

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus
polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo,
purificação e caracterização dos bioprodutos

Nadja Fernanda Gonzaga Serrano

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

São Carlos
2014

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus*
polymyxa RNC-D: otimização das condições de cultivo,
purificação e caracterização dos bioprodutos

Nadja Fernanda Gonzaga Serrano

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia
como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor
em Biotecnologia.

São Carlos
2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S487pa

Serrano, Nadja Fernanda Gonzaga.

Produção de compostos antimicrobianos por
Paenibacillus polymyxa RNC-D : otimização das condições
de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos /
Nadja Fernanda Gonzaga Serrano. -- São Carlos : UFSCar,
2014.

233 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

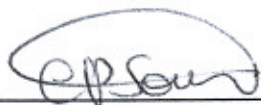
1. Biotecnologia. 2. Metodologia superfície-resposta. 3.
Análise cromatográfica. 4. Bioensaios. 5. Peptídeos
antimicrobianos. 6. Espectrometria de massas. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

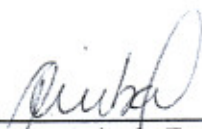
Defesa de tese de doutorado
submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade
Federal de São Carlos, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Biotecnologia

Aprovado em: 30/06/2014

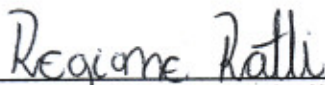
BANCA EXAMINADORA



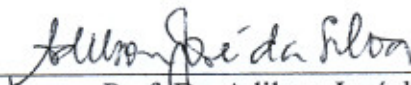
Prof.^a Dr.^a Cristina Paiva de Sousa (Orientadora)
(Universidade Federal de São Carlos/ UFSCar)



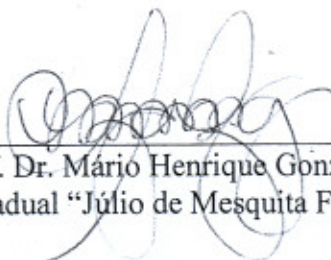
Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal
(Universidade Federal de São Carlos/ UFSCar)



Dr.^a Regiane Priscila Ratti
(Universidade São Paulo/USP - São Carlos)



Prof. Dr. Adilson José da Silva
(Universidade Federal de São Carlos/ UFSCar)



Prof. Dr. Mário Henrique González
(Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" / Araraquara)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela existência de tudo e de todos.

Aos meus pais, Rosa e José, devido ao amor, carinho, confiança e incentivo durante toda minha vida e formação acadêmica. A preciosa ajuda deles foi condição *sine qua non* para a concretização desta e de outras etapas. Expresso aqui minha eterna gratidão.

Ao meu filho Eric, lindo da *mamys*, que acompanha meu trabalho desde muito pequeno e até os dias atuais queixa-se quando chego em casa com “cheiro de laboratório”. Obrigada por ser forte e maduro para entender a importância de ficar longe da *mamys* durante meus estágios no exterior.

Ao meu irmão Igor, que, além de ser uma pessoa que amo muito, sempre me ajudou, desde o TCC, com a formatação, instalação de programas, etc.

Ao meu irmão Yuri, meu afilhado, pelos momentos compartilhados em casa e no “apê”.

Ao meu irmão Ivan Diego (*in memoriam*), com o qual pude dividir momentos incríveis durante nossa infância e início de adolescência. Agradeço principalmente por ter me transmitido sua *alegria em viver*. Que saudades.....

À toda minha família, tios e tias, primas e “agregados”, por ser bastante unida e alegre, agradeço o apoio constante.

À querida vó Anna, pessoa ímpar em nossa família, que é sempre muito ponderada em suas observações. Há muitos anos desempenha o papel de mediadora da família. Agradeço as *n* vezes em que fui a sua casa e ela logo percebia: “Nadja, o que tem de errado? Venha aqui, vamos conversar”. Também agradeço por ter me ensinado sua principal característica: ser persistente e jamais desistir/entregar-se (“*historinha do médico*”).

Ao meu namorado Fernando, pelo exemplo e incentivo à pesquisa e ciência. Também pela sua imensa compreensão, principalmente na etapa final deste doutorado.

À minha orientadora profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa pelos onze anos de trabalho conjunto, nos quais foi possível estabelecer grande vínculo de afeto e admiração por esta docente exemplar. Obrigada por ser minha orientadora!

Ao meu orientador prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior, pelos ensinamentos transmitidos e entusiasmo ao discutir isolamento de microrganismos endofíticos.

Ao *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, pelo árduo trabalho desenvolvido na produção de moléculas bioativas.

Ao prof. Dr. Daniel Dubreuil, da Universidade de Montreal, pela parceria para o desenvolvimento de importantes etapas deste projeto, bem como pelas conversas agradáveis e muita paciência na sala de HPLC!

Ao prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, do Departamento de Química (UFSCar), pela importante parceria estabelecida para realização de parte deste trabalho de doutorado; ainda, pelos momentos agradáveis que ocorreram durante os *happy hours* do grupo do LaBioMMi.

Ao prof. Dr. Carlos Osamu Hokka (*in memoriam*), meu orientador de mestrado, pelo seu trabalho desenvolvido na implantação da Pós-Graduação em Biotecnologia, bem como pela sua importante contribuição em minha orientação.

Ao prof. Dr. Ariano de Giovanni Rodrigues, do Departamento de Física (UFSCar) pela sua colaboração nas medidas de fotoluminescência.

À Dra. Solange Mussato pela grande ajuda quanto ao delineamento experimental e otimização das condições de cultivo.

Ao prof. Dr. José Antonio Couto Teixeira pela oportunidade para realização de meu “doutorado sanduíche” em Portugal.

Às minhas colegas Nina e Gabi, pelas horas compartilhadas no Laboratório de Microbiologia (e também fora dele), momentos de convivência e constante colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Fermentações (Universidade do Minho), especialmente Rosy e Marlene, pela valiosa ajuda nas curvas de calibração e DNS!

À colega e doutoranda Marilia Trapp, que sempre com muito entusiasmo e determinação ajudou na realização das análises de EM MALDI-TOF.

Ao técnico Amadeus, do Departamento de Engenharia Química (UFSCar), pela supervisão no manuseio do HPLC e seu bom humor ao enfatizar: “Só isto você tem de amostra Nadja?!”.

À Claudia Pastega, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por todo apoio fornecido no que se referiu aos assuntos da pós, bem como pelo vínculo de amizade que pudemos estabelecer.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao ISAC Project - Erasmus Mundus External Cooperation Windows Program (2008-3628/001-001), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

À todos que colaboraram para a concretização deste trabalho - e que porventura eu não tenha mencionado aqui o nome - meus sinceros agradecimentos.

Gostaria de finalizar agradecendo a meu professor de matemática do 2º ano do Ensino Médio, que em meados de junho de 1999 me disse a seguinte frase: “*Agora as coisas vão ficar difíceis para você.... com filho, você não terá mais tempo de estudar.... você não será nada*”. Esta frase, associada à “característica da vó Anna” e apoio incondicional da minha família, atuou como fator propulsor para que hoje, depois de 15 anos, eu pudesse concluir esta etapa de minha formação acadêmica.

DEDICATÓRIA

Saber vem do latim *sapere*, ter gosto, e, originalmente, seu significado estava ligado ao paladar. O significado do saber se ampliou e já não basta apenas o paladar para saber sobre as ciências, as emoções e a vida. É preciso colocar-se por inteiro na busca do saber, de corpo e alma. E qual personagem sabe desempenhar esta função, e muito bem? O cientista.

O saber é o sal do espírito, o gozo da alma, a consciência que o homem tem do mundo que o cerca e das diversas teorias criadas para explicar os mistérios que nos envolvem. O saber é a luz que nos permite enxergar a estrada. O homem cria o saber, e este transforma o homem, propondo-lhe novos desafios.

O ser cientista é “apaixonado” pelo saber, vive as alegrias e conflitos da eterna busca pelo conhecimento (principalmente quando o experimento não reproduz!), e caracteriza-se por ter luz própria, capaz de indicar novos caminhos.

Assim, dedico este trabalho aos cientistas/pesquisadores, seres ubíquos transformadores da realidade.

O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem, mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.

Albert Einstein

Sumário Geral

Resumo	vii
Motivação e Justificativas	ix
Objetivos	x
Capítulo 1 - Otimização das condições de cultivo para incremento na produção de compostos antimicrobianos pelo endofítico <i>Paenibacillus polymyxa</i> RNC-D	01
Capítulo 2 - Purificação e caracterização de metabólitos antimicrobianos secretados por <i>Paenibacillus polymyxa</i> RNC-D	54
Capítulo 3 - Caracterização por espectroscopia de fotoluminescência do extrato total e frações produzidos por <i>P. polymyxa</i> RNC-D	172

Resumo

Através do estudo de variáveis do cultivo pretendeu-se aumentar a produção de metabólitos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. Duas variáveis do processo - glicose e concentração de inóculo - foram avaliadas em diferentes níveis e seus efeitos na formação de biomassa, concentração inibitória mínima (CIM) contra *Escherichia coli* e redução na tensão superficial (RTS) foram estudados. Utilizando parâmetros não-otimizados as variáveis dependentes biomassa, CIM e RTS atingiram valores de 0,6 g/l, 1.000,0 µg/ml e 18,4 mN/m, respectivamente. As concentrações ótimas de glicose (16 g/l) e inóculo (5,0% v/v) foram definidas no sentido de maximizar a formação de biomassa e RTS do extrato, bem como diminuir o valor de CIM do extrato. Experimentalmente 2,05 g/l de biomassa; 31,2 µg/ml de CIM e 10,7 mN/m de RTS foram obtidos sob condições otimizadas. Foi constatado que altas concentrações do substrato glicose, embora refletissem em aumento de biomassa bacteriana, inibiram o metabolismo secundário microbiano, resultando em baixa produção de biomoléculas associada a altos valores de CIM. Através dos métodos de *design* fatorial experimental e superfície-resposta seguidos por otimização gráfica foi possível determinar a condição operacional ótima das concentrações iniciais de glicose e inóculo, as quais se demonstraram como variáveis de grande influência na produção de metabólitos antimicrobianos por *P. polymyxa* RNC-D. O extrato total (ET), proveniente do caldo de fermentação de *P. polymyxa* RNC-D, foi utilizado para pesquisa e isolamento de novos compostos antimicrobianos. Através de ensaios enzimáticos feitos com ET foi possível verificar a natureza lipopeptídica e peptídica dos compostos antimicrobianos. O ET foi submetido a um sistema de duas fases, separando-se então em extrato lipopeptídico (ELP) e fração aquosa (FA). Resultados de bioensaios revelaram que o ELP apresenta amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo. A análise por espectrometria de massas de ELP revelou a presença de um composto peptídico inédito o qual foi denominado *polycerradin*. A partir da fração aquosa (FA) foi possível a purificação de um novo peptídeo antimicrobiano (PAM) através de etapas cromatográficas. A bioatividade do composto foi avaliada e confirmada frente às bactérias Gram-negativas. A determinação da sequência de aminoácidos foi realizada por análise do N-terminal, e a confirmação da estrutura primária deste novo composto foi feita por MS/MS. O presente estudo relata pela primeira vez a produção do PAM PpRNCD que possui um

aminoácido não usual em sua constituição, relato primeiramente aqui descrito considerando-se a espécie bacteriana *P. polymyxa*. Em termos de tamanho de molécula, pode-se considerar que o PAM PpRNCD é um dos menores peptídeos naturais ativos relatados até o momento. Utilizando-se a FA também foi possível o isolamento dos depsipeptídeos LI-F04a (m/z 883), LI-F04b (m/z 897), LI-F03a (m/z 947) e LI-F03b (m/z 961) previamente descritos na literatura. O estudo da fotoluminescência do ELP, do ET e da FA foi realizado tanto em temperatura ambiente (RT) quanto em baixa temperatura ($T=8K$). Também se estudou, através desta técnica, a ação do ELP sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 1578 e fungo *Candida albicans* ATCC 10231 em duas situações: (a) imediatamente após a mistura do ELP com a suspensão celular bacteriana, e (b) trinta minutos após a mistura. Detectou-se emissão fotoluminescente por ELP, ET e FA, e sinais de Raman a λ 699 nm (FA a baixa temperatura). Decorridos 30 min da mistura do ELP com as suspensões celulares microbianas houve alteração na emissão fotoluminescente, sendo que alguns sinais foram suprimidos (λ 470, 480 e 700 nm para *S. sonnei*, por exemplo). Isto evidencia a potencial aplicação destas frações (ELP, ET e FA) para a fabricação de sensores, detectores e marcadores moleculares.

Palavras-chave: metodologia superfície-resposta, ensaios antimicrobianos, técnicas cromatográficas, sequenciamento do N-terminal, espectrometria de massas, espectroscopia de fotoluminescência.

Abstract

The increase in the production of antimicrobial metabolites by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D was appraised through the study of cultivation variables. Two process variables, namely the glucose and inoculum concentrations, were evaluated in different levels (5 to 40 g/l, and 2.5% to 5.0% v/v, respectively), and their effects on biomass formation, minimal inhibitory concentration (MIC) against *Escherichia coli* and surface tension reduction (STR) were studied. The fermentation process was firstly carried out using non-optimized parameters, where the dependent variables biomass, MIC and STR reached the values of 0.6 g/l, 1.000,0 µg/ml and 18.4 mN/m, respectively. The optimum glucose (16 g/l) and inoculum concentrations (5.0% v/v) were defined in order to maximize the biomass formation, with low value of MIC and large STR of extract. Under these conditions, a biomass of 2.76 g/l, MIC of 15.8 µg/ml, and STR of 14.58 mN/m were predicted by the model. Data attained by experiments using optimized settings showed the following values: biomass 2.05 g/l; MIC 31.2 µg/ml; STR 10.7 mN/m. Thus, the percentage of improvement for each target response was: biomass 241.6%; MIC 96.88%; STR 41.85%. It was found that high concentrations of glucose substrate, although reflected in an increase in bacterial biomass, inhibited the microbial secondary metabolism, resulting in a low production of biomolecules associated with high values of MICs. Thus, initial concentrations of glucose and inoculum are shown as variables of strong influence in the production of antimicrobial metabolites by *P. polymyxa* RNC-D. Through the methods of experimental factorial design and surface-response followed by graphical optimization it was possible to determine the optimum operating condition to achieve both maximum biomass and RTS as well as and lowest possible values of CIM. The validity of the proposed model was verified and confirmed. This is the first study on the optimization of culture conditions for the production of antimicrobial metabolites by *P. polymyxa* RNC-D, and constitutes an important step in the development of strategies to modulate the production of antimicrobial molecules by this microorganism in elevated levels. Novel antimicrobial compounds were isolated from the fermentation broth of *P. polymyxa* RNC-D, here named total extract (TE). It was possible to verify the presence of lipopeptide and peptide active compounds through enzymatic assays made with ET. Total extract was subjected to a two-phase system, resulting in lipopeptide extract (LPE) and aqueous fraction (AF). According to

the results of bioassays, LPE has broad-spectrum activity against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi. The mass spectrometry analysis of PLA revealed the existence of a novel compound that was named *polycerradin*. The purification of a novel antimicrobial peptide (AMP) from the AF was carried out by using chromatography. The compound was active against Gram-negative bacteria. N-terminal analysis determined the amino acid sequence, as well as MS / MS analysis confirmed the primary structure of this new compound. This research reports firstly the production of PAM PpRNCD that has an unusual amino acid in its constitution. It is an unprecedented fact considering the bacterial specie *P. polymyxa*. In terms of molecule size, PAM PpRNCD can be considered one of the smallest active natural peptide reported to date. It was also possible to isolate from FA the depsipeptides IL-F04a (m/z 883), LI-F04b (m/z 897), LI-F03a (m/z 947) and LI-F03b (m/z 961) previously described in the literature. The photoluminescence study of the LPE, TE, AF in both at room temperature (RT) and low temperature ($T = 8K$) was performed. In addition, this technique was applied to evaluate the action of the ELP on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 1578 and *Candida albicans* ATCC 10231 in two different situations: (a) immediately after mixing LPE with the bacterial and fungus cell suspension, and (b) after thirty minutes. The photoluminescence emission was collected by a triple spectrometer (three diffraction gratings) T64000 model from Jobin Yvon, equipped with an optical microscope. For the detection of the radiation emitted by the sample we used a CCD camera (charge coupled device) cooled by liquid nitrogen. The slits of the spectrometer were adjusted to produce a spectral resolution of the order of 10^{-4} nm. The excitation source used was the line of 457 nm (violet) from an argon laser. The behaviors here observed indicate a strong potential for applications in biosensors as well as molecular markers.

Keywords: response-surface methodology, antimicrobial assays, chromatographic techniques, N-terminal sequencing, mass spectrometry, photoluminescence spectroscopy.

Motivação e Justificativa

Quando uma droga antimicrobiana é usada, a pressão seletiva exercida por ela favorece o crescimento de organismos que são resistentes. Resistência a antimicrobianos não é um fenômeno novo; entretanto, a atual magnitude do problema e a velocidade com que os fenótipos resistentes têm emergido eleva o significado em saúde pública desta questão. O problema toma uma esfera mais ampla quando consideramos que, além do tratamento de infecções, há o comprometimento de operações e tratamentos como quimioterapia para câncer e transplante de órgãos, os quais podem tornar-se mais perigosos. Assim, pressão seletiva e velocidade de emergência de cepas resistentes, associadas ao tempo demandado para descoberta e lançamento de uma nova droga no mercado, justificam a pesquisa constante por novas e eficientes drogas. A associação entre potencial antimicrobiano e propriedades físico-químicas adequadas para utilização em dispositivos faz de uma nova molécula alvo prioritário para pesquisa.

Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos:

- Aumentar a produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D através do estudo de algumas variáveis do cultivo;
- Purificar e identificar novos compostos antimicrobianos presentes no caldo de fermentação de *P. polymyxa* RNC-D;
- Avaliar o espectro de atividade frente a amplo número de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo;
- Verificar o efeito fotoluminescente do extrato total e suas frações, tanto puros quanto em interação com microrganismos.

Capítulo 1

**Otimização das condições de cultivo visando o aumento da
produção de compostos antimicrobianos pelo endofítico**

***Paenibacillus polymyxa* RNC-D**

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	03
LISTA DE TABELAS	04
LISTA DE FIGURAS	05
RESUMO	06
ABSTRACT	07
1. Introdução	08
1.1. Microrganismos endofíticos.....	08
1.2. <i>Paenibacillus polymyxa</i>	12
1.3. Condições de cultivo <i>versus</i> produção de metabólitos.....	21
2. Experimental	26
2.1. Cepas bacterianas e meios de cultivo.....	26
2.2. Condições de fermentação.....	26
2.3. Métodos analíticos.....	27
2.4. <i>Design</i> experimental.....	28
3. Resultados e discussão	30
3.1. Design do compósito central e influência das variáveis nas respostas.....	30
3.2. Elaboração do modelo experimental e análise estatística.....	31
3.3. Curvas de superfícies-respostas e otimização gráfica.....	34
4. Conclusões	38
5. Referências	39

LISTA DE ABREVIATURAS

RPCP: rizobactéria promotora do crescimento de plantas

ATCC: *American Type Culture Collection*

TSB: tryptic soy broth

P. polymyxa: *Paenibacillus polymyxa*

E. coli: *Escherichia coli*

MH: Mueller-Hinton (ágar e caldo)

rpm: rotações por minuto

ET: extrato total

RTS: redução da tensão superficial

CIM: concentração inibitória mínima

MSR: metodologia superfície-resposta

UA/ml: unidades arbitárias por ml

2D: bidimensional

3D: tridimensional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diversidade de cepas de <i>Paenibacillus polymyxa</i> e atividades associadas.	17
Tabela 2. Matriz experimental dos valores reais e codificados das variáveis independentes usadas durante a fermentação de glicose por <i>P. polymyxa</i> RNC-D, e os resultados obtidos para as respostas formação de biomassa, CIM contra <i>E. coli</i> e RTS.	30
Tabela 3. Análise de variância para os efeitos das concentrações de glicose e inóculo nas respostas de formação de biomassa, CIM contra <i>E. coli</i> , e RTS durante a fermentação de glicose por <i>Paenibacillus polymyxa</i> RNC-D.	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Demonstração do potencial de colonização de tecidos internos da raiz de videira (*Vitis vinifera*) pela bactéria *Burkholderia phytofirmans* PsJN (células em verde) (Compant *et al.*, 2008). 11
- Figura 2.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura da cepa de *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF (He *et al.*, 2007). 12
- Figura 3.** Aspectos morfológicos da cepa *P. polymyxa* RNC-D, endofítico isolado de *Prunus* spp. (Serrano, 2009). 14
- Figura 4.** Atividade hidrolítica de amido por *Paenibacillus polymyxa* GBR-1 em *spots* com alta concentração (HI) de inóculo ($HI = 1 \times 10^8$ UFC/ml) e ausência de atividade em *spots* com baixa concentração (LI) de inóculo ($LI = 1 \times 10^6$ UFC/ml). A placa contendo ágar amido modificado (suplementado com amido azure – amido de batata ligado covalentemente a azul brilhante de Remazol) foi incubada a 23° C/48 h. (Jeon *et al.*, 2010). 15
- Figura 5.** Endofítico *P. polymyxa* (colônias abaixo dos *spots* em vermelho), isolado de folhas de *Prunus* spp., apresentando bioatividade contra *S. aureus* (Ratti *et al.*, 2008). 15
- Figura 6.** Inibição do crescimento de *Trichoderma harzianum* (esquerda) e *Botrytis cinerea* (direita) por ação de *P. polymyxa* EBL-06 (Gu *et al.*, 2010). 20
- Figura 7.** Linhas de contorno 2D (esquerda) e curva 3D de superfície resposta (direita) preditas por modelo quadrático que inter-relacionam as variáveis lactose e peptona e a resposta produção de compostos antigúngicos (Wang & Liu, 2008). 24
- Figura 8.** Linhas de contorno 2D (esquerda) e curva 3D de superfície resposta (direita) preditas por modelo quadrático que inter-relacionam as variáveis lactose e nitrato de sódio e a resposta produção de compostos antigúngicos (Wang & Liu, 2008). 24
- Figura 9.** Superfícies-resposta descritas pelos modelos representando a formação de biomassa (A), CIM contra *E. coli* (B) e redução na tensão superficial - RTS (C) durante a fermentação da glicose por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. 35
- Figura 10.** Região ótima definida pela sobreposição de gráficos das três respostas avaliadas (formação de biomassa, CIM contra *E. coli* e RTS) como funções das concentrações de glicose e inóculo. 37

Resumo

A produção de metabólitos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D foi avaliada. Duas variáveis do processo, sendo elas glicose e concentração de inóculo, foram avaliadas em diferentes níveis (5 a 40 g/l, e 2,5 a 5,0% v/v, respectivamente), e seus efeitos na formação de biomassa, concentração inibitória mínima (CIM) contra *Escherichia coli* e redução na tensão superficial (RTS) foram estudados. O processo fermentativo foi realizado utilizando parâmetros não-otimizados, no qual as variáveis dependentes biomassa, CIM e RTS atingiram valores de 0,6 g/l, 1.000,0 µg/ml e 18,4 mN/m, respectivamente. As concentrações ótimas de glicose (16 g/l) e inóculo (5,0% v/v) foram definidas no sentido de maximizar a formação de biomassa e RTS do extrato, bem como diminuir o valor de CIM do extrato. De acordo com estas condições, 2,76 g/l de biomassa, CIM de 15,8 µg/ml e 14,58 mN/m de RTS foram estimados pelo modelo. Dados obtidos experimentalmente usando as condições otimizadas mostraram os seguintes valores: 2,05 g/l de biomassa; 31,2 µg/ml de CIM e 10,7 mN/m de RTS. Portanto, a porcentagem de incremento para cada resposta foi: biomassa - 241,6%; CIM - 96,88%; RTS - 41,85%. Foi constatado que altas concentrações do substrato glicose, embora refletissem em aumento de biomassa bacteriana, inibiram o metabolismo secundário microbiano, resultando em baixa produção de biomoléculas associada a altos valores de CIM. Assim, concentrações iniciais de glicose e inóculo demonstraram-se como variáveis de grande influência na produção de metabólitos antimicrobianos por *P. polymyxa* RNC-D. Através dos métodos de *design* fatorial experimental e superfície-resposta seguidos por otimização gráfica foi possível determinar a condição operacional ótima a fim de alcançar máximas biomassa e RTS, bem como menores valores possíveis de CIM. A validade do modelo proposto foi verificada e confirmada. Este estudo, além de ser o primeiro relatado na literatura sobre a otimização de condições de cultivo para produção de metabólitos antimicrobianos por *P. polymyxa* RNC-D, constitui uma importante etapa no desenvolvimento de estratégia para modular a produção de compostos por este microrganismo endofítico.

Palavras-chave: *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, metabólitos antimicrobianos, concentração inibitória mínima, redução na tensão superficial, otimização, metodologia superfície-resposta

Abstract

The production of antimicrobial metabolites by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D was appraised. Two process variables, namely the glucose and inoculum concentrations, were evaluated in different levels (5 to 40 g/l, and 2.5% to 5.0% v/v, respectively), and their effects on biomass formation, minimal inhibitory concentration (MIC) against *Escherichia coli* and surface tension reduction (STR) were studied. The fermentation process was carried out using non-optimized parameters, where the dependent variables biomass, MIC and STR reached the values of 0.6 g/l, 1.000,0 µg/ml and 18.4 mN/m, respectively. The optimum glucose (16 g/l) and inoculum concentrations (5.0% v/v) were defined in order to maximize the biomass formation, with low value of MIC and large STR of extract. Under these conditions, a biomass of 2.76 g/l, MIC of 15.8 µg/ml, and STR of 14.58 mN/m were predicted by the model. Data attained by experiments using optimized settings showed the following values: biomass 2.05 g/l; MIC 31.2 µg/ml; STR 10.7 mN/m. Thus, the percentage of improvement for each target response was: biomass 241.6%; MIC 96.88%; STR 41.85%. It was found that high concentrations of glucose substrate, although reflected in an increase in bacterial biomass, inhibited the microbial secondary metabolism, resulting in a low production of biomolecules associated with high values of MICs. Thus, initial concentrations of glucose and inoculum are shown as variables of strong influence in the production of antimicrobial metabolites by *P. polymyxa* RNC-D. Through the methods of experimental factorial design and surface-response followed by graphical optimization it was possible to determine the optimum operating condition to achieve both maximum biomass and RTS as well as and lowest possible values of CIM. The validity of the proposed model was verified and confirmed. This is the first study on the optimization of culture conditions for the production of antimicrobial metabolites by *P. polymyxa* RNC-D, and constitutes an important step in the development of strategies to modulate the production of antimicrobial molecules by this microorganism in elevated levels.

Keywords: *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, antimicrobial metabolites, minimal inhibitory concentration, reduction on superficial tension, optimization, surface-response methodology.

1. Introdução

1.1 Microrganismos endofíticos

Microrganismos em sua totalidade são o maior reservatório inexplorado de biodiversidade que existe em diversos nichos ecológicos, incluindo desde ambientes extremos até o interior de plantas. Exploração desta diversidade microbiana representa perspectivas promissoras devido ao papel que micróbios desempenham na ciclagem de nutrientes, desintoxicação ambiental e habilidades metabólicas inovadoras para produtos farmacêuticos e processos industriais (SATYANARAYANA, 2005).

Dentre todos os organismos conhecidos produtores de pequenas moléculas, microrganismos representam uma fonte rica de metabólitos ativos biologicamente, os quais têm amplas aplicações (GUNATILAKA, 2006).

Os microrganismos endofíticos foram mencionados primeiramente no início do século XIX; porém, apenas no final da década de 70 verificou-se que estes organismos possuíam propriedades metabólicas de interesse (STROBEL & DAISY, 2003).

Segundo Challis e Hopwood (2003) endofíticos são, por definição, fungos e bactérias que habitam o interior de plantas sem causar danos ao hospedeiro e podem ser encontrados em folhas, ramos e raízes de provavelmente todas as plantas. Há aproximadamente 300 mil espécies de plantas na Terra, sendo que cada uma pode hospedar pelo menos uma espécie de endófito (STROBEL, 2003).

De acordo com Hallmann et al. (1997), endófitos podem ser isolados de plantas cuja superfície foi esterilizada ou podem ser extraídos de tecidos internos. Uma grande variedade de espécies bacterianas pode ser isolada a partir de uma única planta (KOBAYASHI & PALUMBO, 2000).

Vários endofíticos possuem a capacidade de produzir compostos naturais bioativos para inibir o crescimento de outros organismos e assim prover vantagem seletiva para a planta hospedeira (STROBEL et al., 2004; TAN & ZOU, 2001; ARNOLD et al., 2003).

Microrganismos associados a plantas desenvolveram a habilidade bioquímica para produzir compostos similares ou idênticos àqueles produzidos por suas plantas hospedeiras como um resultado de recombinação genética durante o processo evolucionário (GUNATILAKA, 2006).

Por habitarem nichos biológicos únicos, os endofíticos representam excelente fonte de produtos naturais bioativos (STROBEL et al., 2004; SERRANO, 2009). Estes microrganismos estão sujeitos a constantes interações metabólica e ambiental e, como consequência, expressam maior variedade de metabólitos secundários (SCHUTZ, 2001). Estas moléculas são caracterizadas por possuírem estruturas químicas diversas, e podem ser úteis devido a seu amplo espectro de bioatividade contra patógenos.

Enquanto processos de síntese combinatória, endofíticos produzem metabólitos secundários bioativos definidos como compostos de baixo peso molecular, que não são requeridos para crescimento em cultura pura, mas produzidos como um mecanismo de adaptação, exercendo funções específicas na natureza (DEMAIN, 1981).

Pesquisas têm demonstrado como endofíticos podem habitar hospedeiros vegetais sem causar danos, e, por sua vez produzirem metabólitos secundários bioativos, os quais conduzem a um aumento na resistência do hospedeiro contra *stress* e infecções patogênicas (CAO et al., 2003; CAO et al., 2004; CASTILLO et al., 2002; COOMBS e FRANCO, 2003).

Segundo Strobel (2003), esta interação microrganismo-planta, na qual uma parte fornece habitat e nutrientes, enquanto recebe substâncias que lhe garantem maior resistência à adversidades ambientais, reflete uma perspectiva co-evolucionária.

Diversos estudos têm apontado o potencial dos microrganismos endofíticos na produção de substâncias antibacterianas (CASTILLO et al., 2007; DEVI et al., 2012; GUIMARAES et al., 2008; HAZALIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; RATTI et al., 2008; SERRANO, 2009; SUPAPHON et al., 2013), antitumorais (GUIMARAES et al., 2008; HAZALIN et al., 2009) e antifúngicas (CASTILLO et al., 2007; CHO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; STROBEL et al., 1999; STROBEL et al., 2009; UJIKAWA, 2003).

Alguns metabólitos microbianos parecem ser característicos de certos biótopos, tanto a nível do organismo quanto do ambiente (SHUTZ, 2001). Sendo assim, a pesquisa por novos metabólitos secundários deve-se focar em organismos que habitam biótopos ímpares.

Como consequência de sua evolução bioquímica e biológica, microrganismos tem a habilidade de utilizar vários substratos sólidos, dentre os quais se pode incluir o interior de plantas vivas. A Savana tropical brasileira, também conhecida como Cerrado, é o segundo bioma mais rico em termos de biodiversidade do mundo (SANO et al., 2010). Este bioma único contém alta densidade de diferentes plantas endêmicas (mais de 10 mil espécies) e foi incluído entre os 25 locais prioritários para conservação de biodiversidade (MYERS *et al.*,

2000). A variedade de fatores ambientais aos quais a vegetação desta região está submetida favorece o potencial de síntese de novos compostos pelas plantas e também pelos endofíticos (CHALLIS & HOPWOOD, 2003; RANGEL et al., 2007). Devido a estes aspectos, o Cerrado caracteriza-se como excelente bioma para pesquisa de bactérias e fungos associados a plantas.

Em estudo bioprospectivo conduzido por Favoretto (2010), 26 microrganismos foram obtidos de plantas do Cerrado da região de São Carlos, SP. A atividade antimicrobiana dos endofíticos isolados foi avaliada contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Candida albicans*. A bactéria isolada de *Miconia albicans* apresentou características sugestivas de *Streptomyces*, e inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. faecalis*.

Prospecção de bactérias produtoras de metabólitos antimicrobianos em plantas do Cerrado foi realizada por Ratti et al. (2008). Os microrganismos isolados de *Cassia leptophylla* não demonstraram potencial antagônico contra *Staphylococcus* coagulase positivo. Por outro lado, uma espécie isolada de *Prunus* spp foi capaz de inibir o crescimento da cepa indicadora. Em estudo complementar, a espécie isolada de *Prunus* spp foi identificada como *Paenibacillus polymyxa* e recebeu a designação RNC-D (SERRANO, 2009).

Streptomyces tubercidicus foi isolado de *Solanum lycocarpum*, planta característica do bioma Cerrado (RATTI, 2009). Este endofítico demonstrou bioatividade contra *E. coli* e *S. aureus*. Outro estudo realizado por Maitan (1998) também isolou actinomicetos da planta *Solanum lycocarpum*, pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Microclunatus* e *Luteococcus* e produtores de substâncias antibióticas.

Estudos têm revelado o endofitismo de diversas espécies de actinomicetos, ao mesmo tempo em que demonstram seu potencial bioativo. Neste sentido, cepas de *Streptomyces* spp. foram caracterizadas pela produção de novos peptídeos antibióticos, denominados munumbicinas e coronamicinas, os quais possuem amplo espectro de atividade contra fungos e bactérias patogênicas (CASTILLO et al. 2002; EZRA et al., 2004; PULLEN et al., 2002). Outra interessante aplicação de actinomicetos endofíticos é seu uso como potencial agente de biocontrole contra patógenos de raízes de plantas (CAO et al., 2004; CASTILLO et al., 2007; KUNOH, 2002).

Em pesquisa realizada por von der Weid et al. (2000), um total de 67 cepas de *P. polymyxa* foram isoladas da rizosfera de milho plantado em solo de Cerrado. Outro estudo envolvendo o mesmo gênero bacteriano, Coelho et al. (2007) investigaram a diversidade de espécies de *Paenibacillus* em rizosferas de quatro cultivos de *Sorghum bicolor* em solo de Cerrado, encontrando 14 espécies de *Paenibacillus* spp.

Em certos ambientes, alguns microrganismos parecem invadir ativamente tecidos vegetais que apresentam soluções descontinuas (aberturas ou feridas) e utilizam, proativamente, enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases (ZHANG, 2006). Desta forma, acredita-se que algumas bactérias endofíticas têm sua origem na rizosfera, penetram e colonizam tecidos da raiz para obterem um ponto de acesso ao xilema e, assim, disseminam-se por todas as partes da planta. *P. polymyxa*, bactéria usualmente encontrada na rizosfera, provavelmente utilizou este mecanismo para habitar plantas, uma vez que possui capacidade em produzir enzimas hidrolíticas (NIELSEN & SORENSEN, 1997).

Compant et al. (2008) verificaram o potencial da cepa *Burkholderia phytofirmans* PsJN, inicialmente localizada na rizosfera, em invadir os tecidos da fitoespécie *Vitis vinifera*. Os autores também monitoraram o padrão de colonização da bactéria pelos tecidos e órgãos da planta através da técnica de epifluorescência e/ou microscopia confocal (Figura 1). A cepa PsJN foi cronologicamente detectada colonizando a superfície das raízes, entrando nos tecidos da raiz e espalhando-se para as hastes de inflorescência da videira, pedúnculo e então para os frutos imaturos através de vasos do xilema.

