para obter informação estrutural de peptídeos que possuem até 20 aminoácidos em comparação a proteínas intactas. Isto pode nos levar a crer que os compostos surfactantes e tensoativos, que foram as substâncias mais detectadas pelo espectrômetro de massas em nossa pesquisa, como surfactina especialmente, mas também fengicina e iturina, podem ter interferido na detecção de outras substâncias como as bacteriocinas e substâncias de  $m/z$  3000-35000.

Alimentos naturalmente fermentados, como a puba, são fontes de micro-organismos produtores de antimicrobianos. Diversos desses compostos são identificados e purificados do sobrenadante de cultura de micro-organismos isolados de alimentos. Entretanto, há uma carência em pesquisas documentando a presença destas substâncias diretamente na matriz alimentar e, em especial, em alimentos como a puba de mandioca, amplamente consumida por populações no norte e nordeste do Brasil. Assim, este trabalho demonstrou o isolamento inédito de lipopeptídeos como fengicina e iturina, diretamente na matriz alimentar da puba de mandioca, utilizando-se extração com butanol seguida de cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Zip-Tip) e MALDI-TOF. Não há relatos na literatura documentando este tipo de metodologia para a detecção rápida de lipopeptídeos em alimentos, cuja presença pode conferir diversas características benéficas como, por exemplo, o controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Os lipopeptídeos detectados na puba, possivelmente, podem contribuir para o aumento da segurança alimentar e da vida de prateleira para para os consumidores e os produtores, respectivamente.

A puba é um produto artesanal obtido em condições precárias de higiene, como mostrado na figura 1, o que pode acarretar um comprometimento da sua qualidade, principalmente a higiênico-sanitária. Um trabalho anterior do mesmo grupo de pesquisa avaliou a presença e ausência além das quantificações de alguns micro-organismos de importância higiênico-sanitária na puba. Como não há padrões estabelecidos pela legislação vigente, RDC 12 da ANVISA, para a puba, os parâmetros analisados foram os do item 10, inciso a (BRASIL, 2001). Nas amostras de pubas usadas neste estudo, lotes D e E, não foram encontrados micro-organismos indicadores de patogenicidade ou deteriorantes de alimentos (CRISPIM, 2013). Nestas duas (2) amostras de pubas analisadas não foram detectados coliformes totais e *Escherichia coli* nem *Staphylococcus coagulase* positiva, bem como houve

ausência de *Salmonella* em 25 g das amostras (CRISPIM, 2013). As contagens de colônias típicas sugestivas de *B. cereus* foram  $10^3$  UFC/g e  $5 \times 10^2$  UFC/g, para as pubas D e E, respectivamente, cujos valores estão abaixo dos limites de tolerância de  $3 \times 10^3$  *B. cereus*/g para amostra indicativa de produto amiláceo segundo a RDC 12, inciso 10a (BRASIL, 2001). Entretanto, como os bacilos quantificados foram identificados como *B. cereus*/*B. thuringiensis* (puba D) e *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (puba E), com relação a segurança alimentar, apenas para o primeiro é necessário a pesquisa das enterotoxinas.

A pesquisa de novas linhagens microbianas como agentes de controle do crescimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes em alimentos, como agentes de biocontrole para a agricultura ou para a produção de biossurfactantes para remover compostos como óleos ou hidrocarbonetos aromáticos (PAHs) é um tema de extrema importância a fim de encontrar ferramentas alternativas para diminuição de poluentes químicos. Em suma, este estudo demonstrou que dois (2) isolados de *Bacillus* da puba de mandioca (C3 e P5) possuem genes essenciais para a produção de subtilina e subtilosina A e para a produção de surfactina, iturina e subtilosina A, respectivamente e, ainda que *Bacillus* sp. P5 produz cinco (5) diferentes lipopeptídeos/biossurfactantes que foram detectados por MALDI-TOF, demonstrando significativa atividade contra fungos fitopatogênicos e bactérias importantes para a indústria de alimentos como *L. monocytogenes* e *B. cereus*. Deste modo, estes micro-organismos, em especial, *Bacillus* sp. P5 tem grande potencial para a produção de agentes anti-fúngicos, antibacterianos e/ou preparações biossurfactantes e sua produção otimizada deve ser estudada.

## 7 CONCLUSÕES

Os micro-organismos isolados de puba de mandioca identificados por testes fenotípicos e genotípicos são pertencentes ao gênero *Bacillus* e, possivelmente, *Bacillus* sp. C3 seja pertencente à espécie *B. cereus*/*B. thuringiensis* e *Bacillus* sp. P5 à espécie *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*.

As análises de atividade antibacteriana revelaram amplo espectro de inibição, da linhagem escolhida *Bacillus* sp. P5 contra 28 (62%) dos 45 micro-organismos testados que incluíram bactérias, levedura e fungos filamentosos. Também evidenciou-se um aumento desta atividade antimicrobiana quando *Bacillus* sp. P5 foi cultivado com células mortas de outros micro-organismos, especialmente *Corynebacterium fimi* e *Aspergillus fumigatus*, indicando que há interferência de fatores de indução na produção da(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida por *Bacillus* sp. P5. Quando esta mesma linhagem foi cultivada utilizando-se BAL isoladas do mesmo lote da puba, notou-se que três espécies tiveram destaque na indução e consequente aumento da atividade antibacteriana de *Bacillus* sp. P5, sendo estas: *Lactobacillus brevis* E4-248, *Lactobacillus fermentum* E4-249 e *Lactobacillus plantarum* EPF-257, sendo esta última a espécie que mais aumentou a atividade de *Bacillus* sp. P5. Quando foi testada a indução com o sobrenadante das espécies indutoras que apresentaram melhor resultado de inibição de micro-organismos patogênicos com as células, não houve aumento significativo na atividade de *Bacillus* sp. P5 comparativamente ao controle. Estes resultados nos levam a concluir que há interferência de fatores de indução provenientes da própria microbiota natural deste alimento fermentado, que aumenta a produção das possíveis substâncias do tipo bacteriocina, (subtilosina A) e dos lipopeptídeos com atividade biossurfactante e antimicrobiana (surfactina, fengicina, iturina e bacilomicina) e do antibacteriano micosubtilina, produzidas por *Bacillus* sp. P5.

Observou-se que o sobrenadante bruto de *Bacillus* sp. P5 apresentou ação bacteriostática contra *Bacillus cereus* ATCC 14579 e contra *Listeria monocytogenes* ATCC 6477.

Foi observada atividade emulsificante nos ensaios utilizando tolueno, óleo mineral ou biodiesel de soja como fase orgânica, sendo os melhores valores observados para o tolueno para sobrenadante de *Bacillus* sp. P5 em BHI. Já para o xileno houve a formação de emulsão apenas quando testado o sobrenadante em meio Landy com glutamato. Também, foi detectada redução da tensão superficial do meio de cultura, sugerindo a produção de compostos

tensoativos pela bactéria. Sugere-se que a inibição dos fungos fitopatogênicos, provavelmente, tenha sido devido a atividade biosurfactante em combinação com iturina A, já para *Bacillus* sp. C3 não houve grande destaque para este teste, exceto para quando esta espécie foi cultivada em BHI e emulsionada com óleo mineral.

A técnica de PCR seguida de sequenciamento dos amplicons permitiu identificar genes relacionados à síntese das bacteriocinas subtilosina A e subtilina para *Bacillus* sp. C3, constituindo o primeiro registro da presença destes genes para a espécie *Bacillus thuringiensis/B. cereus*, a qual possivelmente pertença *Bacillus* sp. C3 e de subtilosina A e dos lipopeptídeos iturina A e surfactina para *Bacillus* sp. P5, o que demonstra ser uma importante metodologia para a triagem de linhagem de *Bacillus* com potencial para produção de bacteriocinas e/ou biosurfactantes.

Dentre as técnicas de purificação utilizadas, a extração com butanol mostrou-se um método eficaz de extração uma vez que diferentes isoformas foram detectadas, seguida por cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada ao HPLC e espectrometria de massas MALDI-TOF para a pesquisa no sobrenadante da cultura. Já para a pesquisa das substâncias diretamente na matriz alimentar apenas substituiu-se a cromatografia de fase reversa pela coluna C18 e adaptou-se o método de extração com butanol, realizada através de suspensão aquosa de puba a 1% e em ziptip (coluna C4).

O isolado *Bacillus* sp. P5 é capaz de co-produzir cinco (5) diferentes tipos de lipopeptídeos (surfactina, fengicina, iturina, micosubtilina e bacilomicina) e, portanto, apresenta atividade de biocontrole multi-facetada. Além disso, este trabalho demonstrou elevada produção de diferentes isoformas de surfactina (de C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>), em meio de cultura, incluindo a isoforma C<sub>15</sub>, biologicamente a mais ativa e a isoforma C<sub>17</sub>, raramente descrita, bem como a detecção inédita de lipopeptídeos como fengicina e iturina diretamente na matriz alimentar da puba de mandioca. A presença destes lipopeptídeos na matriz alimentar de puba pode contribuir para o controle de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes de alimentos, e para o aumento da segurança alimentar e da vida de prateleira, respectivamente.

## 8 PERSPECTIVAS

Sugere-se a realização de análises de qPCR para verificar se há aumento de expressão de genes destas bacteriocinas/lipopeptídeos durante o crescimento de *Bacillus* sp. P5 juntamente com células mortas de *L. brevis* E2-248, *L. fermentum* E4-249, *L. plantarum* EPF-257, *Corynebacterium fimi* e de *Aspergillus fumigatus*.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M. A. P.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 201-232, 2011.
- AGAISSE, H.; GOMINET, M.; OKSTAD, O. A.; KOLSTO, A. B.; LERECLUS, D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1043–1053, 1999.
- AHERN, M.; VERSCHUEREN, S.; VAN SINDEREN, D. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 220, n. 1, p. 127-131, 2003.
- AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 10, p. 749–754, 2000.
- ALMEIDA, E. G.; RACHID, C. C. T. C.; SCHWAN, R. F. Microbial population present in fermented beverage ‘cauim’ produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 146–151, 2007.
- ALMEIDA, P. F.; MORAES, I. O.; CASTRO, R. C.; MENEZES, T. B. Fermentação da mandioca para produção de carimã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 13, n. 2, p. 113-120, 1993.
- ALLENBY, N. E.; WATTS, C.A.; HOMUTH, G.; PRAGAI, Z.; WIPAT, A.; WARD, A. C.; HARWOOD, C. R. Phosphate starvation induces the sporulation killing factor of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 14, p. 5299–5303, 2006.
- ANTHONY, T.; RAJESH, T.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* anba 9. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 872–877, 2009.
- ARANHA, C.; GUPTA, S.; REDDY, K. V. R. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide nisin: in vitro and in vivo studies. **Contraception**, v. 69, n. 4, p. 333-338, 2004.
- ARAUZ, L. Juncioni; JOZALA, A. Faustino; MAZZOLA, P. Gava; PENNA, T. C. Vessoni. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 3-4, p.146-154, 2009.
- ARGUELLES-ARIAS, A. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, v.8, n. 63, p. 1-12, 2009.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A., TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, 1968.

ARNUSCH, C.J.; ULM, H.; JOSTEN, M.; SHADKCHAN, Y.; OSHERO, V. N. SAHL, H. G.; SHAI, Y. Ultrashort peptide bioconjugates are exclusively antifungal agents and synergize with cyclodextrin and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.1, p. 1-9, 2012.

ARREBOLA, E.; JAVOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 108, p. 386-395, 2010.

ASH, C. et al. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 343–346, 1991.

ATRIH, A.; REKHIF, N.; MOIR, A. J.; LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G. Mode of action, purification and amino acid sequence of planaricin C19, and anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1-2, p. 93-104, 2001.

BABASAKI, K.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y.; KURAHASHI, K. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: Isolation, structural analysis, and biogenesis. **Journal of Biochemistry**, v. 98, n.3, p. 585-603, 1985.

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. Bacteria for Biological Control of Plant Diseases. In: RECHCIGL, N. A., RECHCIGL, J. E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. New York: Lewis Publishers, 1997, p. 95-109.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 19, n. 3, p. 363-366, 1999.

BAM - Bacteriological Analytical Manual. *Bacillus cereus*. Chapter 14. USA: Food and Drug Administration, 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm>>. Acesso em 20 set. 2012.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BANERJEE, S.; HANSEN, J. N. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 19, p. 9508-9514, 1988.

BARBOZA-CORONA, J. E.; LA FUENTE-SALCIDO, N. DE; ALVA-MURILLO, N.; OCHOA-ZARZOSA, A., LOPEZ-MEZA, J. E. Activity of bacteriocins synthesized by

*Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.138, n. 1, p. 179–183, 2009.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M.. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F., PRÉVOST, H., CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 837-48, 2006.

BATRAKOV, S. G.; RODIONOVA, T. A.; ESIPOV, S. E.; POLYAKOV, N. B.; SHEICHENKO, V. I.; SHEKHOVTSOVA, N. V., LUKIN, S. M., PANIKOV, N. S., NIKOLAEV, Y. A. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1634, n. 3, p. 107-115, 2003.

BECHARD, J.; Eastwell, K. C.; Mazza, G. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5355-5361, 1998.

BÉCHET, M.; CASTÉRA-GUY, J.; GUEZ, J. S.; CHIHIB, N. E.; COUCHENEY, F., COUTTE, F.; FICKERS, P.; LECLERE, V.; WATHELET, B.; JACQUES, P. Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 264-270, 2013.

BENITEZ, L.; CORREA, A.; DAROIT, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the presence of *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p.1017-22, 2011.

BENITEZ, L.B.; VELHO, R. V.; LISBOA, M. P.; MEDINA, L. F.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 791-797, 2010.

BERLINER, E. Über die Schlafsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, n. 2, p. 29-56, 1915.

BERNHEIMER, A. W.; AVIGAD, L. S. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 361-369, 1970.

BESSON, F.; MICHEL, G. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. **Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 4, p. 437-442, 1987.

BESSION, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, v. 31, n. 4, p. 284–288, 1978

BIERBAUM, G.; SAHL, H. G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 2–18, 2009.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus sp.* strain 8A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 3, p. 512–519, 2002.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 158–162, 2004

BIZANI, D.; DOMINGUEZ, A. P. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 269–273, 2005.

BIZANI, D.; MORRISSY, J. A. C., DOMINGUE, A. P. M.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 229–233, 2008.

BIZANI, D.; MORRISY, J.A.C.; BRANDELLI, A. Utilização da bacteriocina 8A para inibição de *Listeria monocytogenes* em embalagens de alimentos. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 29. Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado: 2002.

BIZANI, D.; MOTTA, A. S.; MORRISSY, J. A. C.; TERRA, R. M.; SOUTO, A. A.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **International Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 125–131, 2005.

BODOUR, A. A.; MAIER, R. M. Biosurfactantes: Types, screening methods and applications. In: **Encyclopedia of Environmental Microbiology**, p. 750–770, 2002.

BONMATIN, J. M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 6, n. 6, p. 541–556, 2003.

BOUCABEILLE, C.; MENGIN-LECREULX, D., HENKES, G.; SIMONET, J. M.; VAN HEIJENOORT, J. Antibacterial and hemolytic activities of linescin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 295–301, 1997.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil de 10/01/2014.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C. L.; DELBONI, R. R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 1-8, 2004.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 99 f. Tese. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2008.

BUYER J. S. Rapid and sensitive FAME analysis of bacteria by cold trap injection gas chromatography. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 1, p. 187-190, 2006.

CALDEIRA, A. T.; FEIO, S. S.; ARTEIRO, J. M. S.; COELHO, A. V.; ROSEIRO, J. C. Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 3, p.808–816, 2008.

CALDEIRA, A. T.; ARTEIRO, J. M. S.; COELHO, A. V.; ROSEIRO, J. C. Combined use of LC–ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1738–1746, 2011.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CANTU, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 669-675, 2008.

CAO, L. T.; WU, J. Q.; XIE, F.; HU, S. H.; MO, Y. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3980-3985, 2007.

CASE, R. J.; Boucher, Y.; Dahllöf, I.; Holmström, C.; Doolittle, W. F.; Kjelleberg, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007.

CARRILLO C, TERUEL JA, ARANDA FJ, ORTIZ A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1611, n. 1-2, p.91-97, 2003.

CEREDA, M. P. **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Paulicéia, 1994. 174p.

CHANG J.M.; T.H. CHEN 2003. Bacterial Foodborne Outbreaks in Central Taiwan, 1991 – 2000. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n. 1, p. 53 -59, 2003.