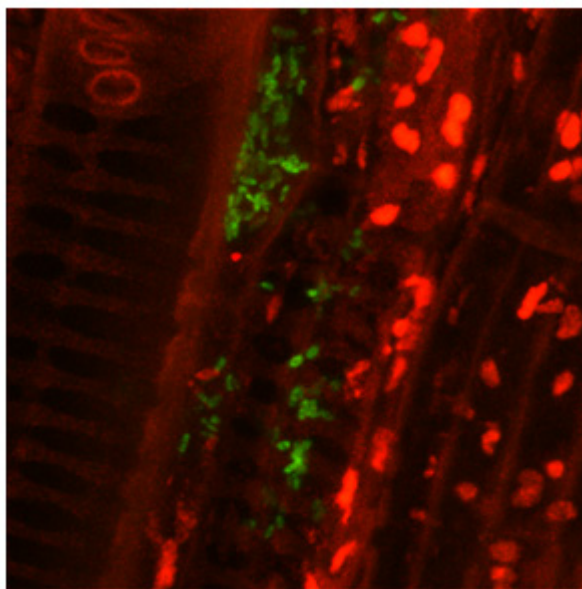


Figura 1. Demonstração do potencial de colonização de tecidos internos da raiz de videira (*Vitis vinifera*) pela bactéria *Burkholderia phytofirmans* PsJN (células em verde) (COMPANT et al., 2008).

1.2 *Paenibacillus polymyxa*

O gênero *Paenibacillus* foi criado por Ash et al. (1993) para acomodar o antigo “grupo 3” do gênero *Bacillus*. Compreende mais de 30 espécies de bacilos (Figura 2) Gram-positivos que contém baixo conteúdo de C+G no material genético, anaeróbios facultativos, formadores de esporos elípticos, neutrofilicos, perifrágelados e heterotróficos (LORENTZ, 2005). O nome do gênero reflete este conjunto de características, uma vez que *Paene*, em latim, significa “quase”, ou seja, *Paenibacillus* é quase um *Bacillus* (LAL & TABACCHIONI, 2009).

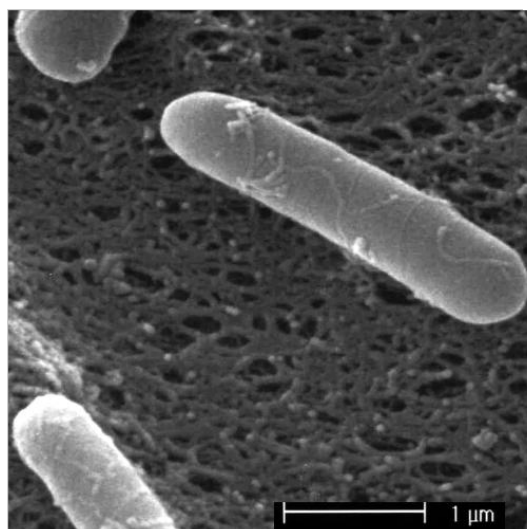


Figura 2. Imagem de microscopia eletrônica de varredura da cepa de *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF (HE et al., 2007).

Bactérias formadoras de esporos, em particular bacilos Gram-positivos e estreptomicetos, têm atraído especial atenção devido a algumas vantagens sobre cepas não formadoras de esporos em formulação de produtos e estabilidade em solo (EMMERT & HANDELSMAN, 1999). Microrganismos comumente encontrados no solo, incluindo *P. polymyxa* (TIMMUSK et al., 2005), podem promover o crescimento de plantas através da produção de hormônios tais como citocinas, auxinas e/ou etileno, giberelinas e habilidade de fixar nitrogênio, ou pela supressão de doenças em plantas causadas por microrganismos deletérios (BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; LOON, 2007)

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), grupo no qual *Paenibacillus polymyxa* está inserido, compreende um conjunto de microrganismos que são benéficos para o crescimento de vegetais (TIMMUSK et al., 2005). Cepas de RPCP podem afetar o desenvolvimento de fitoespécies direta ou indiretamente. Mecanismo indireto envolve secreção de metabólitos secundários como moléculas ativas que antagonizam patógenos (GLICK, 2012). A maioria dos mecanismos propostos para explicar a promoção indireta do crescimento sugere que o princípio ativo pode ser um metabólito bacteriano secundário que antagoniza patógenos. Dentre tais metabólitos incluem-se HCN, sideróforos e antibióticos. O mecanismo direto está associado à competição por nutrientes entre espécies patogênicas e cepas RPCP. A inoculação de *P. polymyxa* em plantas suprime diversos fitopatógenos (YUEN et al., 1991; OEDJIJONO et al., 1993).

Na rizosfera, *P. polymyxa* está envolvido na fixação de nitrogênio (GUEMORI-ATHMANI et al., 2000; HEULIN et al., 1994; LINDENBERG et al., 1985), solubilização de fosfato do solo (SINGH e SINGH, 1993), produção de compostos indólicos tais como auxina (MOTA et al., 2008), exopolissacarídeos (HAGGAG, 2007), quitinase (MAVINGUI e HEULIN, 1994), enzimas hidrolíticas (NIELSEN e SORENSEN, 1997).

Como membro da comunidade da rizosfera, *P. polymyxa* pode antagonizar microrganismos fitopatogênicos e, conseqüentemente, minimizar danos às raízes. RPCP *P. polymyxa* E681 produz compostos orgânicos voláteis (COV) que promovem o crescimento de plantas e induzem a resistência sistêmica em *Arabidopsis* (LEE et al., 2012). Dentre moléculas de COV incluem-se álcoois de cadeia curta, 3-hidroxi-butanona e 2,3 butanediol.

A espécie *P. polymyxa* utiliza variados substratos como seu habitat, tais como solo (DENG et al., 2011), água, raízes de ginseng (CHO et al., 2006; CHO et al., 2007), *Stenoma japonica* (LU et al., 2007), sementes de arroz (COTTYN et al., 2009), alimentos (DAANE et al., 2002, PIURI et al., 1998), folhas de *Prunus* spp (Figura 3) (SERRANO, 2009), rizosfera de plantas incluindo trigo, milho (WEID et al., 2000) sorgo, cana de açúcar, cevada (GUEMOURI-ATHAMANI et al., 2000) e sedimentos marinhos (RAVI et al., 2007).

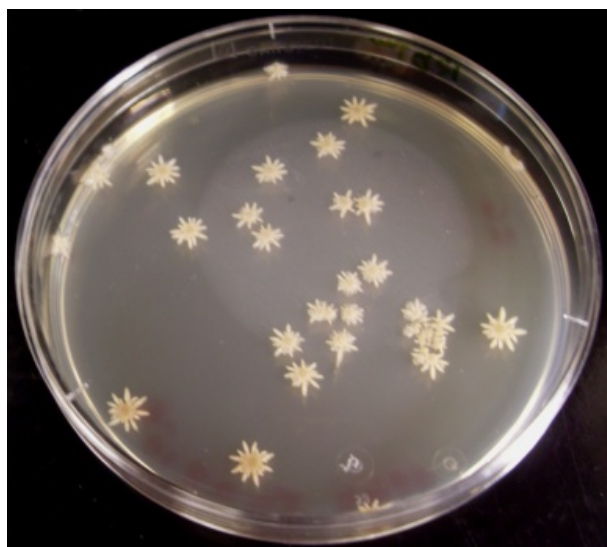


Figura 3. Aspectos morfológicos da cepa *P. polymyxa* RNC-D, endofítico isolado de *Prunus* spp. (SERRANO, 2009).

A espécie *P. polymyxa* tem atraído considerável interesse devido a seu grande potencial biotecnológico em processos industriais diversos e agricultura sustentável. *Paenibacillus polymyxa* endofíticos foram caracterizados pela produção de enzimas fibrinolíticas (LU et al., 2007), hidrolases (CHO et al., 2006), amilase (Figura 4) (JEON et al., 2010), bioatividade contra fungos fitopatogênicos (CHO et al., 2007), bioatividade contra fungos do solo e patógenos oomicetos (TIMMUSK et al., 2003; TIMMUSK et al., 2005) e atividade antagônica contra bactéria Gram-positiva (Figura 5) e Gram-negativa (RATTI et al., 2008; SERRANO, 2009).

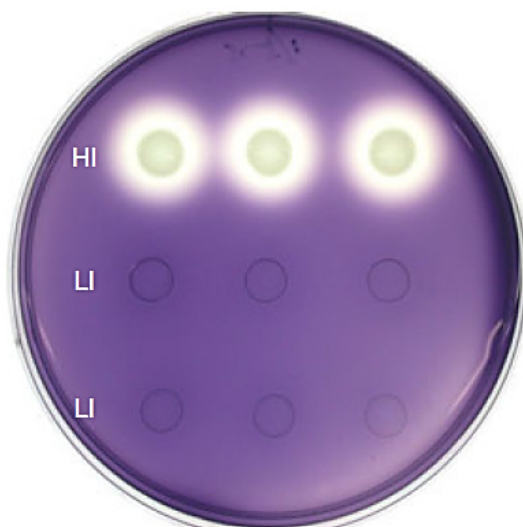


Figura 4. Atividade hidrolítica de amido por *Paenibacillus polymyxa* GBR-1 em *spots* com alta concentração (HI) de inóculo (HI = 1×10^8 UFC/ml) e ausência de atividade em *spots* com baixa concentração (LI) de inóculo (LI = 1×10^6 UFC/ml). A placa contendo ágar amido modificado (suplementado com amido azure – amido de batata ligado covalentemente a azul brilhante de Remazol) foi incubada a 23° C/48 h. (JEON et al., 2010).

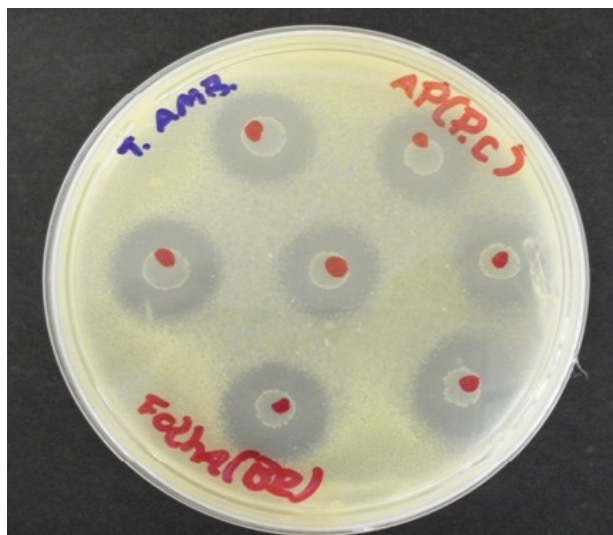


Figura 5. Endofítico *P. polymyxa* (colônias abaixo dos *spots* em vermelho), isolado de folhas de *Prunus* spp., apresentando bioatividade contra *S. aureus* (RATTI et al., 2008).

Espécies de *P. polymyxa* inibiram o crescimento micelial dos fungos patogênicos do arroz *Rhizoctonia solani* e *Pyricularia grisea* e também das bactérias fitopatogênicas *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli*, *Acidovorax avenae* spp *avenae* (COTTYN et al., 2009).

Dados relativos à diversidade de cepas de *Paenibacillus polymyxa*, isoladas de variados habitats, e suas atividades associadas podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Diversidade de cepas de *Paenibacillus polymyxa* e atividades associadas.

Designação da cepa de <i>P. polymyxa</i>	Local de isolamento	Atividade*	Referência
P13	linguiça fermentada	Produção de polixina, composto ativo contra Gram + e Gram -	PIURI et al., 1998
EBL-06	Folhas de trigo	Atividade antagônica contra os fungos fitopatógenos <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium cucumerinum</i> , <i>Fusarium</i> spp	GU et al., 2010
EJS-3	Raízes de <i>Stemona japônica</i>	Produção de enzimas fibrinolíticas	LU et al., 2007
GS01	Raízes de ginseng	Produção de hidrolases	CHO et al., 2006
GS01	Raízes de ginseng	Bioatividade contra fungos fitopatógenos	CHO et al., 2007
B5 e B6	Rizosfera de trigo	Bioatividade contra fungos do solo e fitopatógenos <i>Phytophthora palmivora</i> e <i>Phytim aphanidermatum</i>	TIMMUSK et al., 2003
BP1	Sementes de couve-flor	Produção de gavaserin e saltavalin, ativos contra <i>Xanthomonas campestris</i>	PICHARD et al., 1995
JSa-9	Solo	Produção de polimixina B ₆ e lipopeptídeos LI-F04a e LI-F04b	DENG et al., 2011 (a)
JSa-9	Solo	Produção de uma proteína de 71,9 kDa bioativa contra Gram + e Gram -	DENG et al., 2011 (b)
RNC-D	Folhas de <i>Prunus</i> spp.	Bioatividade contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	SERRANO, 2009

Capítulo 1: Otimização das condições de cultivo para incremento na produção de compostos antimicrobianos pelo endofítico *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

DQ915580	Sedimento marinho	Bioatividade contra <i>Vibrio harveyi</i> e <i>Vibrio</i> spp.	RAVI et al., 2007
OSY-DF	Kimchee (queijo)	Produção de polimixina E1 e <i>paenibacillin</i> (ativo contra G+)	HE et al., 2007
DSM36(T)	Rizosfera de cultivos de milho e sorgo (Brasil)	Produção de auxina	MOTA et al., 2008
KOYAMA		Produção de gatavalin (ativo contra G+, micobactérias e fungos)	NAKAJIMA et al., 1972
L-1129	Solo (Odawara City)	Produção de antibióticos peptídicos LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F07 e LI-F08 ativos contra <i>S. aureus</i>	KURUSU & OHBA, 1987
KT-8	Rizosfera de alho cujas raízes estavam contaminadas por <i>Fusarium oxysporum</i>	Produção de Fusaricidina A, B, C e D (depsipeptídeos ativos contra fungos e bactérias G+)	KAJIMURA & KANEDA, 1996 KAJIMURA & KANEDA, 1997
SCE2	Solo (Brasil)	Produção de proteases, compostos antimicrobianos ativos contra microrganismos patogênicos para humanos, bioatividade contra fungos produtores de micotoxinas	SELDIN et al., 1999 ROSADO & SELDIN, 1993 ALVAREZ et al., 2006 TUPINAMBA et al., 2008
NRRL B-30507 NRRL B-30508 NRRL B-30509	Intestino de frangos	Produção de bacteriocinas de aproximadamente 3,5 kDa ativas contra <i>Campylobacter jejuni</i>	SVETICH et al., 2004
NFB7	Solo	Mobilização de nutrientes do solo (nitrogênio, fósforo e potássio) e	EL-HADDAD et al., 2011

Capítulo 1: Otimização das condições de cultivo para incremento na produção de compostos antimicrobianos pelo endofítico *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

efeito nematicida contra <i>Meloidogyne incognita</i>			
HKA-15	Endofítico de soja	Produção de composto peptídico ativo contra <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	MAGESHWARAN et al., 2010
E681	Rizosfera de cevada	Supressão de doenças em plantas, produção de hormônios vegetais, polimixina e enzimas hidrolíticas	CHOI et al., 2004 KIM et al., 2010 RYU et al., 2005
GBR-1	Raíz de ginseng em decomposição	Produção de amilase	JEON et al., 2003 JEON et al., 2010
INRA AV	Vegetais cozidos resfriados	Biotividade contra <i>Clostridium botulinum</i>	GIRARDIN et al., 2002
-	Solo	Produção de β -glicosidases BglA e BglB	ISORNA et al., 2007 GONZALEZ-CANDELAS et al., 1990 SANZ-APARICIO et al., 1998 ZUBILLAGA et al., 2006

* Gram + : bactérias Gram-positivas; Gram -: bactérias Gram-negativas

A prospecção de potenciais agentes para biocontrole, utilizando como substrato de isolamento folhas de trigo, foi realizado por Gu et al. (2010). A cepa *P. polymyxa* EBL-06 demonstrou alto nível de atividade antagônica contra os fungos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum* e *Fusarium* spp. O isolado EBL-06 apresentou atividade antifúngica máxima (contra $6,5 \times 10^9$ UFC/ml) após 15 horas de cultivo (28° C) em meio MGW-PW (composto por águas residuais com altas concentrações de glutamato monossódico e amido) (Figura 6).

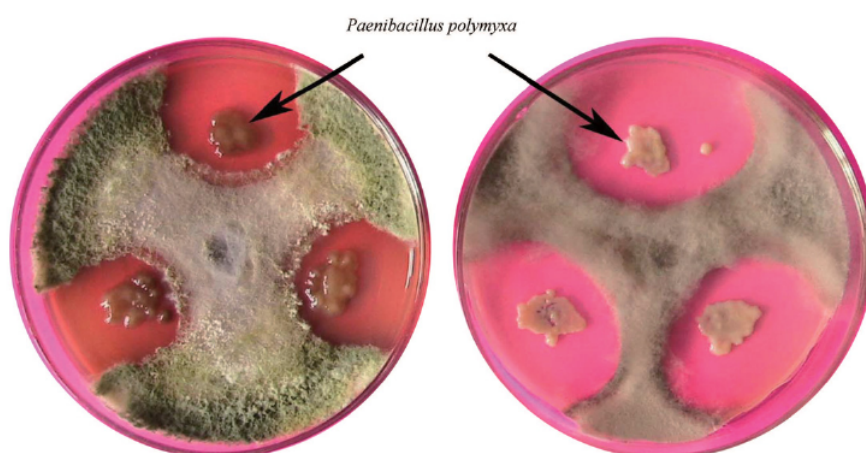


Figura 6. Inibição do crescimento de *Trichoderma harzianum* (esquerda) e *Botrytis cinerea* (direita) por ação de *P. polymyxa* EBL-06 (GU et al., 2010).

Cepas de *Paenibacillus polymyxa* são reconhecidas por suas habilidades em produzir peptídeos antimicrobianos (PAM) ativos contra ampla gama de microrganismos. Um grupo de compostos, bioativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclui polimixinas (KATZ e DEMAIN, 1977), jolipeptin (ITO e MOYAMA, 1972a, 1972b), polipeptins (SOGN, 1976), gavaserin e saltavalin (PICHARD et al., 1995). O outro grupo é formado por moléculas responsáveis pela bioatividade contra bactérias Gram-positivas e fungos, incluindo gatavalin (NAKAJIMA et al., 1972) e fusaricidinas (KAJIMURA e KANEDA 1996, KAJIMURA e KANEDA,1997; CHOI et al., 2007).

Alguns estudos relatam a produção de moléculas por espécies de *P. polymyxa* cujo espectro de atividade abrange bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, tais como a polixina (PIURI et al., 1998), uma substância com massa molar menor que 3,5 kDa (ROSADO e SELDIN, 1993).

P. polymyxa JSa-9 produz uma proteína de 71,9 kDa com amplo espectro de atividade antibacteriana *in vitro* contra Gram-positivos e Gram-negativos (DENG et al., 2011).

1.3 Condições de cultivo versus produção de metabólitos

Produção de metabólitos secundários por microrganismos varia qualitativa e quantitativamente de acordo com a cepa e condições de cultivo usadas (LAM et al., 1989; WANG et al., 2010). Há uma variedade de fatores que podem afetar os processos metabólicos microbianos incluindo o substrato e sua concentração, composição do meio, suprimento de ar/oxigênio, temperatura, pH, concentração de inóculo, tempo de incubação, entre outros. Estas condições influenciam diferentemente cada espécie microbiana, sendo, portanto, de extrema importância o conhecimento acerca das condições ambientais de microrganismos para alcançar a máxima produção dos metabólitos desejados (GOGOI et al., 2008; ADINARAYANA et al., 2003, b).

A concentração inicial de substrato e inóculo aplicados ao cultivo são dois fatores importantes que afetam a conversão de bioprodutos por microrganismos e, por esta razão, estes fatores têm sido avaliados em diferentes estudos (MUSSATO e ROBERTO, 2008; SANTOS et al., 2005). Entretanto, é de grande interesse avaliar simultaneamente o efeito do substrato inicial e concentração de inóculo para evitar uma baixa concentração de substrato por célula, o que poderia resultar em baixa formação de produto. Por outro lado é necessário evitar o uso de concentrações altas de substrato, o que poderia causar inibição do metabolismo microbiano (MUSSATO e ROBERTO, 2008; SANTOS et al., 2005).

Compostos biologicamente ativos são produzidos por microrganismos em pequenas quantidades através de processos fermentativos. Assim, torna-se necessário maximizar a eficiência do processo - em termos de bioconversão do substrato - para minimizar os custos de produção. De acordo com KIRK et al. (2002), a composição do meio de cultivo é um dos parâmetros mais importantes quando enzimas são produzidas em processos industriais uma vez que entre 30 – 40% do custo de produção é estimado para cobrir o valor do meio de cultivo.

A composição do meio de cultivo exerce efeito regulatório no crescimento e metabolismo de microrganismos produtores de compostos bioativos, incluindo peptídeos antibióticos (KIM et al., 2006). Em estudo conduzido por RAZA et al. (2010), foi avaliado o efeito de ions (Ca^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2}) na produção de antifúngicos da classe das Fusaricidinas pela cepa *P. polymyxa* SQR-21. Diferentes concentrações dos ions foram utilizadas para avaliar o comportamento interativo e estabelecer a concentração ótima a fim de obter o máximo de produtos metabólicos microbianos.

Otimização de componentes do meio pela estratégia “uma variável por vez”, a qual envolve variação em uma variável independente foi, durante muito tempo, a técnica mais frequentemente aplicada em biotecnologia (JOHN et al., 2007). Esta estratégia demanda tempo excessivo e é dispendiosa quando um grande número de variáveis é considerado; além disso, é incapaz de detectar o ponto ótimo real, especialmente devido a interações entre os fatores. Atualmente, o uso de análise estatística envolvendo *design* e metodologia superfície-resposta (MSR) tem recebido grande impulso para otimização de meios de cultivo e para a compreensão das interações entre vários parâmetros físico-químicos utilizando, para isto, um número limitado de experimentos (KNIGHT, 2010).

Estudos têm relatado o uso de ferramentas estatísticas para a seleção de condições operacionais ótimas e, conseqüentemente, para a otimização das condições de cultivo, sejam elas substrato inicial, concentração de inóculo, pH, temperatura, aeração, entre outros (SANTOS et al., 2005; MUSSATO e ROBERTO, 2008; SHEN et al., 2005).

Metodologia superfície-resposta constitui-se numa coleção de técnicas estatísticas para experimentos planejados, que visa construir modelos, avaliar os efeitos de fatores e determinar condições ótimas dos fatores estudados para respostas desejadas (CONINCK et al., 2000). O delineamento de tais modelos pode ser realizado pelo ajuste experimental dos dados através de um software estatístico. Através da MSR é possível a interpretação da natureza da resposta e o julgamento da adequabilidade do modelo (CAVALITTO e MIGNOLE, 2007).

O desenvolvimento de modelo preditivo quadrático para otimização de processos através de MSR tem sido frequentemente utilizado devido à simplicidade e eficiência relativamente altas, o que tem sido aplicado em muitas áreas da biotecnologia tais como na otimização da composição de meios de cultivo (WANG e LIU, 2008), extração de bacteriocina através de sistema de duas fases aquosas (LIU et al., 2001), produção de α -amilase (KUNAMNENI et al., 2005), produção de protease (DUTTA et al., 2004), produção de neomicina (ADINARAYANA et al., 2003, a), produção de etanol (ERGUM e MUTLU, 2000), produção de moléculas bioativas (SERRANO et al., 2012).

A otimização do meio e das condições de cultivo para produção de peptídeo antimicrobiano por *Bacillus licheniformis* AnBa9 foi realizada através de MSR com design de compósito central (ANTHONY et al., 2009). Lactose, NH_4NO_3 , extrato de levedura, NaCl, pH, temperatura e tempo de incubação foram selecionadas como variáveis. Considerando-se os ingredientes, alta concentração de extrato de levedura e NaCl apresentaram efeito positivo

na produção do peptídeo antimicrobiano; no mesmo sentido, pH alcalino e temperaturas mais elevadas favoreceram a produção do metabólito. Quando cultivado em condições otimizadas, a produção de bacteriocina por *Bacillus licheniformis* AnBa9 foi 25 vezes maior se comparada ao cultivo não-otimizado.

Design experimental associado a estudo estatístico foi aplicado para otimizar a composição do meio de cultivo para produção de substâncias antifúngicas por *Paenibacillus polymyxa* Cp-S316 (WANG e LIU, 2008). Análise da superfície resposta revelou que os valores ótimos das variáveis testadas para a produção de substâncias ativas foram 12,3 (g/l) lactose, 17,5 (g/l) peptona, 0,4 (g/l) nitrato de sódio, 4,5 (g/l) sulfato de magnésio e 100,0 (g/l) batata. Uma produção de 4.687,71 µg/ml foi obtida experimentalmente, de acordo com o previsto pelo modelo. Em comparação com a produção alcançada pelo uso do meio basal, um incremento de 3,05 vezes foi obtido. A curva de contorno 2D e o desenho de superfície resposta 3D representam graficamente a equação regressiva do modelo (Figuras 7 e 8, WANG e LIU, 2008). Cada figura apresenta o efeito de duas variáveis na produção de substâncias antifúngicas. O gráfico de superfície resposta prevê o rendimento de substâncias ativas para diferentes valores das variáveis testadas; ao mesmo tempo, os contornos são úteis para identificar o tipo de interações entre as variáveis (lactose e peptona, Figura 7; lactose e nitrato de sódio, Figura 8).

O contorno circular presente nas superfícies-resposta sugere que a interação é insignificante entre as variáveis correspondentes, contrariamente ao contorno elíptico (ou em “formato de sela” ou “formato de cúpula”) que indica elevada correlação entre as variáveis. Neste último caso, os valores ótimos das variáveis podem ser obtidos no ponto de intersecção das linhas, o que corresponde à porção mais côncava ou convexa da figura (KNIGHT, 2010).

A Figura 7 mostra as linhas de contorno bidimensionais e a curva de superfície-resposta tridimensional, a partir das quais é possível compreender as interações entre os dois nutrientes e suas quantidades ótimas consideradas no estudo em questão (WANG e LIU, 2008). Os autores puderam concluir que lactose e peptona apresentaram notável interação, e a curva 3D de superfície resposta foi convexa, sugerindo que houve concentrações bem definidas para peptona e lactose. Neste caso, a proporção C/N (entre as fontes de carbono e nitrogênio) foi crítica para a produção de antifúngicos. A razão C/N do meio otimizado foi menor que a utilizada em condições não-otimizadas, sendo, portanto, mais apropriada para a produção dos metabólitos antifúngicos (WANG & LIU, 2008). Resultados semelhantes, nos quais a proporção C/N influencia o crescimento e produção de metabólitos por microrganismos, também foram encontrados por Kiran et al. (2009) e Fonseca et al. (2007).

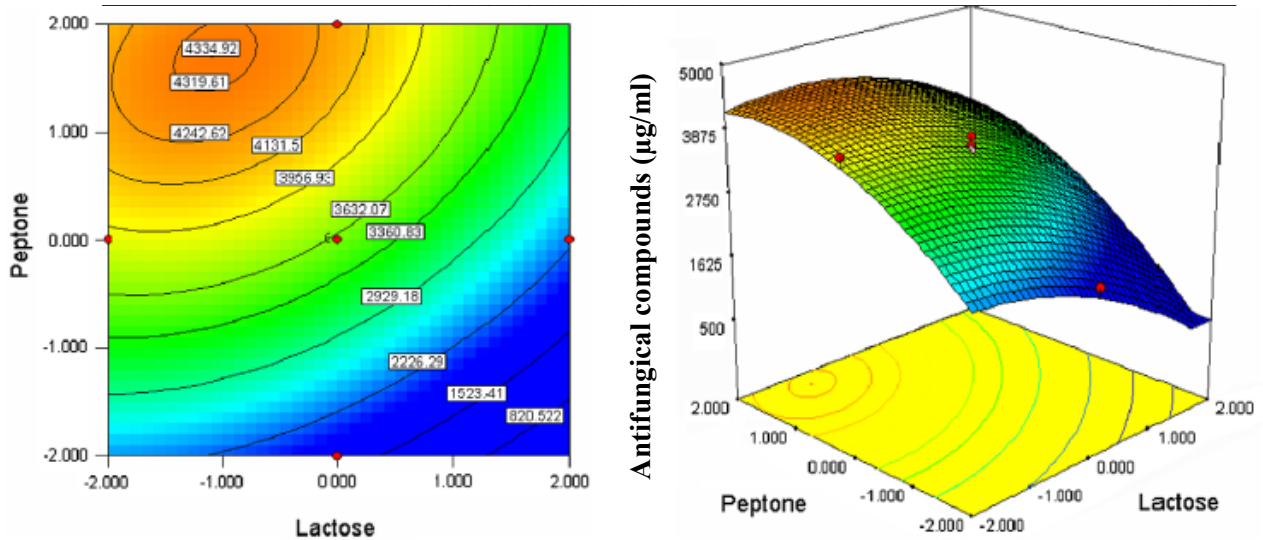


Figura 7. Linhas de contorno 2D (esquerda) e curva 3D de superfície resposta (direita) previstas por modelo quadrático que inter-relacionam as variáveis lactose e peptona e a resposta produção de compostos antigúngicos (WANG e LIU, 2008).

A partir da Figura 8 é possível verificar que as variáveis lactose e nitrato de sódio não apresentaram interação significativa, indicando que o composto nitrato de sódio atuou como o principal fornecedor de Na^+ , e não como fonte de nitrogênio (WANG e LIU, 2008).

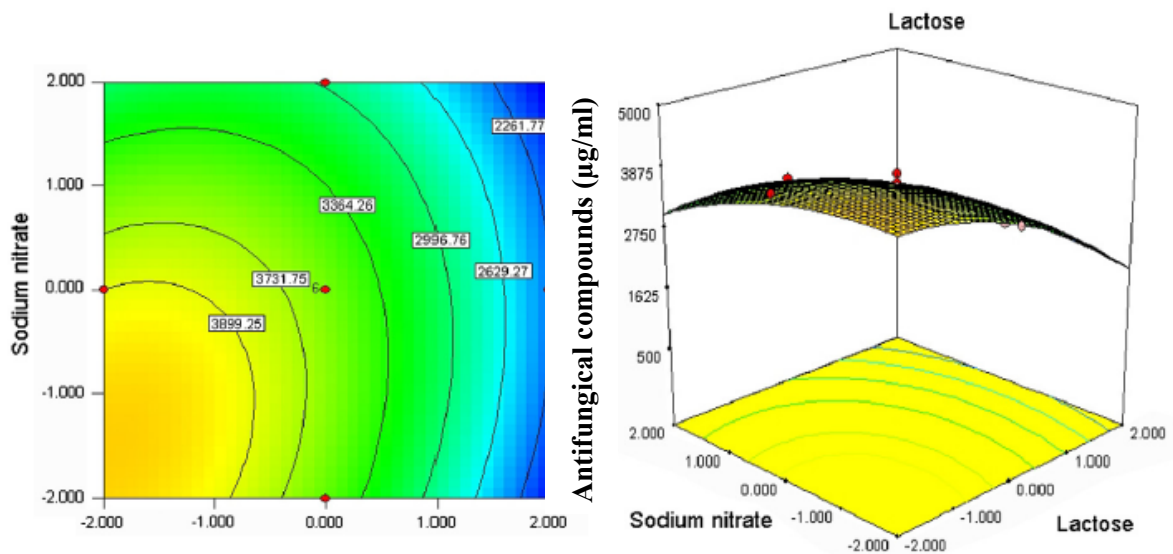


Figura 8. Linhas de contorno 2D (esquerda) e curva 3D de superfície resposta (direita) previstas por modelo quadrático que inter-relacionam as variáveis lactose e nitrato de sódio e a resposta produção de compostos antigúngicos (WANG e LIU, 2008).

A otimização da produção de metabólitos representa uma das etapas para a conversão de processos que operam em escala de bancada para a produção em larga escala, característica de níveis industriais. Sendo assim, o estudo das variáveis internas e externas é de extrema importância para a vasta maioria dos processos biotecnológicos.

1 Experimental

2.1 Cepas bacterianas e meios de cultivo

A bactéria endofítica *Paenibacillus polymyxa* RNC-D foi isolada de folhas de *Prunus* spp., conforme descrito em estudo anterior (RATTI et al., 2008). *P. polymyxa* RNC-D foi cultivado em meio YPM composto por (g/l): glicose (5-20), extrato de levedura (11,25), peptona (11,25), extrato de malte (20) e ágar (15) (SERRANO et al., 2012). O pH do meio YPM foi ajustado em 7,0 adicionando-se volume suficiente de solução 5 M NaOH. Para esterilização do meio, todos os componentes foram autoclavados a 121° C durante 15 minutos, exceto a solução de glicose, a qual foi autoclavada a 112° C por 15 minutos e transferida assepticamente ao frasco contendo os demais componentes do meio YPM.

Para estocagem a longo prazo, a cepa de endofítico foi cultivada em caldo YPM a 30° C durante 16 horas e *vials* congelados a -80° C com 15% (v/v) glicerol. A bactéria indicadora Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi cultivada em *Trypticase Soy Agar* (TSA) a 37° C, e mantida em placas a 4° C. Culturas estoque foram mantidas em *vials* a -80° C com 15% (v/v) glicerol. As placas do microrganismo indicador foram renovadas a cada 3 semanas.

2.2 Condições de fermentação

Uma alíquota de 50 µl de cultura estoque de *P. polymyxa* RNC-D foi semeada em placa de Petri contendo ágar YPM, a qual foi mantida a 30 °C durante 48 h. O inóculo foi então preparado transferindo-se uma única colônia da placa de Petri para um *Erlenmeyer* de 250 ml contendo 100 ml de caldo YPM. O frasco foi incubado em *shaker* orbital a 30° C/180 rpm/16 h. A cultura foi centrifugada (12.857 g/15 min) e as células foram lavadas duas vezes em água destilada esterilizada. Posteriormente o inóculo foi preparado ajustando-se a densidade óptica ao valor de 1,0 (λ 600 nm) e as células ressuspensas foram transferidas para o meio de produção. Os volumes celulares de inóculo utilizado foram de 2,5 e 5,0% (v/v). As fermentações foram realizadas em *Erlenmeyers* de 500 ml contendo 200 ml de caldo YPM cuja concentração de glicose variou entre 5 e 40 g/l. Os frascos foram incubados 30° C/180 rpm/96 h. O pH do meio não foi monitorado no decorrer da fermentação. Após o período de

incubação, o caldo fermentado foi centrifugado (12.857 g/15 min) e o *pellet* utilizado para determinar a formação de biomassa. O sobrenadante foi filtrado em membrana de poro 0,22 µm e designado extrato total (ET), o qual foi posteriormente utilizado para medir a redução na tensão superficial e avaliação de atividade antimicrobiana.