CHAPTER 4. **Characterization of surfactins from *Bacillus subtilis* K1 by LC-ESI-MS<sub>n</sub>**. Shodhganga (A reservoir of indian theses). Índia, 2010. Disponível em: <[http://shodhganga.inflibnet.ac.in:8080/jspui/bitstream/10603/7223/8/08\\_chapter%204.pdf](http://shodhganga.inflibnet.ac.in:8080/jspui/bitstream/10603/7223/8/08_chapter%204.pdf)>. Acesso em 14 de setembro de 2013.

CHARLES, W. B.; DOROTHY, M. H.; TREVOR, R. M., MAURICE E. S.; BABATUNDE, O. Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers, **Biological Control**, v. 62, n. 1, p. 1-9, 2012.

CHEN, H.; WANG, L.; SU, C. X.; GONG, G. H.; WANG, P.; YU, Z. L. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, p. 180–186, 2008.

CHEN, L.; WANG, N.; WANG, X.; HU, J.; WANG, S. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8822–8827, 2010.

CHEN X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; PIEL, J.; BORRISS, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of Biotechnology**, v. 140, p. 27–37, 2009.

CHEN, Y.; LUDESCHER, R. D.; MONTVILLE, T. J. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.12, p.4770-4777, 1997.

CHEN, W.; LUO, L. Classification of antimicrobial peptide using diversity measure with quadratic discriminant analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 1, p. 94-96, 2009.

CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, H.; BEN SLAMA, K.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A.; CHERIF, A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 243-247, 2001.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 251–256, 2004.

CLADERA-OLIVEIRA, F. **Produção, Caracterização, Purificação Parcial e Aplicação de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis* P40**. 2004. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CLEVELAND, J.; CHIKINDAS, M.; MONTVILLE, T. J. Multimethod assessment of commercial nisin preparations. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 228 - 232, 2002.

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

COLAS, J. C.; SHI, W.; RAO, V. S. N. M.; OMRI, A.; MOZAFARI, M. R.; SINGH, H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. **Micron**, v. 38, n.8, p. 841-847, 2007.

COLE, R. B. **Electrospray ionization Mass Spectrometry-Fundamentals, Instrumentation & Applications**. New York: John Wiley&Sons, 1997.

COMPAORÉ, C. S.; NIELSEN, D. S.; OUOBA, L. I.; BERNER, T. S.; NIELSEN, K. F.; SAWADOGO-LINGANI, H.; DIAWARA, B.; OUÉDRAOGO, G. A.; JAKOBSEN, M.; THORSEN, L. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from *Bikalga*, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 297-307, 2013.

COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.2, p.224-229, 1987.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 87 p. Dissertação. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. **Current Protein & Peptide Science**, v. 6, p. 61-75, 2005 a.

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

COUTTE, F.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; GUEZ, J. S.; LECOUTURIER, D.; CHOLLET-IMBERT, M.; DHULSTER, P.; JACQUES, P. Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 480-491, 2010.

CRISPIM, S. M. **Dinâmica da comunidade microbiana envolvida na fermentação espontânea da puba e caracterização do perfil de qualidade e de identificação do produto**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CRISPIM, S. M.; NASCIMENTO, A.M.A.; COSTA, P.S.; MOREIRA, J.L.S.; NUNES, A.C.; NICOLI, J. R.; LIMA, F. L.; MOTA, V. T.; NARDI, R. M. D. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with puba, a Brazilian fermented cassava food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n. 1, p. 15-21, 2013.

CUNHA, C. D.; ROSÁRIO, M.; ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2277-2282, 2004.

DAGBERT, C.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M-N. Corrosion behaviour of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Electrochim Acta**, v. 51, n. 24, p. 5221-5227, 2006.

DE ARAUJO, L. V.; ABREU, F.; LINS, U.; SANTA ANNA, L. M. M.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 481-488, 2011.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelflife extension. **Internacional Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DE KWAADSTENIET, M.; DOESCHATE, K. T.; DICKS, L. M. Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 65-70, 2009.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface -implications for the effect of fengycin on biological membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 358-365, 2005.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M. SHARPE, M. E. A medium used for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DE MARTINIS, E. C.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 119-126, 1998.

DE MARTINIS, E. C. P.; FREITAS, F. Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**, v. 14, n. 3, p. 197-200, 2003.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DESJARDINE, K.; PEREIRA, A.; WRIGHT, H.; MATAINAHO, T.; KELLY, M.; ANDERSEN, R. J. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 1850-1853, 2007.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. **Cerela**, n.8, p.38-43, 1997.

DE VUYST, L. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 1, p. 28-33, 1995.

DE VUYST, L.; CALLEWAERT, R.; CRABBÉ, K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. **Microbiology**, v. 142, p. 817-827, 1996.

DE VUYST, L.; VANDAMME E. J. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. In: DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. (Eds.), **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications**. London: Blackie Academic & Professional, p. 1-11, 1994.

DIAZ, D. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT-5940 spores on broiler performance and digestibility. 2007. Disponível em: <[http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/effect-bacillus-amyloliquefaciens-cect5940\\_795.htm](http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/effect-bacillus-amyloliquefaciens-cect5940_795.htm)>. Acesso em 23 ago. 2010.

DIEP, D. B.; NES, I. F. Ribossomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. **Current Drug Targets**, v. 3, n.2, p. 107–122, 2002.

DYKES, G. A. Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. **Tree**, v. 10, n. 5, p. 186-189, 1995.

DOMINGUEZ, A. P. M. ; BIZANI, D. ; OLIVERA, F. C. ; BRANDELLI, A. . Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 238-243, 2007.

DUBOIS, A. Spiral bacteria in the human Stomach: the gastric helicobacters. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 3, p. 79-85, 1995.

DUITMAN, E. H.; HAMOEN, L. W.; REMBOLD, M.; VENEMA, G.; SEITZ, H.; SAENGER, W.; BERNHARD, F.; REINHARDT, R.; SCHMIDT, M.; ULLRICH, C.; STEIN, T.; LEENDERS, F.; VATER, J. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13294–13299, 1999.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSAJ**, p. 587, p. 1–16. 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to foods or feeds. Scientific opinion of the panel on biological hazards. **EFSA J**, v. 923, p. 1–48. 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the efficacy of product Toyocerin for pigs in fattening. **EFSA J**, v. 62, p. 1–5. 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the modification of terms of authorisation of the microorganism preparation of *Bacillus cereus* var. *toyoi* (NCIMB 40112/CNCM I-1012) (Toyocerins) authorised as a feed additive in accordance with Directive 70/524/EEC. **EFSA J**, v. 288, p. 1–7. 2005.

EIJSSINK, V. G. H.; AXELSSON, L.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; NES, I. F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1, p. 639-654, 2002.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Review**, v. 24, n. 1, p. 85-106, 2000.

EEMAN, M.; PEGADOB, L.; DUFRENEC, Y. F.; PAQUOT, M.; DELEU, M. Influence of environmental conditions on the interfacial organisation of fengycin, a bioactive lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 329, n. 2, p. 253–264, 2009.

ESCOUBAS, P. Mass spectrometry in toxinology: a 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 609-13, 2006.

EWING, B.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.

FICKERS, P.; LECLÈRE, V.; GUEZ, J. S.; BÉCHET, M.; COUCHENEY, F.; JORIS, B.; JACQUES, P. Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 6, p. 449-457, 2008.

**FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA – Bacteriological analytical manual.** Arlington: AOAC International, 1988.

FERNÁNDEZ, L.; DELGADO, S.; HERRERO, H.; MALDONADO, A.; RODRÍGUEZ, J. M. The bacteriocin nisin, as effective agent for the treatment of Staphylococcal mastitis during lactation. **Journal of Human Lactation**, v. 24, n. 3, p. 311-316, 2003.

FRANZ, C. M.; VAN BELKUM, M. J.; HOLZAPFEL, W. H.; ABRIOUEL, H; GÁLVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping into a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 293–310. 2007.

FRICKER, M.; MESSELHA. UBER U.; BUSCH. U.; SCHERER. S.; EHLING- SCHULZ, M. Diagnostic Real-Time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1892-1898, 2007.