2.3 Métodos analíticos

A concentração de biomassa (g/l) foi determinada medindo-se a absorvância do meio de cultura fermentado, a qual foi correlacionada com uma curva de calibração (massa seca x densidade óptica). Um volume de 100 ml do caldo fermentado foi centrifugado (12.857 g/15 min) e o *pellet* foi lavado três vezes em água destilada. Então as células foram ressuspensas em 100 ml de água destilada e esta suspensão celular foi diluída 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 e 1000 vezes. A densidade óptica destas diluições foi verificada (λ 600 nm). Paralelamente, volumes conhecidos da suspensão celular preparada foram secos a 105° C até alcançar biomassa constante. A concentração de biomassa em cada amostra diluída foi então correlacionada com o respectivo valor de absorvância. Uma curva de calibração foi estabelecida para cada concentração de glicose usada nos experimentos, tais quais 5 g/l (Eq.1), 22,5 g/l (Eq.2) e 40 g/l (Eq.3). Elevados valores de coeficiente de determinação (R^2) foram obtidos, e as equações das curvas estão descritas a seguir, onde DO – densidade óptica; B – biomassa.

$$DO = 0,0363B + 0,0273 \quad R^2 \ 0,9862 \quad \text{Eq.1}$$

$$DO = 0,0237B + 0,0259 \quad R^2 \ 0,9937 \quad \text{Eq.2}$$

$$DO = 0,0436B + 0,0339 \quad R^2 \ 0,9947 \quad \text{Eq.3}$$

A tensão superficial dos ETs produzidos por *P. polymyxa* RNC-D foi determinada pelo *Ring Method* (Rodrigues *et al.*, 2006, b) usando o tensiômetro KRUSS equipado com um anel de platina De Noüy (1,9 cm de diâmetro). A redução da tensão superficial (RTS) dos extratos, comparada com o meio de cultura, foi verificada a 28 °C e expressa em mN/m. Esta análise foi utilizada para quantificar indiretamente a produção de compostos antimicrobianos.

A atividade antimicrobiana dos ETs foi quantificada pela técnica de microdiluição em caldo (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2011) e a concentração inibitória mínima (CIM) foi expressa em µg/ml. A bactéria indicadora Gram-negativa foi cultivada 16 h em caldo TSB a 37° C, 120 rpm. Após incubação, as células foram

centrifugadas e a biomassa bacteriana ressuspensa em caldo Mueller-Hinton (MH). O inóculo foi ajustado para $1,0 \times 10^6$ UFC/ml e um volume de 100 μ l

da suspensão bacteriana foi transferida para cada poço de uma placa de 96 poços. Paralelamente, os extratos foram duplo-serialmente diluídos usando caldo MH e um volume de 100 μ l foi adicionado aos poços, em triplicata. Controles positivo e negativo foram preparados da seguinte maneira, respectivamente: 100 μ l caldo YPM + 100 μ l inóculo bacteriano (caldo MH), e 100 μ l caldo YPM + 100 μ l caldo MH. As microplacas de 96 poços foram incubadas a 37 °C/120 rpm por 24 h. CIM é definida como a menor concentração do extrato na qual o microrganismo indicador não apresenta crescimento visível.

2.4 Design experimental

A influência das variáveis concentração de glicose (x_1) e concentração de inóculo (x_2) na produção de metabólitos antimicrobianos por *P. polymyxa* RNC-D foi avaliada através do design de composto central 2^2 com três níveis codificados. Para análise estatística, as variáveis foram codificadas de acordo com Eq.4, onde cada variável independente é representada por x_i (valor codificado), X_i (valor real), X_0 (valor real no ponto central) e ΔX_i (*step change value*). Os limites e níveis das variáveis, os quais foram selecionados com base em dados da literatura, são mostrados na Tabela 1.

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X_i} \quad \text{Eq.4}$$

Três ensaios, utilizando as variáveis do ponto central, foram realizados para estimar o erro experimental, dado necessário para a análise de variância. Tal informação também é imprescindível para examinar a presença da curvatura nas superfícies de respostas, bem como para investigar a adequabilidade dos modelos propostos. A formação de biomassa, CIM contra *E. coli* e a RTS foram tomadas como variáveis dependentes ou respostas dos experimentos delineados.

A análise dos dados obtidos pela metodologia de superfície resposta resultou na definição de equações as quais permitiram calcular o valor máximo a ser obtido em cada uma das respostas, individualmente. Os modelos quadráticos que predizem o ponto ótimo de cada resposta foram expressos de acordo com Eq.5, onde y_i representa a variável resposta, b_0 é o

coeficiente de interceptação, b_1 e b_2 são os termos lineares, b_{11} e b_{22} termos quadráticos e x_1 e x_2 representam as variáveis estudadas:

$$\hat{y}_i = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \quad \text{Eq.5}$$

Design expert versão 5.0 e *Statistica* versão 5.0 foram os softwares usados para regressão e análise gráfica dos dados. A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo *Student's t-test*. As equações modelo de segunda ordem foram determinadas pelo teste de Fischer, e a proporção de variância explanada pelos modelos obtidos foi dada pelo coeficiente múltiplo de determinação (R^2). Os valores ótimos das variáveis foram obtidos por análise gráfica e numérica, de acordo com os seguintes critérios: biomassa e RTS – maiores valores possíveis; e CIM – menor valor possível. Em estágio posterior, a condição que simultaneamente maximize as três respostas foi estabelecida através de otimização gráfica. Por conseguinte, experimentos de cultivo foram realizados em triplicata para validar o modelo e calcular o erro padrão.

3 Resultados e discussão

3.1 Design do compósito central e influência das variáveis nas respostas

Um design de compósito central 2^2 com três repetições no ponto central foi empregado para estudar o efeito das concentrações de glicose e inóculo na produção de metabólitos antimicrobianos por *P. polymyxa* RNC-D, totalizando onze conjuntos (sets) de experimentos. A matriz experimental com os níveis reais e codificados das variáveis, bem como os resultados de formação de biomassa, CIM contra *E. coli* e RTS são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz experimental dos valores reais e codificados das variáveis independentes usadas durante a fermentação de glicose por *P. polymyxa* RNC-D, e os resultados obtidos para as respostas formação de biomassa, CIM contra *E. coli* e RTS.

Ensaio	variáveis independentes ^a		Respostas		
	valores reais e (codificados)		(variáveis dependentes)		
	x ₁	x ₂	Biomassa (g/l)	CIM (µg/ml)	RTS (mN/m)
1	5,0 (-1)	2,5 (-1)	0.60	1000.0	18.4
2	40,0 (+1)	2,5 (-1)	2.13	15.6	14.84
3	5,0 (-1)	5,0 (+1)	0.76	250.0	20.0
4	40,0 (+1)	5,0 (+1)	4.11	15.6	11.5
5	40,0 (+1)	3,75 (0)	3.09	31.25	11.6
6	5,0 (-1)	3,75 (0)	0.69	500.0	16.25
7	22,5 (0)	5,0 (+1)	3.33	62.5	14.1
8	22,5 (0)	2,5 (-1)	2.90	62.5	10.5
9	22,5 (0)	3,75 (0)	3.05	31.25	9.8
10	22,5 (0)	3,75 (0)	3.13	62.5	9.8
11	22,5 (0)	3,75 (0)	3.01	62.5	10.2

^a x₁ = concentração de glicose (g/l); x₂ = concentração de inóculo (% v/v)

Analisando-se os dados da Tabela 2 é possível inferir que os valores das respostas variaram consideravelmente de acordo com as concentrações de glicose e inóculo utilizadas em cada experimento. A formação de biomassa aumentou aproximadamente 7 vezes de acordo com as condições experimentais aplicadas. A CIM dos extratos apresentou ampla

variação, cujos valores foram de 15,6 a 1000,0 µg/ml; a máxima redução na tensão superficial do extrato alcançou 20,0 mN/m (ensaio 3). A análise de variância destes dados (Tabela 2) revelou efeitos significativos ($p < 0,05$) de ambas as variáveis (concentração de glicose e inóculo) em todas as respostas.

A concentração inicial de glicose também demonstrou ter influência significativa durante a produção de um peptídeo antimicrobiano por *Bacillus* sp. fmbJ224 (SHEN et al., 2005). Estes autores determinaram que 8,13 g/l foi a concentração ótima de glicose, a qual combinada com outras variáveis permitiram o aumento da concentração de peptídeo de 1.304,21 µg/ml para 1.487,58 µg/ml. Isto representa um incremento de 14,05%. Considerando os dados apresentados nesta pesquisa somados àqueles obtidos por Shen et al. (2005), pode-se inferir que as concentrações iniciais de substrato e inóculo são parâmetros de grande influência em processos fermentativos. Tal afirmação também foi reportada por outros autores (ADINARAYANA et al., 2003-b; GOGOI et al., 2008; MUSSATTO e ROBERTO, 2008).

Em estudo conduzido por Wang e Liu (2008), experimentos revelaram que a fonte de carbono lactose teve efeitos na produção de substâncias antifúngicas por *P. polymyxa* Cp-S316. Esta cepa foi capaz de coproduzir compostos antifúngicos, polimixina E e pelo menos três novos peptídeos antibióticos quando cultivada em meio contendo batata, lactose, extrato de carne, NH₄SO₄, MgSO₄, KH₂PO₄. Aplicando-se as concentrações de 2% (v/v) de inóculo e 12,3 g/l de glicose, foi possível culminar em 4.687,71 µg/ml de compostos antifúngicos (WANG e LIU, 2008). Em comparação com a produção de antifúngicos por *P. polymyxa* Cp-S316 em meio basal, um incremento de 3,05 vezes foi obtido.

O valor da concentração inicial da fonte de carbono (WANG e LIU, 2008) é similar com aquela (16 g/l) predita e validada no modelo do presente estudo. O ajuste na concentração da fonte de carbono desempenha um papel importante na ativação do metabolismo secundário de *P. polymyxa* Cp-S316, o que resultou em uma produção ampliada de substâncias antifúngicas. O mesmo resultado foi observado no presente estudo, no qual a porcentagem de aumento/redução CIM contra *E. coli* foi de 96,88%.

3.2 Elaboração do modelo experimental e análise estatística

A significância estatística dos termos quadráticos (Q) (Tabela 3) sugere que equações polinomiais de segunda ordem são mais adequadas do que equações de primeira ordem para descrever as variações de respostas da função entre as variáveis concentração de glicose e inóculo. Os parâmetros de modelos de segunda ordem aplicados para estimar as variações das

respostas (biomassa, CIM e RTS) em função de variações nas variáveis (concentração de glicose e inóculo) foram obtidos por análise regressiva múltipla. Quando possível, as variáveis ou termos de interação não significativos ao nível de confiança de 95% foram excluídos dos modelos.

Modelos matemáticos representando a formação de biomassa, CIM contra *E. coli* e RTS na região experimental considerada neste estudo foram expressas nas Equações 6, 7 e 8, respectivamente. As variáveis concentração de glicose (x_1) e inóculo (x_2) são representadas por seus valores codificados. Os modelos não apresentaram falta de ajuste e apresentaram altos coeficientes de determinação ($R^2 \geq 0,89$), o que foi capaz de explicar mais de 89,0% da variabilidade das respostas. Estes modelos são bastante úteis para estimar o máximo valor a ser obtido para cada resposta quando houver variação nas concentrações de glicose e inóculo dentro do intervalo de valores estudados.

$$\text{Biomassa (g/l)} = 3,08 + 1,21x_1 - 1,19x_1^2 + 0,43x_2 + 0,45x_1x_2 \quad R^2 = 0,99 \text{ (Eq.6)}$$

$$\text{CIM (\mu g/ml)} = 56,25 - 281,26x_1 + 245,83x_1^2 - 125,00x_2 + 187,50x_1x_2 \quad R^2 = 0,94 \text{ (Eq.7)}$$

$$\text{RTS (mN/m)} = 9,96 - 2,79x_1 + 3,94x_1^2 + 2,31x_2^2 \quad R^2 = 0,89 \text{ (Eq.8)}$$

Tabela 3. Análise de variância para os efeitos das concentrações de glicose e inóculo nas respostas de formação de biomassa, CIM contra *E. coli*, e RTS durante a fermentação de glicose por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

Fonte de variação	Biomassa				CIM				RTS			
	SS	d.f.	Valores de F	Valores de p	SS	d.f.	Valores de F	Valores de p	SS	d.f.	Valores de F	Valores de p
(1) Glicose (L)	8,84	1	297,65	0,000***	474.637,5	1	42,87	0,001***	46,54	1	31,41	0,003***
Glicose (Q)	3,63	1	122,30	0,000***	142.097,4	1	12,84	0,016**	39,24	1	26,48	0,004***
(2) Inóculo (L)	1,10	1	37,04	0,002***	93.750,0	1	8,47	0,033**	0,58	1	0,39	0,560
Inóculo (Q)	0,00	1	0,10	0,769	2.878,9	1	0,26	0,632	13,52	1	9,13	0,029**
(1)L por (2)L	0,82	1	27,61	0,003***	140.625,0	1	12,70	0,016**	6,10	1	4,12	0,098
Erro	0,15	5			55.357,3	5			7,41	5		
Total	14,76	10			932.057,6	10			130,65	10		

SS, soma dos quadrados; d.f., *degrees of freedom*; (L) termo linear; (Q) termo quadrático. $R^2 = 0,99$ para biomassa, e 0,94 para CIM e RTS.

*** Significância ao nível de confiança de 99%; ** Significância ao nível de confiança de 95%.

Raza et al. (2010) também usaram a metodologia de superfície- resposta para avaliar o efeito dos íons metálicos Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} na produção de compostos antifúngicos (fusaricidinas A, B, C e D) por *P. polymyxa* SQR-21. Os valores das respostas diâmetro da zona de inibição (mm) e crescimento (densidade óptica a 600 nm) foram medidos para cada condição experimental aplicada. Em tal estudo, alto grau de correlação entre os dados preditos e observados acerca da zona de inibição ($R^2 = 0,74$) e crescimento ($R^2 = 0,71$) foi obtido por estes autores. No presente estudo, valores maiores de coeficientes de determinação foram obtidos, sejam eles 0,99 para biomassa, 0,94 para CIM e 0,89 para RTS. Estes valores elevados representam um melhor ajuste entre as equações de regressão e os resultados experimentais.

3.3 Curvas de superfícies-respostas e otimização gráfica

As superfícies de resposta tridimensionais descritas pelas equações do modelo estão representadas na Figura 9. Estas superfícies mostram claramente a existência de regiões onde os valores de resposta são maximizados ou minimizados, evidenciando relações entre as variáveis e respostas. A formação de biomassa (Figura 9A) é maximizada quando se utiliza o maior nível de inóculo (5% v/v) e concentração de glicose variando entre 22,5 e 40,0 g/l (região escura no gráfico). Valores similares de inóculo e glicose não são os mais adequados para obter os menores valores de CIM (região branca na Figura 9B) ou a mais alta RTS (região escura na Figura 9C). Portanto uma otimização gráfica baseada nos três modelos propostos foi realizada no intuito de encontrar um ponto ou região onde os resultados de biomassa e RTS pudessem ser os maiores possíveis, ao mesmo tempo em que o valor de CIM pudesse atingir os menores valores possíveis.

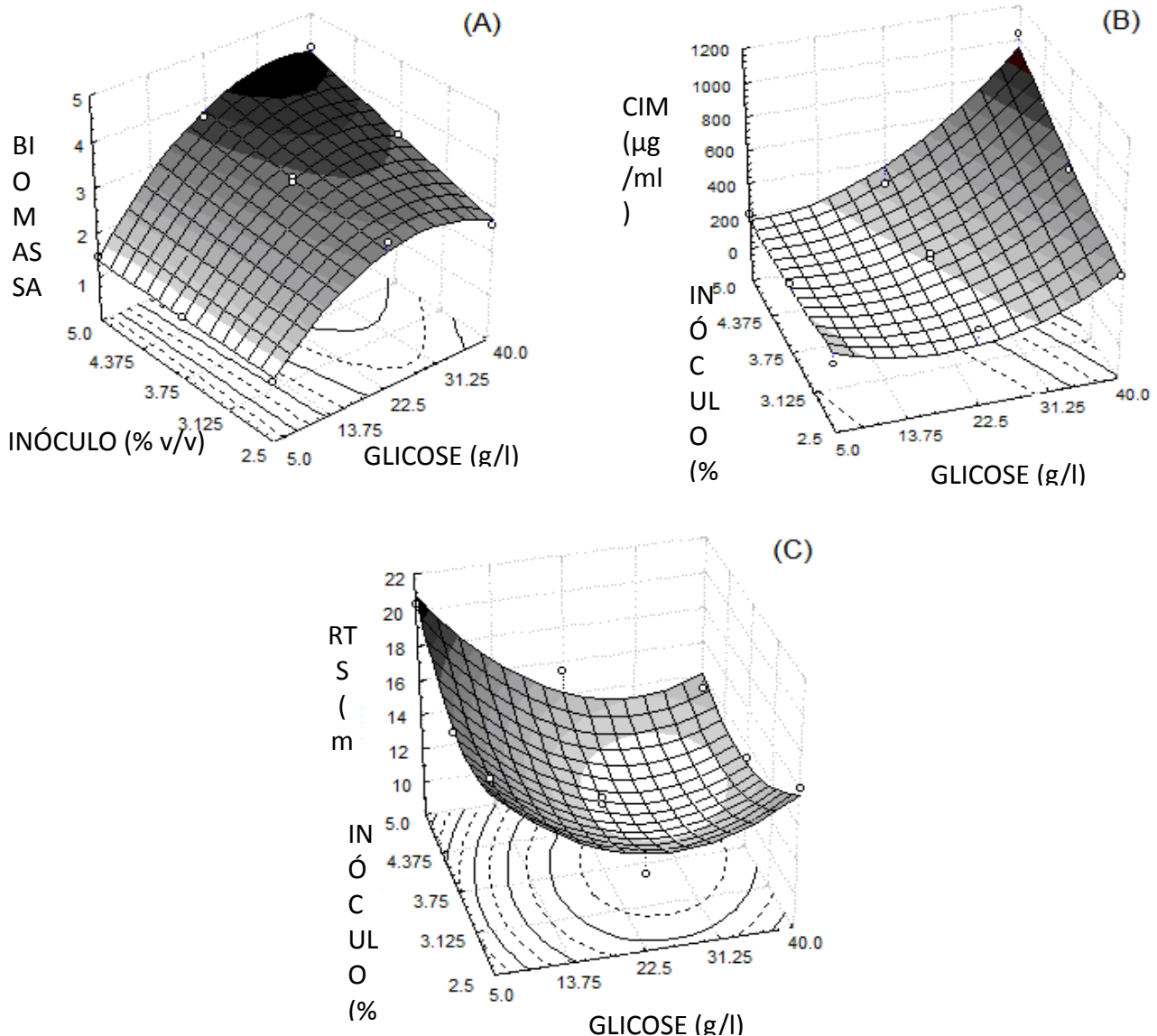


Figura 9. Superfícies-resposta descritas pelos modelos representando a formação de biomassa (A), CIM contra *E. coli* (B) e RTS (C) durante a fermentação da glicose por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

O método de otimização gráfica essencialmente consistiu na sobreposição das curvas de todos os modelos, focando critérios estabelecidos. No presente estudo os critérios adotados foram: (i) formação de biomassa entre 2,5 e 3,5 g/l; (ii) valores de CIM entre 15 e 200 µg/ml; e (iii) RTS entre 10 e 17 mN/m. O *plot* de sobreposição resultante (Figura 10) mostra uma área onde todos os critérios impostos são satisfeitos (região branca). Um ponto foi caracterizado nesta área como ponto ótimo (marcado pelo

quadrado), o qual correspondeu à concentração inicial de glicose de 16 g/l e de inóculo 5% (v/v). Nestas condições o modelo proposto prediz uma formação de biomassa de 2,76 g/l, CIM de 15,80 µg/ml e RTS de 14,58 mN/m. Ensaio para validação deste modelo foram então executados sob as condições operacionais estabelecidas. Os valores registrados após os ensaios foram de 2,05 g/l, 31,2 µg/ml e 10,7 mN/m para formação de biomassa, CIM e RTS, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os critérios adotados para otimização e confirmam a validade deste modelo proposto.

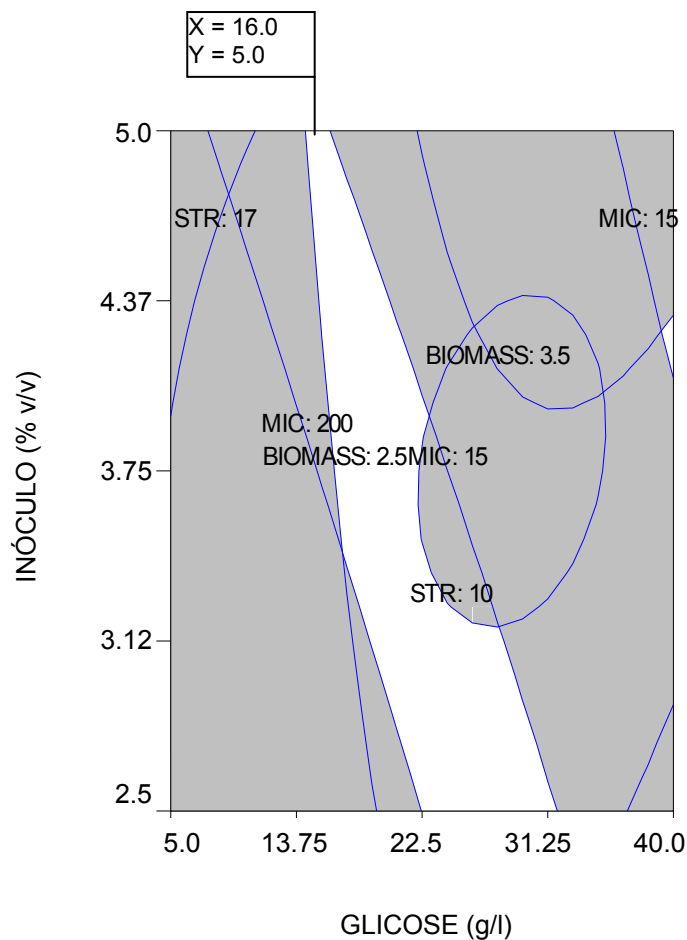


Figura 10. Região ótima definida pela sobreposição de gráficos das três respostas avaliadas (formação de biomassa, CIM contra *E. coli* e RTS) como funções das concentrações de glicose e inóculo.

Em estudo conduzido por Wang e Liu (2008), experimentos revelaram que a fonte de carbono lactose teve efeitos na produção de substâncias antifúngicas por *P. polymyxa* Cp-S316. Esta cepa foi capaz de coproduzir compostos antifúngicos, polimixina E e pelo menos três novos peptídeos antibióticos quando cultivada em meio contendo batata, lactose, extrato de carne, NH_4SO_4 , MgSO_4 , KH_2PO_4 . Aplicando-se as

concentrações de 2% (v/v) de inóculo e 12,3 g/l de glicose, foi possível alcançar a concentração de 4.687,71 µg/ml de compostos antifúngicos (WANG e LIU, 2008). Em comparação com a produção de antifúngicos por *P. polymyxa* Cp-S316 em meio basal, um incremento de 3,05 vezes foi obtido.

O valor da concentração inicial da fonte de carbono (WANG e LIU, 2008) é similar com aquela (16 g/l) predita e validada no modelo do presente estudo. O ajuste na concentração da fonte de carbono desempenha um papel importante na ativação do metabolismo secundário de *P. polymyxa* Cp-S316, o que resultou em uma produção ampliada de substâncias antifúngicas. O mesmo resultado foi observado no presente estudo, no qual a porcentagem de redução da CIM contra *E. coli* foi de 96,9%.

O estabelecimento de condições de fermentação ótimas constitui uma importante etapa no desenvolvimento de estratégias para modular a produção de moléculas antimicrobianas por *P. polymyxa* RNC-D a níveis elevados.

4 Conclusões do Capítulo 1

Concentrações iniciais de glicose e inóculo demonstraram-se como variáveis de grande influência na produção de metabólitos antimicrobianos por *P. polymyxa* RNC-D. Através dos métodos de *design* fatorial experimental e superfície-resposta seguidos por otimização gráfica foi possível determinar a condição operacional ótima a fim de alcançar máximas biomassa e RTS, bem como menores valores possíveis de CIM. A validade do modelo proposto foi verificada e confirmada. O processo fermentativo, quando efetuado sob condições não-otimizadas, resultou em valores de biomassa, CIM e RTS de 0,6 g/l, 1000,0 µg/ml, 10,7 mN/m, respectivamente. Entretanto, quando os experimentos foram executados em condições otimizadas, estes valores foram correspondentes a 2,05 g/l, 31,2 µg/ml e 18,4 mN/m, respectivamente, o que representa uma porcentagem de incremento de 241,7%, 96,9% e 41,9%. Foi constatado que altas concentrações do substrato glicose, embora refletissem em aumento de biomassa bacteriana, inibiram o metabolismo secundário microbiano, resultando em baixa produção de biomoléculas associada a altos valores de CIM. Por conseguinte, o presente estudo constitui-se em importante etapa no desenvolvimento de estratégias para modular a produção de moléculas antimicrobianas por *P. polymyxa* RNC-D a níveis elevados.

5 Referências

ADINARAYANA, K. et al. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. **Proc Biochem**, v. 38, p. 1565–1572, 2003 (a).

ADINARAYANA, K. et al. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. **Proc Biochem**, v. 39, p. 171–177, 2003 (b).

ALVAREZ, V.M. et al. Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. **Lett Appl Microbiol**, v. 43, p. 625-630, 2006.

ANTHONY, T et al. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. **Biores Tech**, v. 100, p. 872–877, 2009.

ARNOLD, A.E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 64, p. 253–260, 1993.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr Opin Plant Biol**, v. 4, p. 343–350, 2001.

CAO, L.X. et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface sterilized banana roots. **FEMS Microbiol Lett**, v. 247, p.147–152, 2004.

CASTILLO, U.F. et al. Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. **Microb Ecol**, v. 53, n. 1, p. 12-19, 2007.

CASTILLO, U.F. et al. Munumbicins wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, p. 2675–2685, 2002.

CAVALITTO, S.F.; MIGNONE, C.F. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. **Process Biochem**, v. 42, p. 175–179, 2007.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **PNAS**, v. 100, p.14555-14561, 2003.

CHO, K.M. et al. A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 73, n. 3, p. 618-630, 2006.

CHO KM et al. (2007) Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. **Microb Ecol**, v. 54, n. 2, p. 341-351, 2007.

CHOI, O. et al. Colonization and population changes of a biocontrol agent. **J Plant Pathol**, v. 20, p. 97–102, 2004.

CHOI, S.K., et al. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 365, p. 89–95, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement, M100-S21, Wayne, 2011, 23p.

COELHO, M.R. et al. Diversity of *Paenibacillus* spp. in the rhizosphere of four sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars sown with two contrasting levels of nitrogen fertilizer assessed by rpoB-based PCR-DGGE and sequencing analysis. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, n. 5, p. 753-760, 2007.

COMPANT, S. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 63, n. 1, p. 84-93, 2008.

CONINCK, J. et al. Industrial media and fermentation processes for improved growth and protease production by *Tetrahymena thermophila*. **J Ind Microbiol Biotech**, v. 24, p. 285–290, 2000.

COTTYN, B. et al. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. **J Appl Microbiol**, v. 107, n. 3, p. 885-897, 2009.

DEMAIN, A.L. Industrial Microbiology. **Science**, v. 214, p. 987-994, 1981.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 52, p. 455-463, 1999.

DENG, Y. et al. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. **Peptides**, v. 32, p. 1917-1923, 2011 (a).

DENG, Y. Study on an antimicrobial protein produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 isolated from soil. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p.1803–1807, 2011 (b).

DEVI, P. Isolation and characterization of antibacterial compound from a mangrove-endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* MTCC 5108. **Indian J Microbiol**, v. 52, n. 4, p. 617-623, 2012.

DUTTA, J.R.; DUTTA, P.K.; BANERJEE, R. Optimization of culture parameters of extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models. **Process Biochem**, v. 39, p. 2193–2198, 2004.

EL-HADAD, M.E. et al. The nematicidal effect of some bacterial biofertilizers on *Meloidogyne incognita* in sandy soil. **Braz J Microbiol**, v. 42, p. 105-113, 2011.

EMMERT, E.A.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plantdisease: a (Gram) positive perspective. **FEMS Microbiol Lett**, v. 171, p. 01–09, 1999.

ERGUM, M.; MUTLU, F. Application of a statistical technique to the reduction of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour Technol**, v. 73, p. 251–255, 2000.

EZRA, D. et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* spp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, p. 785–793, 2004.

FAVORETTO, N.B. **Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos – SP.** 2010. 53f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2010.

FONSECA, R.R. et al. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. **Appl Biochem Biotech**, 07: 471–86, 2007

GIRARDIN H, ALBAGNAC C, DARGAIGNARATZ C, NGUYEN-THE C, CARLIN F. (2002) Antimicrobial activity of foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. **J Food Prot**, 65(5): 806-13.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bactéria: mechanisms and applications. **Scientifica (Cairo)**: 963401, 2012.

GONZALEZ-CANDELAS, L.; RAMON, D.; POLAINA, J. Sequences and homology analysis of two genes encoding β -glucosidases from *Bacillus polymyxa*. **Gene**, v. 30, p. 31–38, 1990.

GOGOI, D.K. et al. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. **J Mycol Médicale**, v. 18, p. 01–09, 2008.

GU, L. et al. Production of a newly isolated *Paenibacillus polymyxa* biocontrol agent using monosodium glutamate wastewater and potato wastewater. **J Environ Sci**, v. 22, n. 9, p. 1407–1412, 2010.

GUEMOURI-ATHMANI, S. et al. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. **Eur J Soil Biol**, v. 36, p. 149–159, 2000.

GUIMARAES, D.O. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 134-144, 2008.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **J Nat Prod**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, Y. et al. Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, p. 3156–3165, 2012.

HAGGAG, W.M. et al. Colonization of exopolysaccharide-producing *Paenibacillus polymyxa* on peanut roots for enhancing resistance against crown rot disease. **Afri J Biotechnol**, v. 6, p. 1568–1577, 2007.

HAZALIN, N.A. et al. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. **BMC Complement Altern Med**, v. 21, n.9, p. 46, 2009.

HE, Z. et al. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and Polymyxin. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 1, p. 168-178, 2007.

HEULIN, T. et al. *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N₂-fixing bacteria associated with wheat rhizosphere in French soils. **Eur J Soil Biol**, v. 30, p. 35–42, 1994.

ISORNA, P. et al. Crystal Structures of *Paenibacillus polymyxa* β-Glucosidase B Complexes Reveal the Molecular Basis of Substrate Specificity and Give New Insights into the Catalytic Machinery of Family I Glycosidases. **J Mol Biol**, v. 371, p. 1204–1218, 2007.

ITO, M.; KOYAMA, Y. Jolipeptin, a new peptide antibiotic. The mode of action of jolipeptin. **J Antibiot**, v. 25, p. 309–314, 1972 (a).

ITO, M.; KOYAMA, Y. Jolipeptin, a new peptide antibiotic. Isolation, physico-chemical and biological characteristics. **J Antibiot**, v. 25, p. 304–308, 1972 (b)

JEON, Y.H. et al. Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. **J Microbiol Biotechnol**, v. 13, p. 881–891, 2003.

JEON, Y.H. et al. Effects of initial inoculation density of *Paenibacillus polymyxa* on colony formation and starch-hydrolytic activity in relation to root rot in ginseng. **J Appl Microbiol**, v. 109, p. 461–470, 2010.

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, n. 3, p. 524–534, 2007.

KAJIMURA, Y.; KANEDA, M. Fusaridicin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. **J Antibiot**, v. 49, p. 129–135, 1996.

KAJIMURA, Y.; KANEDA, M. Fusaridicins B, C, and D: new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8, isolation, structure elucidation and biological activity. **J Antibiot**, v. 50, p. 220–228, 1997.

KATZ, E.; DEMAIN, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriol Rev**, v. 41, p. 449–474, 1977.

KIM, J.F. et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. **J Bacteriol**, v. 192, n. 22, p. 6103-6104, 2010.

KIM, M-H et al. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5. **J Biotechnol**, v. 121, p. 54–61, 2006.

KNIGHT, K.L. Study/experimental/research design: much more than statistics. **J Athl Train**, v. 45, n. 1, p. 98–100, 2010.

KIRANA, G.S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Coll Surf B: Biointerf**, v. 73, p. 250–256, 2009.

KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agricultura. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. **Microbiol endophytes**. New York: Marcel Dekker Inc, 2000. p. 199-233.

KUNAMNENI, A.; KUMAR, K.S.; SINGH, S. Response surface methodology approach to optimize the nutritional parameters for enhance α -amylase. **Afr J Biotechnol**, v. 4, p. 708–716, 2005.

KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive bio-control agent. **J Gen Plant Pathol**, v. 68, p. 249–252, 2002.

KURUSU, K.; OHBA, K. New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F07 and F08, produced by *Bacillus polymyxa*: isolation and characterization. **J Antibiotics**, v. 40, p. 1506–1514, 1987.

LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian J Microbiol**, v. 49, p. 2-10, 2009.

LAM, K.S.; MATTEI, J.; FORENZA, S. Carbon catabolite regulation of rebeccamycin production in *Saccharothrix aerocolonigenes*. **J Ind Microbiol and Biotech**, v. 4, p. 105–108, 1989.

LEE, B. et al. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elucidation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, e48744, 2012.

LINDBERG, T.; GRANHALL, U.; TOMENIUS, K. Infectivity and acetylene reduction of diazotrophic rhizosphere bacteria in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under gnotobiotic conditions. **Biol Fertil Soils**, v. 1, p. 123–129, 1985.

LIU, C. et al. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **J Biotechnol**, v. 93, p. 27–34, 2001.

LORENTZ, R. H. **Seleção de isolados de *Paenibacillus* spp com atividade enzimática e antimicrobiana**. 2005 103p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LU, F. et al. Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. **Curr Microbiol**, v. 54, n. 6, p. 435-439, 2007.

MAITAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum*.** 1998. 122 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiás 1999.

McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotic structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiol**, v. 25, p. 285-308, 2001.

MAVINGUI, P.; HEULIN, T. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. **Soil Biol Biochem**, v. 26, p. 801–803, 1994.

MOTA, F.F.; GOMES, E.A.; SELDIN, L. Auxin production and detection of the gene coding for the Auxin Efflux Carrier (AEC) protein in *Paenibacillus polymyxa*. **J Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 257-264, 2008.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Proc Biochem**, v. 43, p. 540–546, 2008.

NAKAJIMA, N.; CHIHARA, S.; KOYAMA, Y. A new antibiotic, gatavalin: isolation and characterization. **J Antibiot**, v. 25, p. 243–247, 1972.

NIELSEN, P.; SORENSEN, J. Multi-target and mediumindependent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 22, p. 183–192, 1997.

OLIVEIRA, J.H.H.L. et al. Isolamento da cefamicina C e de novos metabólitos oriundos de caldos de *Streptomyces clavuligerus* e de novas linhagens de *Streptomyces*. In SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO FAPESP (Proc. 05/55079-4), 1, 2007, São Carlos. **Anais de Resumos Estendidos**. São Carlos, UFSCar, 2007. p. 25.

OLIVEIRA, M.F. et al. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Res Microbiol**, v. 161, n. 7, p. 565-572, 2010.

PICHARD, B.; LARUE, J.P.; THOUVENOT, D. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 133, p. 215–218, 1995.

PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Lett Appl Microbiol**, v. 27, p. 9-13, 1998.

PULLEN, C. et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of celastraceae. **Planta**, v. 216, p. 162–167, 2002.

RANGEL, T.F.L.V.B et al. Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. **Appl Geography**, v. 27, p. 12-24, 2007.

RATTI, R.P. **Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces tubercidicus***, endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado de São Carlos – SP. 2009. 113f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

RATTI, R.P. et al. Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian tropical savannah plants against *Staphylococcus* coagulase-positive strain. **J Venom Anim Tox incl. Trop Dis**, v. 14, n. 2, p. 294-302, 2008.