GÁLVEZ, A.; LUCAS, LÓPEZ, R.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; BEN OMAR N. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 125–152. 2008.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; MÜLLER, J.; FIEDLER, H. P.; KALLENBORN, H. G.; HOLZENKÄMPFER, M.; KRASTEL, P.; ZEECK, A.; VATER, J.; HÖLTZEL, A.; SCHMID, D. G.; RHEINHEIMER, J.; DETTNER, K. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 2, p.199-205, 2002.

GEETHA I, MANONMANI AM, PAILY KP. Identification and characterization of a mosquitopupicidal metabolite of a *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1737–1744, 2010.

GILBERT, R. J.; TURNBULL, P. C. B.; PARRY, J. M.; KRAMER, J. M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: their part in food poisoning and other clinical infections. **In: BERKELEY, R. C. W.; GOODFELLOW, M. (Eds.). The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification.** London: Academic Press, p. 297–314, 1981.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Automated finishing with autofinish. **Genome Research**, v. 11, n. 4, p. 614-625, 2001.

GORDON. D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOMEZ, M. **Gênero *Bacillus* spp. –Tópicos em Bacteriologia Veterinária.** FAVET-UFRGS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAneros%20Bacillus%204-20131%20vers%C3%A3o%202013.pdf>. Acesso em 20 set. 2013.

GRAU, A.; GÓMEZ FERNÁNDEZ, J. C.; PEYPOUOX, F.; ORTIZ, A. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1418, n. 2, p. 307-319, 1999.

GRAU, A.; ORTIZ, A.; GODOS, A. D.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. A Biophysical study of the interaction of the Lipopeptide Antibiotic Iturin A with Aqueous Phospholipid Bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 377, n. 2, p. 315-323, 2000.

GRAVESEN, A.; RAMNATH, M.; RECHINGER, K. B.; ANDERSEN, N.; JÄNSCH, L.; HÉCHARD, Y.; HASTINGS, J. W.; KNØCHEL, S. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, v.148, p. 2361-2369, 2002.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry: A Textbook.** Berlin: Springer, 2004.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: A textbook.** 2. ed. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer, 2011.

GUERRA-CANTERA, M. A. R. V.; RAYMUNDO, A. K. Utilization of a polyphasic approach in the taxonomic reassessment of antibiotic and enzyme-producing *Bacillus* spp. isolated from the Philippines. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 635–644, 2005.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.

GUILLEN, N.; WEINRAUCH, Y.; DUBNAU, D. A. Cloning and characterization of the regulatory *Bacillus subtilis* competence genes *comA* and *comB*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 10, p. 5354–5361, 1989.

GUINEBRETIERE, M. H.; BERGE, O.; NORMAND, P.; MORRIS, C.; CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purees stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purees. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4520–4530, 2001.

GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; DE SARRAU, B.; DE BUYSER, M. L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; LERECLUS, D.; DE VOS, P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 31-40, 2013.

GUPTA, S. M.; ARANHA, C. C.; REDDY, K. V. R. Evaluation of developmental toxicity of microbicide Nisin in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 598-603, 2008.

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H.P. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 33, p. 53-93, 1986.

HARA, T.; MITANI, Y.; TANAKA, K.; UEMATSU, N.; TAKAKURA, A.; TACHI, T.; KODAMA, H.; KONDO, M.; MORI, H.; OTAKA, A.; NOBUTAKA, F.; MATSUZAKI, K. Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study. **Biochemistry**, v. 40, n. 41, p. 12395-12399, 2001.

HAO, Y.; BRACKETT, R. E.; DOYLE, M. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 307-312, 1998.

HALIMI, B.; DORTU, C.; ARGUELLES-ARIAS, A.; THONART, P.; JORIS, B.; FICKERS, P. Antilisterial Activity on poultry meat of family lysin, a bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, n. 2, p. 120–125, 2010.

HANCOCK, R. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999.

HAYASHI, K.; OHSAWA, T.; KOBAYASHI K, OGASAWARA, N.; OGURA, M. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 19, p. 6659–6667, 2005.

HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; OHANSEN, H. A.; FOUET A.; MOCK, M.; HEGNA, I., KOLSTO, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.

HE, Z.; KISLA, D.; ZHANG, L.; YUAN, C.; GREEN-CHURCH, K. B.; YOUSEF, A. E. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 168–178. 2007.

HILL, C.; REA, M.; ROSS, P. **Thuricin cd, an antimicrobial for specifically targeting *Clostridium difficile***. C. I. C12N1/20, C07K14/32. Patent number: WO2009068656 A1. TEAGASC, The Agriculture and Food Development Authority, University College Cork-National University of Ireland, Cork (IE). 2009.

HIRADATE, S; YOSHIDA, S; SUGIE, H; YADA, H; FUJII, Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. **Phytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 693-698, 2002.

HOEFLER; B. C.; GORZELNIK, K. V.; YANG, J. Y.; HENDRICKS, N.; DORRESTEIN P. C.; STRAIGHT, P. D. Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 32, p. 13082-13087, 2012.

HOFEMEISTER, J.; CONRAD, B.; ADLER, B.; HOFEMEISTER, B.; FEESCHE, J.; KUCHERYAVA, N.; STEINBORN, G.; FRANKE, P.; GRAMMEL, N.; ZWINTSCHER, A.; LEENDERS, F.; HITZEROTH, G.; VATER, J. Genetic analysis of the biosynthesis of nonribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 272, n. 4, p. 363–378, 2004.

HOSOI, T.; KIUCHI, K. *Natto* – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). In: FARNWORTH, E. R (Ed.). **Handbook of Fermented Functional Foods**, Boca Raton: CRC Press, p. 227–245, 2003.

HOURDOU, M. L.; BESSON, F.; TENOUX, I.; MICHEL, G. Fatty acid and beta-amino acid syntheses in strains of *Bacillus subtilis* producing iturinic antibiotics. **Lipids**, v. 24, n. 11, p. 940-944, 1989.

HSIEH, F. C.; LI, M. C.; LIN, T. C.; KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 186-191, 2004.

HSIEH, F. C.; LIN, T. C.; MENG, M.; KAO, S. S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. **Current Microbiology**, v. 56, n. 1, p.1-5, 2008.

HUANG XQ, LU ZX, BIE XM, LU FX, ZHAO HZ, YANG SJ. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 454–461, 2007.

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

HUSZCZA, E.; BURCZYK, B. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, p. 727–733, 2006.

HUNT, D. F.; YATES, J. R.; SHABANOWITZ, J.; WINSTON, S.; HAUER, C. R. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 17, p. 6233-6237, 1986.

HUSSAIN, A.; ARNOLD, J. J.; KHAN, M. A.; AHSAN, F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v.94, n. 1, p. 15-24, 2004.

HYUNG, M. J.; KWANG-SOO, K.; JONG-HYUN, P.; MYUNG-WOO B.; YOUNG-BAE, K.; HAN-JOON, H. Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from Kimchi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 577–584, 2001.

HWANG, Y. H.; PARK, B. K.; LIM, J. H.; KIM, M. S.; PARK, S. C.; HWANG, M. H.; YUN, H. I. Lipopolysaccharide binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock. **European Journal of Pharmacology**, v. 556, n. 1-3, p. 166–171, 2007.

IBARGUREN, C.; RAYA, R. R.; APELLA, M. C.; AUDISIO, M. C. *Enterococcus faecium* isolated from honey synthesized bacteriocin-like substances active against different *Listeria monocytogenes* strains. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 44–52, 2010.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J. ODÓCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, 2005.

INAOKA, T.; TAKAHASHI, K.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; OCHI, K. Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP cooperatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2169–2176, 2003.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M., MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of a *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176-179, 1995.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 171-200, 1995.

JACQUES, P.; HBID, C.; DESTAIN, J.; RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; DE PAUW, E.; THONART, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. n. 1-3, p. 223-233, 1999.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M. Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 698-700, 1985.

JENSSEN, H.; GUTTEBERG, T. J.; LEJON, T. Modelling of anti-HSV activity of lactoferricin analogues using amino acid descriptors. **Journal of Peptide Science**. v. 11, n. 2, p. 97-103, 2005.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JUNG, G. Lantibiotics: a survey. In: JUNG, G.; SAHL, H-G. (Eds.), **Nisin and Novel Lantibiotics**, Leiden, Netherlands, p. 1-35, 1991.

KAJIMURA, Y.; SUGIYAMA, M.; KANEDA, M. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. **Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 10, p. 1095-1103, 1995.

KAKINUMA, A.; SUGINO H., ISONO M., TAMURA G., AND ARIMA K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 973-976, 1969.