RAVI, A.V. et al. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Lett Appl Microbiol**, 45: 219–223, 2007.

RAZA, W.; HONGSHENG, W.; QIRONG, S. Use of response surface methodology to evaluate the effect of metal ions (Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) on production of antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa*. **Biores Technol**, v. 101, p. 1904–1912, 2010.

RODRIGUES, L.R. et al (2006, b) Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus termophilus* A. **Coll Surf B: Biointerfaces**, v. 53, p. 105–112, 2006 (b).

ROSADO, A.S.; SELDIN, L. Production of a potentially novel antimicrobial substance by *Bacillus polymyxa*. **World J Microbiol Biotech**, v. 90, p. 521-558, 1993.

RYU, C.M. et al. Nature of a root-associated *Paenibacillus polymyxa* from field-grown winter barley in Korea. **J Microbiol Biotechnol**, v. 15, p. 984–991, 2005.

SELDIN, L. et al. Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic microorganisms. **Lett Appl Microbiol**, v. 28, p. 423 – 427, 1999.

SANO, E.E. et al. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environ. Monit Assess**, v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.

SANTOS, J.C. et al. Variables that affect the xylitol production in a zeolite fluidized bed reactor from sugarcane bagasse hydrolysate. **Biotech Progress**, v. 21, p. 1639–1643, 2005.

SANZ-APARICIO, J., et al. Structural basis of increased resistance to thermal denaturation induced by single amino acid substitution in the sequence of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*. **Proteins: Struct Funct Genet**, v. 33, p. 567–576, 1998.

SANZ-APARICIO, J., et al. Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. **J Mol Biol**, v. 275, p. 491–502, 1998.

SATYANARAYANA, T. Microbial diversity. **Curr Sci**, v. 89, p. 926–928, 2005.

SCHUTZ, B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. In: Symposium on Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation, 2001, Swansea. International Symposium Proceedings, University of Wales, Swansea. 2001. p. 328.

SERRANO, N.F.G. et al. Optimal glucose and inoculum concentrations for production of bioactive molecules by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. **Chem Papers**, v. 66, n. 12, p. 1111–1117, 2012.

SHEN, J. et al. Media optimization for the novel antimicrobial peptide by *Bacillus* sp. fmbJ224. **Chin J Biotech**, v. 21, p. 609–614, 2005.

SINGH, H.P.; SINGH, T.A. The interaction of rockphosphate, *Bradyrhizobium*, vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilizing microbes on soybean grown in a sub-Himalayan mollisol. **Mycorrhiza**, v. 4, p. 37–43, 1993.

SOGN, J.A. Structure of the peptide antibiotic polypeptin. **J Medicin Chem**, v. 19, p. 1228–1231, 1976.

STERN, N.J. et al. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. **J Food Prot**, v. 68, p. 1450-1453, 2005.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive compounds. **Microbes Infect**, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 4, p. 491 – 502, 2003.

STROBEL, G.A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **J Nat Products**, v. 67, p. 257–268, 2004.

STROBEL, G.A. et al. Cryptocadin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiol**, v. 17, p. 417-423, 1999.

SUPAPHON, P. et al. Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrass species: *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*. **PLoS One**, v. 16, n. 8, e72520, 2013.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat Prod Rep**, v. 18, p. 448-459, 2001

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E.G.H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n.11, p. 7292-7300, 2005.

TIMMUSK, S.; WAGNER, E.G.H. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 12, n. 11, p. 951-959, 1999.

TIMMUSK, S. et al. Antagonistic effects of *Paenibacillus polymyxa* towards the oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Pythium aphanidermatum*. In **Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium Paenibacillus polymyxa**. Uppsala, Sweden: Uppsala University, p. 1–28.

TUPINAMBA, G. et al. Antimicrobial activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against some mycotoxin-producing fungi. **J Appl Microbiol**, v. 105, n. 4, 1044-1053, 2008.

WANG, X. et al. Optimization of the fermentation process of *Actinomyces* strain Hhs.015T. **J Biomed Biotechnol**, p. 141876, 2010.

WANG, Z-W.; LIU, X-L. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology. **Bioresource Technol**, v. 99, p. 8245–8251, 2008.

VAN LOON, L.C. Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria. **Eur J Plant Pathol**, v. 119, p. 243–254, 2007.

VON DER WEID, I. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. **Res Microbiol**, v. 151, n. 5, p. 369-381, 2000.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat Prod Rep**, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZUBILLAGA, R.A. et al. (2006) Effect of a new ionic pair on the unfolding activation barrier of β -glucosidase B. **Prot Pept Lett**, v. 13, p. 113–118, 2006.

Capítulo 2

**Purificação e caracterização de metabólitos antimicrobianos
secretados por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D**

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	58
LISTA DE TABELAS	60
LISTA DE FIGURAS	61
RESUMO	66
1. Introdução	68
1.1 Purificação e caracterização de compostos	68
1.1.1 Etapas pré-cromatográficas	70
1.1.1.1 Precipitação com sulfato de amônio	70
1.1.1.2 Diálise	70
1.1.1.3 Filtração em membranas com MWCO	71
1.1.1.4 Extração líquido-líquido	72
1.1.2 Princípios em cromatografia	74
1.1.3 Técnicas cromatográficas	76
1.1.3.1 Cromatografia planar	76
1.1.3.1.1 Cromatografia em papel (CP)	76
1.1.3.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	76
1.1.3.2 Cromatografia em coluna	77
1.1.3.2.1 Cromatografia gasos (CG)	77
1.1.3.2.2 Cromatografia líquida (CL)	77
1.1.3.2.2.1 Cromatografia de troca iônica (CTI)	78
1.1.3.2.2.2 Cromatografia de exclusão molecular (CEM)	78
1.1.3.2.2.3 Cromatografia de interação hidrofóbica (CIH)	80
1.1.3.2.2.4 Cromatografia de afinidade (CA)	80
1.1.4 Espectrometria de massas paracaracterização e identificação de biomoléculas	82
1.1.4.1 Técnicas de ionização	82
1.1.4.1.1 Ionização por spray de elétrons (ESI)	82
1.1.4.1.2 Ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI)	83

1.1.4.2 Analisadores	84
1.1.4.2.1 Espectrômetro de massas quadrupolo	84
1.1.4.2.2 Espectrômetro de massas íon-trap	84
1.1.4.2.3 Espectrômetro de massas time-of-flight (TOF)	85
1.1.4.3 Espectrometria de massas tandem	85
1.1.4.4 Espectrometria de massas MALDI-TOF	86
1.2 Resistência a antimicrobianos versus pesquisa & desenvolvimento de novas drogas	88
1.3 Peptídeos antimicrobianos (PAM)	91
1.3.1 Características e classificação	91
1.3.2 Mecanismos de ação	92
1.3.3 Lipopeptídeos antimicrobianos	95
1.3.4 Lantibióticos	97
1.3.5 Potencial terapêutico de PAMs	97
Parte I: Purificação e caracterização do lipopeptídeo polycerradin	100
2 Experimental	100
2.1 Estimativa da massa molecular dos compostos bioativos	100
2.2 Estabilidade bioquímica do extrato fermentado por <i>P. polymyxa</i> RNC-D	100
2.3 Obtenção do extrato lipopeptídico	101
2.4 Avaliação dos espectros antimicrobianos do ELP, ET e FA	102
2.5 Cromatografia de camada delgada	103
2.6 Filtração em membranas com MWCO	103
2.7 Cromatografia de fase reversa	104
2.8 Análise por espectrometria de massas	104
3 Resultados e discussão	106
3.1 Massa molecular estimada e natureza química dos compostos bioativos	106
3.2 ELP: etapa de partição e espectro de bioatividade	111
3.3 Purificação dos compostos presentes no ELP	116
3.4 Análise do lipopeptídeo polycerradin	120
4 Conclusões	125

Parte II: Purificação e caracterização do PAM PpRNCD	126
2. Experimental	126
2.1 Fracionamento da FA	126
2.2 LC-MS dos compostos fracionados por cromatografia de troca iônica	126
2.3 Espectro de bioatividade do(s) composto(s) presente(s) na fração TI-1	127
2.4 Purificação dos metabólitos presentes na fração TI-1	128
2.5 Sequenciamento da substância presente no pico TI-1/FR-1	128
2.6 Análise por MS/MS	129
3. Resultados e discussão	131
3.1 FA: perfil cromatográfico e identificação de seus compostos bioativos	131
3.2 Fração TI-1: espectro de atividade e purificação das substâncias bioativas	133
3.3 Determinação da sequência de aminoácidos do PAM PpRNCD	136
3.4 Confirmação da estrutura primária por MS/MS	139
4. Conclusões	141
Parte III: Purificação e caracterização de PAMs do grupo LI-F	142
2. Experimental	142
2.1 Cromatografia de troca iônica.....	142
2.2 Cromatografia de exclusão molecular.....	142
2.3 Cromatografia de fase reversa.....	143
2.4 Análise por espectrometria de massas.....	143
2.5 Determinação estrutural dos PAMs.....	144
3. Resultados e discussão	145
3.1 Purificação bioguiada das substâncias antimicrobianas	145
4. Conclusões	158
6. Referências	159

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção de Culturas Padrão Americana)

TSB: *tryptic soy broth* (caldo de soja tríptica)

TRIS: Tampão tris-hidroximetil-aminometano, cuja fórmula é $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

P. polymyxa: *Paenibacillus polymyxa*

E. coli: *Escherichia coli*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*

S. sonnei: *Shigella sonnei*

C. albicans: *Candida albicans*

MH: Mueller-Hinton (ágar e caldo)

MWCO: *molecular weight cut-off* (massa molecular de corte)

rpm: rotações por minuto

ET: extrato total

FA: fração aquosa

ELP: extrato lipopeptídico

DMSO: dimetil sulfoxido

CIM: concentração inibitória mínima

PAM: peptídeo antimicrobiano

UA/ml: unidades arbitrárias por ml

UV: ultravioleta

DAD-*Diode Array Detector* (detector de arranjo de diodos)

CG: cromatografia gasosa

FID: *flame ionization detector* (detector de ionização em chama)

TR: tempo de retenção

CP: cromatografia em papel

CCD: cromatografia em camada delgada

CEM: cromatografia de exclusão molecular

CIT: cromatografia de troca iônica

CIH: cromatografia de interação hidrofóbica

CA: cromatografia de afinidade

His: histidina

LPS: lipopolissacarídeos

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Drogas/Medicamentos)

TATFAR: *Transatlantic Task Force on Antimicrobial Resistance* (Força Tarefa Transatlântica em Resistência Antimicrobiana)

HPLC: *High Liquid Performance Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE)

LC: *Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida - CL)

MS: *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas - EM)

ESI: *Electrospray ionization* (ionização por *spray* de elétrons)

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (Ionização/Desorção a Laser Assitida por Matriz – Tempo de Vôo)

HCCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico)

MS/MS: *mass spectrometry/mass pectrometry* (espectrometria de massas, seguida de outra espectrometria de massas, para fragmentação de moléculas).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D após aplicação de tratamentos enzimáticos e filtração.

Tabela 2. Espectro antimicrobiano do ET e ELP (pH 3.0, pH 6.0 e pH 9.0) produzidos por *P. polymyxa* RNC-D.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas gerais para a purificação de bioprodutos..... 69
- Figura 2.** Exemplos de tratamentos utilizados em etapas pré-cromatográficas..... 69
- Figura 3.** Esquema representando o princípio de funcionamento da diálise (http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html - adaptado)..... 71
- Figura 4.** Esquema representando as etapas utilizadas na ultrafiltração em dispositivo contendo membrana com 10 kDa MWCO. 72
- Figura 5.** Extração líquido-líquido de caldo fermentado por actinomiceto endofítico TR-1 (BOARINI et al., 2013)..... 73
- Figura 6.** Exemplos de tipos de cromatografias..... 75
- Figura 7.** Representação esquemática do princípio da CEM;(●) moléculas maiores que o poro da matriz; (●) moléculas menores que o poro da matriz (Pessoa-Jr & Kilikian, 2005).. 79
- Figura 8.** Representação esquemática de uma separação de analitos por CEM (CSEKE et al., 2004-adaptado)..... 79
- Figura 9.** Esquema das etapas de cromatografia de imunoafinidade. I e II: entrada de amostra; III: lavagem; IV: eluição (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005)..... 81
- Figura 10.** Esquema do modo de ionização por *spray* de elétrons (CANTU et al., 2008)..... 83
- Figura 11.** Esquema do modo de ionização por MALDI (CANTU et al., 2008)..... 84
- Figura 12.** Ilustração dos fragmentos formados (pares a/x, b/y, c/z) através da clivagem de ligações ao longo do esqueleto da cadeia peptídica linear (<http://www.abrf.org/ABRFNews/1997/June1997/jun97lennon.html>)..... 87
- Figura 13.** Correlação entre a porcentagem de cepas resistentes a antibióticos com o número de companhias que pesquisam novos antibióticos, desde 1980 a 2011 (COOPER; SHALES, 2011)..... 89
- Figura 14.** Modelos representando as diferenças estruturais nas quatro classes de peptídeos antimicrobianos. PAMs podem ser agrupados em quatro classes de acordo com suas estruturas secundárias, incluindo (A) peptídeos α -hélice, (B) peptídeos compostos por uma série de folhas- β , (C) peptídeos que possuem estruturas não convencionais, tais como hélices estendidas e (D) peptídeos com estrutura em *loop*. As estruturas foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>) e foram referenciadas de acordo com o Identificador de Objeto Digital (DOI) (BERMAN et al, 2000; PETERS et al., 2010)..... 92

- Figura 15.** Mecanismos de ação propostos para atuação de PAMs em células microbianas. (A) Rompimento da integridade da membrana celular: (1) inserção randômica na membrana, (2) alinhamento das sequencias hidrofóbicas, e (3) remoção de seções da membrana e formação de poros. (B) Inibição da síntese de DNA. (C) Bloqueio da síntese de RNA. (D) Inibição das enzimas necessárias para ligação de proteínas estruturais da parede celular. (E) Inibição da função ribossomal e síntese de proteínas. (F) Bloqueio de proteínas chaperonas atuantes no enovelamento de proteínas. (G) Atuação na mitocôndria: (1) inibição da respiração celular e indução de formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) e (2) rompimento da integridade da membrana celular e efluxo de ATP e NADH (PETERS et al., 2010)..... 93
- Figura 16.** Estrutura molecular de *paenibacterin*; lipopeptídeo cíclico produzido por *P.thiaminolyticus* OSY-SE. R = CH₃(CH₂)₁₃ (cadeia normal), CH₃CH(CH₃)(CH₂)₁₁ (cadeia iso), ou CH₃CH₂CH(CH₃)(CH₂)₁₀ (cadeia anteiso) (GUO et al., 2012)..... 96
- Figura 17.** Esquema representativo do potencial terapêutico dos PAMs..... 98
- Figura 18.** Esquema representativo do preparo dos ELPs..... 102
- Figura 19.** Representação esquemática da sequencia utilizada para purificação e caracterização do lipopetídeo biologicamente ativo produzido por *P. polymyxa* RNC-D.... 105
- Figura 20.** Estimativa da massa molecular dos compostos bioativos contra *E. coli* ATCC 25923. (A) ET (controle positivo); (B) ET > 10 kDa; (C) ET < 10 kDa; (D) ET > 3 kDa; (E) ET < 3 kDa; (F) ET > 1 kDa; (G) ET < 1 kDa..... 106
- Figura 21.** Estimativa da massa molecular dos compostos com atividade contra *S. aureus* ATCC 25922. (A) ET (controle positivo); (B) ET > 10 kDa; (C) ET < 10 kDa; (D) ET > 3 kDa; (E) ET < 3 kDa..... 21
- Figura 22.** Redução na atividade antimicrobiana residual de diferentes ETs contra *S. aureus* após tratamento enzimático com lipase (L). Halos de inibição (em sentido horário, iniciando na parte inferior): ET(x) – 12 mm, ET(x)+L – 7 mm, ET(6) – 10 mm, ET(6)+L – 5 mm; ET(14) - 19 mm, ET(14)+L – 16 mm..... 108
- Figura 23.** Redução na atividade antimicrobiana residual de diferentes ETs contra *E. coli* após tratamento enzimático com lipase. Halos de inibição (em sentido horário, iniciando na parte inferior): ET(x) – 15 mm, ET(x)+L – 13 mm, ET(6) – 17 mm, ET(6)+L – 16 mm; ET(14) - 13 mm, ET(14)+L – 12 mm..... 109
- Figura 24.** Sistema de duas fases utilizado para obtenção do ELP a partir do ET..... 111
- Figura 25.** Atividade antimicrobiana do ET (poço inferior a direita), FA (poço superior)e ELP (*spot* a esquerda) em pH 3.0 (I), 6.0 (II) e 9.0 (III) contra *S. aureus*..... 112
- Figura 26.** Atividade antimicrobiana do ET (poço inferior a direita), FA (poço superior)e ELP (*spot* a esquerda) em pH 3.0 (I), 6.0 (II) e 9.0 (III) contra *E. coli*..... 112