KAMEDA, Y.; OHIRA, S.; MATSUI, K.; KANATOMO, S.; HASE, T.; ATSUSAKA, T. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD2311. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 4, p. 938-944, 1974.

KAMOUN, F. et al. Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 881-888, 2005.

KAMYSZ, W.; OKRÓJ, M.; LUKASIAK, J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 461-469, 2003.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, p. 1208-1234, 1986.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Lipopeptides in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2010.

KAWULKA, K.E.; SPRULES, T.; DIAPER, C.M.; WHITTAL, R.M.; MCKAY, R.T.; MERCIER, P.; ZUBER, P.; VEDERAS, J.C. Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. **Biochemistry**, 43, n. 12, p. 3385-3395, 2004.

KARAS, M.I.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

KIKUCHI, Tadashi; HASUMI, Keiji. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1596, n. 2, p. 234-245, 2002.

KIM, T. S.; HUR, J. W.; YU, M. A.; CHEIGH, C. I.; KIM, K. N.; HWANG, J. K.; PYUN, Y. R. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. **Journal Food Protection**, v. 66, n.1, p. 3-12, 2003.

KIM, W.S.; HAL, R. J.; DUNN, N. W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 449-453, 1997.

KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y-T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.

KIM, K. M.; LEE, J. Y.; KIM, C. K.; KANG, J. S. Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 5, p. 711-715, 2009.

KIM, P. I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y. T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 942-949, 2004.

KIMURA, H.; SASHIHARA, T; MATSUSAKI, H.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Novel bacteriocin of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. **Annals of New York Academy of Science**, v. 864, p. 345-348, 1998.

KIRKUP, B. C. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 27, p. 3335-3350, 2006.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, n. 1, p. 39-85, 1993.

KLEIN, C.; KALETTA, C.; ENTIAN, K. D. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 296-303, 1993.

KORENBLUM, E.; DER WEID, I.; SANTOS, A. L.; ROSADO, A. S.; SEBASTIÁN G. V.; COUTINHO, C. M.; MAGALHÃES, F. C.; PAIVA, M. M.; SELDIN, L. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 667–675, 2005.

KORENBLUM, E.; SEBASTIAN, G. V.; PAIVA, M. M.; COUTINHO, C. M.; MAGALHÃES, F. C.; PEYTON, B. M.; SELDIN, L. Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 97–103, 2008.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731–1737, 1992.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X-H.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; HITZEROTH, G.; FRANKE, P.; VATER, J.; BORRIS, R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 4, p. 1084–1096, 2004.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X-H; VATER, J.; BORRIS, R. DegU and YczE Positively Regulate the Synthesis of Bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6953–6964, 2007.

KOWALL, M., J. VATER, B. KLUGE, T. STEIN, P. FRANKE, D. ZIESSOW. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 204, n. 1, p. 1–8, 1998.

KRAMER, JOHN M.; GILBERT, RICHARD J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. **Foodborne Bacterial Pathogens**, v. 19, p. 21-70, 1989.

KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; GERMAIN, P. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 359–363, 1998.

KUIPER, A. H.; KLETER, G. A.; NOTEBORN, H. P. J. M.; KOK, E. J. Assessment of the food safety related to genetically modified food. **The Plant Journal**, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

KUMAR, A.; SAINI, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A (5) F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n.6, p. 670-678, 2012.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock Microbial Identification System. **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**, v. 3, p. 1–18, 2006.

LACERDA, I.C.A.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 213-219, 2005.

LANDON, C; SODANO, P; HETRU, C; HOFFMANN, J; PTAK, M. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. **Protein Science**, v. 6, n. 9, p.1878-84, 1997.

LANDY, M.; G. H. WARREN, S. B. ROSENMAN & L. G. COLIO: Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 67, n. 4, p. 539-541, 1948.

LAPPE, R.; MOTTA, A. S.; SANT'ANA, V.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 3, p. 312-316, 2009.

LAWTON, E. M.; ROSS, R. P.; HILL, C.; COTTER, P. D. Two-peptide antibiotics: a medical perspective. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 12, p. 1236-1247, 2007.

LEE, K. H.; JUN, K. D.; KIM, W. S.; PAIK, H. D. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n. 3, p. 146–151, 2001.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K.P.; PRUSS, B. M.; KAPLAN, T.; WIESSNER-GUNKEL, E.; STEWART, G.S.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp.nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus scereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 4, p. 1373–1382, 1998.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **International journal of food microbiology**, v. 72, n. 1, p. 155-164, 2002.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n.6, p.1683-1688, 1991.

LIEBLER, D. C. **Introduction to Proteomics - Tools for the New Biology**. Totowa: Humana Press, 2002.

LIN, T.P.; CHEN, C.L.; CHANG, L. K.; TSCHEN, J. S. M.; LIU, S. T. Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 5060–5067, 1999.

LISBÔA, M. P. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LIU, X.; HADDAD, N. I.; YANG, S.; MU, B. Structural characterization of eight cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO121. **Protein Peptide Letters**, v. 14, n. 8, p. 766-773, 2007.

LOGAN, N. A.; BERGE, O.; BISHOP, A. H.; BUSSE, H.-J.; DE VOS, P.; FRITZE, D.; HEYNDRICKX, M.; KÄMPFER, P.; RABINOVITCH, L.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; SELDIN, L.; VENTOSA, A. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2114-2121, 2009.

LÓPEZ, R. L.; GARCÍA, M. T.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; GRANDE, M. J.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A. Semi-preparative scale purification of enterococcal bacteriocin enterocin EJ97, and evaluation of substrates for its production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 779-785, 2007.

LPSN (**List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura**) J. P. Euzéby. Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acessado em 2 de janeiro de 2014.

LUTZ, G.; CHAVARRÍA, M.; ARIAS, M. L.; MATA-SEGREDA, J. F. Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. **Revista de Biología Tropical**, v. 54, n. 1, p. 59-63, 2006.

MADAN, T.; KISHORE, U.; SINGH, M.; STRONG, P.; CLARK, H.; HUSSAIN, E. M.; REID, K. B. M.; SARMA, P. U. Lung surfactant protein A (SP-A) and D (SP-D) suppress eosinophilia and specific IgE antibodies in a murine model of fungal hypersensitivity. **The Journal of Clinical Investigation**, p. 107-467, 2001.

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-121, 2003.

MAGET-DANA, R.; THIMONB, L.; PEYPOUXB, F.; PTAKA, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v. 74, p. 1047-1051, 1992.

MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v. 87, p. 151, 1994.

MANDAL, S. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; FRANCO, O. L. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 338-345, 2013.

MANGONI, M. L.; SHAI, Y. Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: similarities and differences in cell specificities and modes of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2267-80, 2011.

MARTIRANI, L.; VARCAMONTI, M.; NACLERIO, G.; DE FELICE, M. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, v. 1, p. 1-5, 2002.

MARTÍNEZ-BLANCH, J. F.; SÁNCHEZ, G.; GARAY, E.; AZNAR, R. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, p. 697-709, 2011.

MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. **Food Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 305-312, 1991.

MARX R.; STEIN T.; ENTIAN K. D.; GLASER S.J. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by 1H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Protein Chemistry**, v.20, p. 501-506, 2001.

MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M.; DROSINOS, E. H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, v. 6, p. 265-271, 2003.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography**, p.211-220, 1999.

MAUGHAN, H.; AUWERA, G. V. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p. 789-797, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Embrapa, 2008.

MELO, F. M. P. D.; FIORE, F. M.; MORAES, A. L. D.; SILVA-STENICO, E. M.; SCRAMIN, S.; TEIXEIRA, A. M, D.; MELO, S. I. D. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. **Scientie Agricola**, v. 66, n. 5, p. 583-592, 2009.

MHAMMEDI, A.; PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, G. Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group: isolation and characterization. **Journal of Antibiotics**, v. 35, p.306-311,1982.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, p. 165-199, 2001.

MILLER, R. M.; ZHANG, Y. Chapter 4 Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. **Bioremediation Protocols: Humana Press**, p.59-66,1997.

MITCHELL, C. A.; SHI, C.; ALDRICH, C. C.; GULICK, A. M. Structure of PA1221, a nonribosomal peptide synthetase containing adenylation and peptidyl carrier protein domains. **Biochemistry**, p.52-63, 2012.

MCKAY, L.L.; BALDWIN, K.A. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, p. 3-14, 1990.

MCMULLEN, L.M., STILES, M. E. Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 64-71, 1996.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Efeito e modo de ação das bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de *Lactococos* e sua utilização no procedimento de queijo Minas Frescal**. 1995. Dissertação. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 1995.

MOYNE, A.L.; SHELBY, R.; CLEVELAND, T.E.; TUZUN, S. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**, p.622-629, 2001.

MOTTA, A. S. **Produção, purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por uma linhagem de *Bacillus* sp. P34**. 147 f. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 63-70, 2002.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 163-167, 2003.

MOTTA, A. S.; CANNAVAN, F.S.; TSAI, S.M. ; BRANDELLI, A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 367-375, 2007.

MOTTA, A. S.; FLORES, F. S.; SOUTO, A. A.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, p. 275-284, 2008.

MUKHERJEE, A. K.; Das, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 479-489, 2005.

MUTUS, R.; KOCABAGLI, N.; ALP, M.; ACAR, N.; EREN, M.; GEZEN, S. S. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. **Poultry Science**, v. 85, p.1621-1625, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NAKAMURA, L. K. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp-nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, p. 295–300, 1989.

NAKAMURA, L. K.; JACKSON, M. A. Clarification of the Taxonomy of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 46-49, 1995.

NAKANO, M. M.; ZUBER, P.; GLASER, P., DANCHIN, A.; HULETI, F. M. Two-component regulatory protein ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, p. 3796-3802, 1996.

NAKANO, M.M.; CORBELL, N.; BESSON, J.; ZUBER, P. Isolation and characterization of *sfp*: A gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. **Molecular and General Genetics**, p. 313-321, 1992.

NAKANO, M.M.; MAGNUSSON, R.; MYERS, A.; CURRY, J.; GROSSAMN, A.D.; ZUBER, P. *SrfA* is an operon required for surfactin production, competence development and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, p.1770-1778, 1991.

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

NAKANO, M.M.; ZHENG, G.; ZUBER, P. Dual control of *sbo-alb* operon expression by the Spo0 and ResDE systems of signal transduction under anaerobic conditions in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, p. 3274-3277, 2000.

NAKANO, M.M.; ZUBER, P. Anaerobic growth of a “Strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). **Annual Reviews Microbiology**, p. 165-190, 1998.

NACLERIO, G.; RICCA, E.; SACCO, M.; DE FELICE, M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n.12, p.4313-4316, 1993.

NASIR, M. N.; BESSON, F. Conformational analyses of bacillomycin D, a natural antimicrobial lipopeptide, alone or in interaction with lipid monolayers at the air–water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, p. 187-193, 2012.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M .B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 113-128, 1998.

NES, I. F.; YOON, S.; DIEP, D. B. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, p. 675-690, 2007.

NICHOLSON, W. L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 410-416, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; ARAÚJO, L.V.; COSTA, S.G.; PIRES, R.C.; ZERAIK, A.E.; FERNANDES, A.C.; FREIRE, D.M.G.; CONTIERO, J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. **Letters in Applied Microbiology**, p. 7-241, 2009.

NITSCHKE, M. **Produção e caracterização de biossurfactantes de *B. subtilis* utilizando manipueira como substrato**. 2004. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n.5, p. 772-776, 2002.

NISSEN-MEYER, J.; NES, I. F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Archives of Microbiology**, v. 167, n. 2-3, p. 67-77, 1997.

NYBROE, O.; SORENSEN, J. **Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads**. J.-L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas*, biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, U.S.A (2004), p. 147-172.

OGUNTOYINBO, A., SANI, A. I.; FRANZ, C. M. A .P.; HOLZAPFEL, W. H. In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of ofokpehe, a traditional African fermented condiment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 208-218, 2007.

OKAFOR, N.; IJIOMAB, B.; OYOLU, C. Studies on the microbiology of cassava retting for food production. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 1, p.1-13, 1984.

OMAN, T. J.; VAN DER DONK, W. A. Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin. **ACS Chemical Biology**, v. 4, p. 865-874, 2009.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1084-1090, 2007.

ONGENA, O.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 115-125, 2008.

OSCÁRIZ, J. C.; LASA, I.; PISABARRO, G. A. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, p. 337-341, 1999.

OSCÁRIZ, J. C.; PISABARRO, A. G. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 361-369, 2000.

OSCÁRIS, J. C.; PISABARRO, A. G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **International Microbiology**, v. 4, p. 13-19, 2001.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, p. 593-604, 2002.

OUOBA, L. I.; THORSEN, L.; VARNAM, A. H. Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 224-230, 2008.

OYEWOLE, O. B., ODUNFA, S. A. Microbiological studies on cassava fermentation for lafun production. **Food Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 125-133, 1988.

PABEL, C., VATER, J., WILDE, C., FRANKE, P., HOFEMEISER, J., ADLER, B., BRINGMANN, G., HACKER, J.; HENTSCHEL, U. Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Marine Biotechnology**, v. 5, p. 424-434, 2003.

PADONOU, S. W.; HOUNHOUGAN, J. D.; NAGO, M. C. Physical, chemical and microbiological characteristics of lafun produced in Benin. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 14, p. 3320-3325, 2009.

PAIK, S. H.; CHAKICHERLA, A.; HANSEN, J. N. Identification and characterization of structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of Sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 134-142, 1998.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 465-499, 2003.

PAPAYANNOPOULOS, I. A. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 49-73, 1995.

PATNAIK, P.; KAUSHIK, J. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 636-645, 2001.

PEDERSEN, P. B.; BJRNVAD, M. E.; RASMUSSEN, M. D.; PETERSEN, J. N. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 155-161, 2002.

PETTI C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Clinical Infectious Disease**, v. 44, n. 8, p. 1108-1114, 2007.

PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Preparation and antibacterial activity upon *Micrococcus luteus* of derivatives of iturin A, mycosubtilin and bacillomycin L, antibiotics from *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, v. 32, p. 136-140, 1979.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999.

PEYPOUX, F.; POMMIER, M.T.; DAS, B.C.; BESSON, F.; DELCAMBE, L.; MICHEL, G. Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 1600-1604, 1984.

PEYPOUX, F., POMMIER, M.T., MARION, D., PTAK, M., DAS, B.C.;MICHEL, G. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipidantibiotic from *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, v. 39, p. 636-641, 1984.

PEYPOUX, F.; F. BESSONG.; MICHEL& L. DELCAMBE. Structure of bacillomycin D, anew antibiotic of iturin group. **European Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 323-327, 1981

PEYPOUX, F.; POMMIER, M. ;DAST, B. C.; BESSON, F.; DELCAMBETT, L.; MICHEL, G. Structures of Bacillomycin d and Bacillomycin l peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. **The Journal of Antibiotics**, v. XXXVII, n. 12, p.1600-1604, 1984.

PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, C. G. ; LENZEN, C.; DIERICKX, L.; DELCAMBE, L. Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. **Journal of Antibiotics**, p.11-46, 1980.

PIGNATELLI, M.; MOYA, A.; TAMAMES, J. EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. **Environmental microbiology reports**,v. 1, p.191-197, 2009.

PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS C.; RUZAL, S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p. 9-13, 1998.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Petroleum Science & Engineering**, v. 50, p.71-77, 2006.

POST, R. C. Regulatory perspective of USDA on the use of antimicrobial and inhibitors in foods. **Journal of Food Protection**, p. 78-81, 1996.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactant by *Pseudomonas putida* – a Gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants Detergents**, v. 6, p. 65-68, 2003.

QI, G.; ZHU, F.; DU, P.; YANG, X.; QIU, D.; YU, Z.; CHEN, J.; ZHAO, X.; Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway. **Peptides**, p.1978-1986, 2010.

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 143-159, 2001.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN, I.; NYBROE, O., ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037-1062, 2010.

RASKO, D. A.; ALTHERR, M. R.; HAN, C. S.; RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 303-329, 2005.

RAUBITSCHKE, F.; DOSTROVSKY, A. An Antibiotic Active against Dermatophytes, Derived from *Bacillus subtilis*. **Dermatologica**, 1950.

REDDY, P. G.; SINGH, H. D.; PATHANK, M. G.; BHAGAT, S. D.; BARUAH, N. Isolation and functional characterization of hydrocarbon emulsifying and solubilizing factors produced by a *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 387-401, 1983.

REIS, F. A.; SERVULO, E. F. C.; FRANCA, F. P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 899-912, 2004.

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

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

RISOEN, P.A.; RONNING, P.; HEGNA, I. K.; KOLSTO, A. B. Characterization of a broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 648-655, 2004.

RIVARDO, F.; TURNER, R.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M. Antiadhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, p. 541–553, 2009.

ROCHA, C.; SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. VIerna, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 125-128, 1992.

ROJO-BEZARES, B.; SAENZ, L.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. **Food Microbiology**, v. 24, p. 482-491, 2007.

RON, E. Z.; ROSEMBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4., p. 229-237, 2001.

ROONGSAWANG, N.; THANİYAVARN, J.; THANİYAVARN, S.; KAMEYAMA, T.; HARUKI, M.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin and surfactin. **Extremophiles**, v. 6, p. 499-506, 2002.

ROONEY, A.P.; PRICE, N.P.; EHRHARDT, C.; SWEZEY, J.L.; BANNAN, J.D. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2429-2436, 2009.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 915-923, 2008.

ROZEK, A.; FRIEDRICH, C. L.; HANCOCK, R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. **Biochemistry**, v. 39, p. 15765-15774, 2000.

RUSSEL, N. J. Bacterial membranes: the effects of chill storages and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 27-34, 2002.

SABATÉ, D. C.; AUDISIO, M. C. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. **Microbiological Research**, v. 168, p. 125-129, 2013.

SACCHI, C. T.; WHITNEY, A. M.; MAYER, L. W.; MOREY, R.; STEIGERWALT, A.; BORAS, A.; WEYANT, R. S.; POPOVIC, T. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 10, p. 1117-1123, 2002.

SADER, H. S.; FARRELL, D.J.; JONES, R.N. Antimicrobial activity of daptomycin tested against gram-positive strains collected in European hospitals: results from 7 years of resistance surveillance (2003-2009). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 200-206, 2011.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, GEBJ-29, 2011.

SANTOS, C. F. C.; PASTORE, G. M.; DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P. Produção de biosurfactante por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33 n. 2, p. 157-161, 1999.

SANTOS, W. L. M.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; CARVALHO, C. R.; PRADO, C. S. Bacteriocinas: definição e características. **Higiene alimentar**, v. 8, n. 34, 1994.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, p. 370-375, 1990.

SASS, P.; JANSEN, A.; SZEKAT, C.; SASS, V.; SAHL, H. G.; BIERBAUM, G. The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 186, 2008.

SATOMI, M.; LA DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1735-1740, 2006.

SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E. K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and NisaplinR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 241-249, 2000.

SCHNEIDER, A.; STACHELHAUS, T.; MARAHIEL, M. A. Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 257, p. 308-318, 1998.

SCHNEIDER, T.; SAHL, H. G. An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 161-169, 2010.

SCHNEIDER, T.; GRIES, K.; JOSTEN, M.; WIEDEMANN, I.; PELZER, S.; LABISCHINSKI, H.; SAHL, H. G. The lipopeptide antibiotic Friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 1610-1618, 2009.

SCOTT, W. R.; BAEK, S. B.; JUNG, D.; HANCOCK, R. E.; STRAUS, S. K. NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles. **Biochimica e Biophysica Acta**, p. 3116-26, 2007.

SHARMA, N.; ATTRI, A.; GAUTAM, N. Purification and characterization of bacteriocin like substance produced from *Bacillus lentus* with perspective of a new biopreservative for food preservation. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 52, p. 191-199. 2009 a.

SHARMA, N.; KAPOOR, G.; GAUTAM, N.; NEOPANEY, B. Characterization of partially purified bacteriocin of *Bacillus* sp. MTCC 43 isolated from rhizosphere of radish (*Raphanus sativus*) and its application as a potential food biopreservative. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 68, p 881-886, 2009 b.

SHARP, R. J.; SCAWEN, M. D.; ATKINSON, T. Fermentation and downstream processing of *Bacillus*. **Biotechnology Handbook: Bacillus** (Harwood CR, Ed.), New York: Plenum Press, 1989. p. 255–292.

SHEPPARD, J. D.; JUMARIE, C.; COOPER, D. G.; LAPRADE, R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1064, n.1, p.13-23, 1991.

SHELBURNE, C. E.; A. N. FY; DHOLPE, V.; RAMAMOORTHY, A.; LOPATIN, D. E., LANTZ; M. S. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 297–300, 2007.

SHIDA, O. Modern Systematics of Aerobic, Endospore-forming Bacteria. In Proceedings of the **4th Asia-Pacific Biotechnology Congress & 30<sup>th</sup> Annual Philippine Society for Microbiology**, Inc. Convention. Waterfront Cebu City Hotel Lahug. p. 315-322, 2001.

SHIMANE, K.; OGURA, M. Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. **Journal of Biochemistry**, v. 136, p. 387-397, 2004.

SINGH P.; CAMEOTRA S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnology**, v. 22, p. 142-147, 2004.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S-M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, p. 357–363. 2006.

SLEPECKY, R.; HEMPHILL, E. The genus *Bacillus*. Nonmedical. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The Prokaryotes**, v. 4, p. 530–562, 2006.

SMITH, D.; LEE, K. D.; GRAY, E.; SOULEIMANOV, A.; ZHOU, X. **Use of bacteriocins for promoting plant growth and disease resistance**. US Patent Application number:20080248953, 2008.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N. S.; SHARPE, ME & HOLT, JG. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkin, v. 2, 1986.

SNELLING, A. M. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. **Current Opinion of Infects Diseases**, v. 18, p. 420–426, 2005.

SHODA, M. Review: Bacterial Control of Plant Diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SOUTO, G.I.; CORREA, O. S.; MONTECCHIA, M. S.; KERBER, N. L.; PUCHE, N. L.; BACHUR, M.; GARCIA, A. F. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds, **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1247–1256, 2004.

SOUZA, E. L.; SILVA, C. A.; SOUSA, C. P. de. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 4, 2005.

STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D.; MARAHIEL, M. A.; Nonribosomal assembly of peptide antibiotics on modular protein templates. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. (Eds.). ***Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells***. American Society for Microbiology Press, p. 415–435, 2002.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRÜPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043–1047, 2002.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

STEIL, L.; HOFFMANN, T.; BUDDE, I.; VOLKER, U.; BREMER, E. Genome wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. **Journal of Bacteriology**, v. 185. p. 6358-6370, 2003.

STEIN, T.; BORCHERT, S.; CONRAD, B.; FEESCHE, J.; HOFEMEISTER, B.; HOFEMEISTER, J.; ENTIAN, K. D. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A 1/3. **Journal of Bacteriology**, v.184, p. 1703-171, 2002.

STEIN, T.; DUSTERHUS, S.; STROH, A.; ENTIAN, K. D. 2004. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2349-2353, 2004.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845–857, 2005.

STEIN, T. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1146-1152, 2008.

STELLER, S.; VATER, J. Purification of fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis*. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.271, p. 267–75, 2000.

STERN, N. J.; SVETOCH, E. A.; ERUSLANOV, B. V.; KOVALEV, Y.N.; VOLODINA, L. I.; PERELYGIN, V. V.; MITSEVICH, E. V.; MITSEVICH, I. P.; LEVCHUK, V. P. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. **The Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1450–1453, 2005.

STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 331–345, 1996.

STILES, M. E.; HASTINGS, J. W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends in Food Science and Technology**, n. 10, p. 247-251, 1991.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-27, 1997.

STRAUCH M. A.; BOBAY B. G.; CAVANAGH J.; YAO F.; WILSON A.; LE BRETON Y. Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression. **Journal of Bacteriology**, v.189, p. 7720-7732, 2007.

SUGITA, H.; HIROSE, Y.; MATSUO, N.; DEGUCHI, Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. Strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture**, v.165, p.269-280, 1998.

SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 263-269, 1998.

SUN, L.; LU, Z.; BIE, X.; LU F.; YANG S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1259-1266, 2006.

SUTYAK, K. E.; ANDERSON, R. A.; DOVER, S. E.; FEATHER, GILL, K. A.; AROUTCHEVA, A. A.; FARO, S.; CHIKINDAS, M. L. Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilisin. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, 2008 a.

SUTYAK, K. E.; WIRAWAN, R. E.; AROUTCHEVA, A. A.; CHIKINDAS, M.L. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1067-1074, 2008 b.

SVETOCH, E. A.; STERN, N. J.; ERUSLANOV, B. V. et al. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 11-17, 2005.

SYLDATK, C.; MATULOVIC, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from normal-alkanes or glycerol by resting cells. **Naturforschung**, v. 40, p. 61-67, 1985.

SYMMANK, H. FRANKE, P.; SAENGER, W.; BERNHARDT, F. Modification of biological active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. **Protein Engineering**, v. 15, p. 913-921, 2002.

SZCZECH, M.; SHODA, M. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Phytopathology**, v. 154. p. 370–377, 2006.

TABBENE, O.; KALAI, L.; BEN SLIMENE, I.; KARKOUCH, I.; ELKAHOUI, S.; GHARBI, A.; COSETTE, P.; MANGONI, M.L.; JOUENNE, T.; LIMAM, F. Anti-*Candida* effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38. **FEMS Microbiology Letters**, v. 316, p.108, 2011.

TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M. M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Iranian Biomedical Journal**, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2004.

TALLY, F. P.; ZECKEL, M.; WASILEWSKI, M. M.; CARINI, C.; BERMAN, C.L.; DRUSANO, G.L.; OLESON, F.B. JR. Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections. **Expert Opin Investig Drugs**, p.1223-1238, 1999.

TAMEHIRO, N.; OKAMOTO-HOSOYA, Y.; OKAMOTO, S.; UBUKATA, M.; HAMADA, M.; NAGANAWA, H.; OCHI, K. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.46, n. 2, p. 315-320, 2002.

THANIYAVARN, J.; ROONGSAWANG, N.; KAMEYAMA, T.; HARUKI, M.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Production and characterization of biosurfactants from *Bacilluslicheniformis* F2.2. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 67, p. 1239-1244, 2003.

TEIXEIRA M. L.; SANTOS, J.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 49-53, 2007.

TESKA, J. D.; COYNE, S. R.; EZZELL, J. W.; ALLAN, C. M.; REDUS, S. L. Identification of *Bacillus anthracis* using gas chromatographic analysis of cellular fatty acids and a commercially available database. **Agilent Technologies**, p. 1- 5, 2003

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; GEORGES, M. Ionophorous and sequestering properties of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 1, n.1, p.57-62, 1993.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOURE, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, P.; GUIRO, A.; THONART, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1151-1160, 2004.

TRABI, M.; SCHIRRA, H. J.; CRAIK, D. J. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from *Rhesus macaque* leukocytes. **Biochemistry**, v. 40, n. 14, p. 4211-4221, 2001.

TSUGE, K.; ANO, T.; HIRAI, M.; NAKAMURA, Y.; SHODA, M. The genes degQ, pps, and lpa-8 (sfp) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2183-2192, 1999.

URDACI, M. C.; BRESSOLIER, P.; PINCHUK. I *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, p. 86-90, 2004.

UTENG, M.; HAUGE, H. H.; BRONDZ, I.; NISSEN-MEYER, J.; Fimland, G. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 952-956, 2002.

VAN DER MEI, H. C.; COWAN, M. M.; BUSSCHER, H. J. Physicochemical and structural studies on *Acinetobacter calcoaceticus* RAG- 1 and MR-481 - Two standard strains in hydrophobicity tests. **Current Microbiology**, v.23, p.337-341, 1991.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin - a novel antifungallipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **Journal of Antibiotics**, v. 39, p. 888-901, 1986.

VALENTA, C.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; RIGLER, H. P. The antistaphylococcal effect of nisin in a suitable vehicle: a potential therapy for atopic dermatitis in man. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, n. 9, p. 988-991, 1996.

VATER, J. Lipopeptides an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v.72, p.12-18, 1986.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S. Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6210-9. 2002

VELHO, R. V.; MEDINA, L. F. C.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 297-303, 2011.

VELHO, R. V.; CALDAS, D.G.G.; MEDINA, L.F. C.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Real-time PCR investigation on the expression of *sboA* and *ituD* genes in *Bacillus* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 660-666, 2011.

VELRAEDS, M. M.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, v. 8, p. 51-61, 1996.

VILAS-BOAS, G. T.; PERUCA, A. P.; ARANTES, O. M. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, p. 53, p. 673–687, 2007.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasm properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 44-49, 1997 a.

VOLLENBROICH, D.; ÖZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R. M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v. 25, p. 289, 1997 b.

WANG, J.; FUNG, D. Y. C. Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 22, p. 101–138, 1996.

WANG, J.; LIU, J.; WANG, X.; YAO, J.; YU, Z. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 98–102, 2004.

WANG, L-T.; LEE, F.-L.; TAI, C.-J.; KASAI, H. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1846-1850, 2007.

WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 477–501, 2007.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415-423, 1997.

WINTERBURN, J. B., MARTIN, P. J. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 187–195, 2012.

WU, D.; HUGENHOLTZ, P.; MAVROMATIS, K.; PUKALL, R.; DALIN, E.; IVANOVA, N. N.; KUNIN, V.; GOODWIN, L.; WU, M.; TINDALL, B. J.; HOOPER, S. D.; PATI, A.; LYKIDIS, A.; SPRING, S.; ANDERSON, I.; D'HAESELEER, P.; ZEMLA, A.; SINGER, M.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; COPELAND, A.; HAN, C.; CHEN, F.; CHENG, J. F.; LUCAS, S.; KERFELD, C.; LANG, E.; GRONOW, S.; CHAIN, P.; BRUCE, D.; RUBIN, E. M.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P.; EISEN, J. A. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. **Nature**, p. 1056–1060, 2009.

WU, J.; HU, S.; CAO, L. Therapeutic Effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3131-3135, 2007.

WU, S.; JIA, S.; SUN, D.; CHEN, M.; CHEN, X.; ZHONG, J.; HUAN, L. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. **Current Microbiology**, v. 51, p. 292-296, 2005.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H. L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1706–1713, 1995.

YAMADA, S.; OHASHI, E.; AGATA, N.; VENKATESWARAN, K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1483-1490, 1999.

YANG, R.; JOHNSON, M. RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3355-3359, 1992.

YAO, J.; LIU, H.; ZHOU, T.; CHEN, H.; MIAO, Z.; SHENG, C.; ZHANG, W. Total synthesis and structure-activity relationships of new echinocandin-like antifungal cyclolipohexapeptides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 196-208, 2012.

YAO, S.; GAO, X.; FUCHSBAUER, N.; HILLEN, W.; VATER, J.; WANG, J. Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactin in *Bacillus subtilis*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 272-277, 2003.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M. G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 47-51, 1997.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, v. 91, p. 181-187, 2001.

YOUSSEF, N. H.; DUNCANA, K. E.; NAGLEA, D. P.; SAVAGEA, N. K.; KNAPPB, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

YUAN, J.; RAZA, W.; HUANG, Q.; SHEN, Q. The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 721-730, 2012.

YUAN, J.; RUAN, Y.; WANG, B.; ZHANG, J.; WASEEM, R.; HUANG, Q.; SHEN, Q. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6-Enriched Bio-organic Fertilizer Suppressed *Fusarium* Wilt and Promoted the Growth of Banana Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3774–3780, 2013

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 955-963, 2002.

XIE, J.; ZHANG, R.; SHANG, C.; GUO, Y. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 5611–5619, 2009.

ZHAO, Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Quantitative Analyses of the Isoforms of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* HSO 121 Using GC-MS. **Analytical Sciences**, v. 28, p. 789, 2012.

ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. **Current Microbiology**, v. 61, p. 554–559, 2010.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (Biosurfactant). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3276-3282, 1992.

ZHANG, T.; SHI, Z. Q.; HU, L. B.; CHENG, L. G.; WANG, F. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 783-788, 2008.

ZHANG, B.; DONG, C.; SHANG, Q.; HANA, Y.; LI, P. New insights into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 2230-2237, 2013.

ZHENG, G.; YAN, L. Z.; VEDERAS, J. C.; ZUBER, P. Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin Subtilosin. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 7346-7355, 1999.

ZHENG, G. R.; ZUBER, P. Mutational analysis of *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilosin production and immunity. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 3266–3273, 2000.

**ANEXO****ANEXO A - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE LANDY PARA CRESCIMENTO DE  
*Bacillus subtilis*.**

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Glicose.....	20
Glutamato ou Arginina.....	5
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5
KCl.....	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,15
MnSO <sub>4</sub> .....	0,005
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,016
Extrato de levedura.....	0,1%