- Figura 27.** Em I: placa de CCD mostrando *spots* de ET pH 6.0 (A), ELP pH 3.0 (B), ELP pH 9.0 (C) e ELP pH 6.0 (D) corados com reagente de Bial (após desenvolvimento das placas). Em II: placa de CCD mostrando as bandas presentes em ET pH 6.0 (A), ELP pH 3.0 (B), ELP pH 9.0 (C) e ELP pH 6.0 (D) visualizada sob luz UV..... 115
- Figura 28.** Atividade antimicrobiana do ELP (*spots* P), ELP ≥ 10 kDa (*spots* P >10 kDa) e ELP < 10 kDa (*spots* P <10 kDa) contra *S. aureus*..... 116
- Figura 29.** Cromatograma de 10 kDa $>$ ELP $>$ 3 kDa (cromatografia de fase reversa) com detecção a λ 254 nm..... 117
- Figura 30.** Espectro UV da FRP1 (DAD 200 – 600 nm)..... 117
- Figura 31.** Espectro UV da FRP2 (DAD 200 – 600 nm)..... 118
- Figura 32.** Espectro UV da FRP3 (DAD 200 – 600 nm)..... 118
- Figura 33.** Espectro UV da FRP4 (DAD 200 – 600 nm)..... 119
- Figura 34.** Comparação entre os espectros de absorbância UV de FRP1 (I), FRP2 (II), FRP3 (III), FRP4 (IV)..... 119
- Figura 35.** Espectros de massas *full scan* do ELP, HCCA (matriz), FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4 (m/z 900 – 4500)..... 120
- Figura 36.** Espectros de massas *full scan* do ELP, HCCA (matriz), FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4 com *zoom* na região entre m/z 1000 – 1900..... 121
- Figura 37.** Espectros de massas *full scan* do ELP, HCCA (matriz), FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4 com *zoom* na região entre m/z 3000 – 3800..... 121
- Figura 38.** Espectro de massas do ELP com *zoom* na região de massas entre m/z 3375 – 3386. A fórmula $C_{182}H_{321}N_{29}O_{29}$ corresponde a simulação para o íon com m/z 3376,459 feita com o SmartFormula no software Flex Analysis..... 122
- Figura 39.** Representação esquemática da sequência utilizada para purificação e caracterização do peptídeo biologicamente ativo produzido por *P. polymyxa* RNC-D..... 130
- Figura 40.** Teste de difusão em ágar demonstrando a bioatividade do ET (*spot* inferior à direita) e da FA (*spot* superior) contra *E. coli*.....131
- Figura41.** Cromatograma da FA após submissão à cromatografia de troca iônica..... 132
- Figura 42.** Desalinização da fração TI-1 monitorado em λ 280 nm..... 134
- Figura 43.** Cromatograma de 100 μ l de água (“branco”) obtido por cromatografia de fase reversa..... 134
- Figura 44.** Cromatograma da fração TI-1 desalinizada (λ 214 nm)..... 135

Figura 45. Cromatograma e espectro UV tridimensionais da fração TI-1 (DAD 200 – 280 nm).....	135
Figura 46. Sequenciamento N-terminal da molécula contida em TI-1/FR-1. Cromatograma 1: branco; cromatograma 2: aminoácidos padrões; cromatograma 3: resíduo 1 (Gly); cromatograma 4: resíduo 2 (Glu); cromatograma 5: resíduo 3 (Hyp), cromatograma 6: resíduo 4 (Gly), cromatograma 7: resíduo 5 (Ala ou Pro).	136
Figura 47. Espectro de fragmentação MS/MS do íon <i>m/z</i> 464.....	140
Figura 48. Representação esquemática da sequencia utilizada para purificação e caracterização dos PAM PpRNCD.	140
Figura 49. Perfil de fracionamento da FA obtido por cromatografia de troca iônica.....	145
Figura 50. <i>Spot test</i> das frações TIF2,T IF3, TIF14 a 28 e o controle positivo FA (+) contra <i>E. coli</i>	146
Figura 51. Espectro de absorbância UV de TIF2 (DAD 200 – 800 nm).....	146
Figura 52. Perfil de separação de TIF2 obtido por cromatografia de exclusão molecular...	147
Figura 53. Cromatograma de EMB2 adquirido por cromatografia de fase reversa.....	148
Figura 54. Espectro de absorbância UV do pico FA-FRP1 (DAD 200 – 500 nm).....	148
Figura 55. Espectro de absorbância UV do pico FA-FRP2 (DAD 200 – 500 nm).....	149
Figura 56. Espectro de absorbância UV do pico FA-FRP3 (DAD 200 – 500 nm).....	149
Figura 57. Espectro de absorbância UV do pico FA-FRP4 (DAD 200 – 500 nm).....	150
Figura 58. Comparação entre os espectros de absorbância UV dos picos FA-FRP1, FA-FRP2, FA-FRP3 e FA-FRP4.....	150
Figura 59. Espectro de massas <i>full scan</i> de FA-FRP3 (<i>m/z</i> 700 – 1700).....	151
Figura 60. Espectro de massas <i>full scan</i> de FA-FRP3 com <i>zoom</i> na região entre <i>m/z</i> 880 – 960.....	152
Figura 61. Espectro de fragmentação MS/MS do íon <i>m/z</i> 901,554.....	153
Figura 62. Espectro de fragmentação MS/MS íon <i>m/z</i> 915,519.....	153
Figura 63. Espectro de massas <i>full scan</i> de FA-FRP4 com <i>zoom</i> na região entre <i>m/z</i> 840 – 1040.....	154
Figura 64. Comparação dos espectros de massas <i>full scan</i> de FA-FRP3 (acima) com FRP4 (abaixo).....	154
Figura 65. Espectro de fragmentação MS/MS íon <i>m/z</i> 979,607.....	155

Figura 66. Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 987,569..... 156

Figura 67. Representação esquemática da sequencia utilizada para purificação e
caracterização dos PAMs LI-F04a/b e LI-F03a/b..... 157

Resumo

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas com amplo espectro de atividade que vêm sendo estudadas para uso como potenciais agentes antibacterianos e antifúngicos. O extrato total, proveniente do caldo de fermentação de *P. polymyxa* RNC-D, foi utilizado para pesquisa e isolamento de novos compostos antimicrobianos. Através de ensaios enzimáticos feitos com ET foi possível verificar a natureza lipopeptídica e peptídica dos compostos antimicrobianos. O extrato lipopeptídico (ELP), extraído do ET pelo sistema de duas fases, apresentou amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo avaliados. A submissão do ELP à cromatografia de fase reversa resultou na separação dos compostos em quatro picos nomeados FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4. O resultado do bioensaio demonstrou que FRP4 inibiu *E. coli* e *S. aureus*. As bandas eluídas por cromatografia de fase reversa, bem como ELP, foram então analisadas por EM. A aplicação desta técnica revelou a presença de um íon com m/z 3376,459 Da, cuja fórmula molecular proposta foi $C_{182}H_{321}N_{29}O_{29}$. Este estudo relata pela primeira vez este composto, um lipopeptídeo que foi denominado polycerradin, cujo espectro de atividade biológica abrange bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo.

A purificação de novo PAM produzido por *P. polymyxa* RNC-D envolveu uma partição orgânica seguida por 3 etapas cromatográficas, as quais incluíram cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular (desalting) e cromatografia de fase reversa. A bioatividade do composto foi avaliada e confirmada frente às bactérias Gram-negativas *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*. O composto não foi ativo contra a cepa de *Proteus mirabilis* avaliada.

A análise do N-terminal determinou a sequência do PAM PpRNCD como glicina - ácido glutâmico - hidroxiprolina - glicina - alanina. A confirmação da estrutura primária deste novo composto foi feita por MS/MS. O presente estudo relata pela primeira vez a produção do PAM PpRNCD que possui o aminoácido não usual hidroxiprolina em sua constituição. Considerando-se a espécie bacteriana *P. polymyxa*, a presença do aminoácido hidroxiprolina, o qual confere maior estabilidade às moléculas em que está presente, foi detectada primeiramente no peptídeo aqui descrito. Em termos de tamanho de molécula,

pode-se considerar que o PAM PpRNCD (massa molecular 463 Da), que contém apenas 5 resíduos de aminoácidos, é um dos menores peptídeos naturais ativos relatados.

As moléculas contidas na fração aquosa (FA) foram purificadas de modo bioguiado através de etapas cromatográficas sequenciais, que incluíram cromatografia de troca iônica, exclusão molecular e fase reversa. A fração EMB2, separada por cromatografia de exclusão molecular, demonstrou bioatividade contra *E. coli* e *S. aureus*. Os picos FA-FRP3 e FA-FRP4, provenientes de EMB2 e resolvidos por cromatografia de fase reversa, são ativos contra *S. aureus*. Embora a fração EMB2 tenha demonstrado bioatividade contra *E. coli*, os picos não inibiram o microrganismo Gram-negativo possivelmente devido à baixa concentração de compostos.

FA-FRP3 e FA-FRP4 foram submetidos à análise por EM MALDI-TOF e MS/MS. O espectro de massas de FA-FRP3 apresentou um pico significativo em m/z 915,581, e outro pico em m/z 901,559. Através do perfil de fragmentação foi possível identificar tais compostos como sendo os peptídeos LI-F04a (m/z 883) e LI-F04b (m/z 897) linearizados.

Os pares de picos significativos em FA-FRP4 incluíram m/z 979,607 – 1001,591 (aduto de sódio), m/z 965,587 – 987,569 (aduto de sódio). Os íons com m/z 965,587 e m/z 979,607 correspondem aos peptídeos LI-F03a (m/z 947) e LI-F03b (m/z 961) linearizados; isto foi concluído pois o mesmo perfil de fragmentação foi obtido pelas análises de MS/MS. Este grupo de peptídeos, denominado LI-F, foi descrito por Kurusu & Ohba (1987) como sendo pertencentes a um grupo de depsipeptídeos que possuem uma cadeia lateral de ácido guanidino-3-hidroxipentadecanóico ligado a um grupo amino. Portanto, *P. polymyxa* RNC-D também foi capaz de produzir os compostos LI-F03a, LI-F03b, LI-F04a e LI-F04b.

Palavras-chave: lipopeptídeo polycerradin, peptídeo antimicrobiano PpRNCD, peptídeos LI-F, técnicas cromatográficas, sequenciamento do N-terminal, espectrometria de massas.

1. Introdução

1.1 Purificação de compostos

Produtos microbianos estão presentes em baixas concentrações em amostras naturais, nos caldos fermentativos ou mesmo no interior das células microbianas. Assim, o adequado estabelecimento das etapas de purificação de bioprodutos é determinante para uma produção economicamente viável, uma vez que as fases de purificação representam até 80% do custo final do produto (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

A purificação de produtos microbianos, tais como proteínas e peptídeos, é um processo complexo, pois as técnicas aplicadas e o tempo demandado podem ser críticos a despeito da preservação da atividade biológica. No mesmo sentido, determinados graus de pureza são necessários para estudos estruturais e ensaios de bioatividade.

A variedade de classes de biomoléculas - ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, peptídeos, proteínas, etc – é um fator que contribui para tornar esta etapa mais laboriosa. Além disso, as características do meio onde estão inseridas tais moléculas, tais como elevada proporção de água, fragmentos celulares, presença de outros metabólitos intra e extracelulares, dificultam o processo de separação e purificação.

A molécula de interesse pode ser um produto extracelular e, desta maneira, estar presente livre na amostra, no sobrenadante (ou meio de cultivo) ou ser um metabólito intracelular. Neste último caso, a molécula-alvo é liberada através de diferentes técnicas de rompimento celular. Em seguida, para ambos os produtos intra e extracelulares, o sobrenadante é então submetido a etapas pré-cromatográficas, que objetivam a separação e concentração da molécula de interesse. Depois desta(s) fase(s), cromatografias de baixa e/ou alta resoluções são aplicadas na purificação do biocomposto. A Figura 1 ilustra as etapas gerais que podem ser aplicadas para a purificação de bioprodutos.

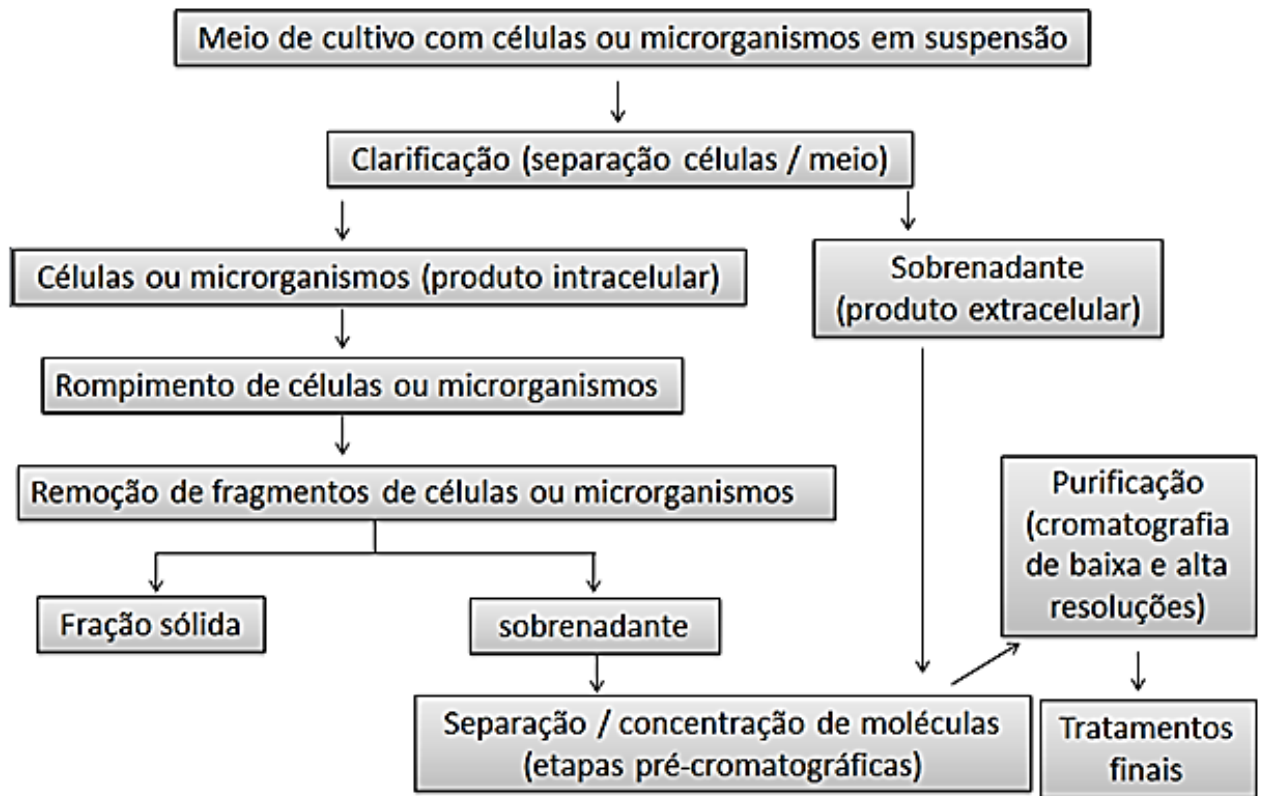


Figura 1. Etapas gerais para a purificação de bioprodutos.

Etapas pré-cromatográficas são importantes tratamentos aplicados a misturas complexas, tais como extrato total de plantas ou caldo fermentado, que removem componentes indesejados e concentram a(s) molécula(s) de interesse. Alguns exemplos destes tratamentos podem ser visualizados na Figura 2 e incluem diálise, precipitação com sais ou solventes, centrifugação diferencial, extração líquido-líquido, desnaturação de proteínas contaminantes por aquecimento (no caso de moléculas-alvo termoresistentes).

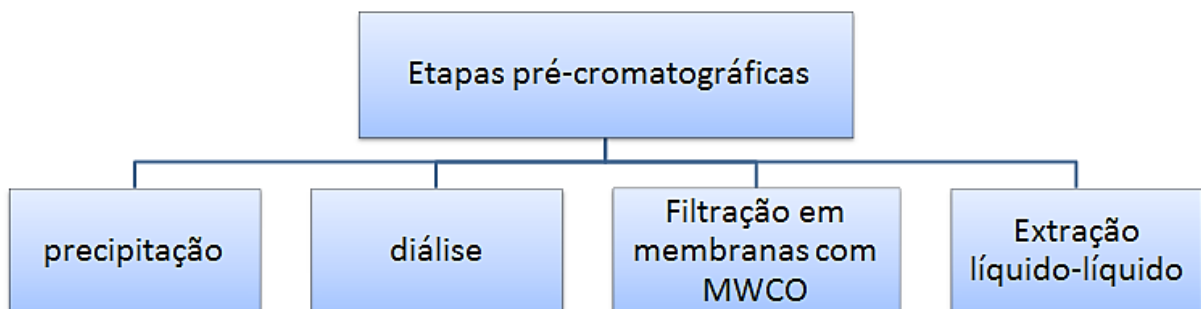


Figura 2. Exemplos de tratamentos utilizados em etapas pré-cromatográficas.

1.1.1 Etapas pré-cromatográficas

1.1.1.1 Precipitação com sulfato de amônio

Consiste na adição de sulfato de amônio na solução da amostra, o qual geralmente é expresso em % de saturação da solução à qual o sal é adicionado. O processo deve ser reversível a ponto de preservar a atividade biológica da molécula-alvo, ou seja, a concentração de sal utilizada precisa ser compatível com a biomolécula. Esta etapa geralmente é aplicada para agregar proteínas, tornando-as insolúveis, as quais sedimentam sob baixo valor de força centrífuga. As moléculas de água mobilizam-se para a solvatação dos ions do sal, reduzindo a camada de solvatação das proteínas; então, os resíduos hidrofóbicos proteicos se agregam resultando na precipitação. Ao final do processo, a amostra conterá quantidades significativas de sulfato de amônio e poderá ser usada para cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de exclusão molecular ou submetida à diálise (para posterior etapa de cromatografia de troca iônica, por exemplo).

1.1.1.2 Diálise

Na diálise há passagem de solutos através de uma membrana semipermeável que é constituída por poros com diâmetros específicos (por exemplo, 30 kDa, 50 kDa, 10 kDa). O tamanho dos poros caracteriza a massa molecular de corte (MWCO) da membrana. Moléculas menores que o tamanho dos poros passam através da membrana, sendo exemplos delas água, sais, peptídeos e proteínas. As espécies de maior porte ficam retidas.

A força motriz é a diferença de concentração entre a solução presente no interior da membrana e a solução externa. A Figura 3 representa um esquema do princípio de funcionamento da diálise.

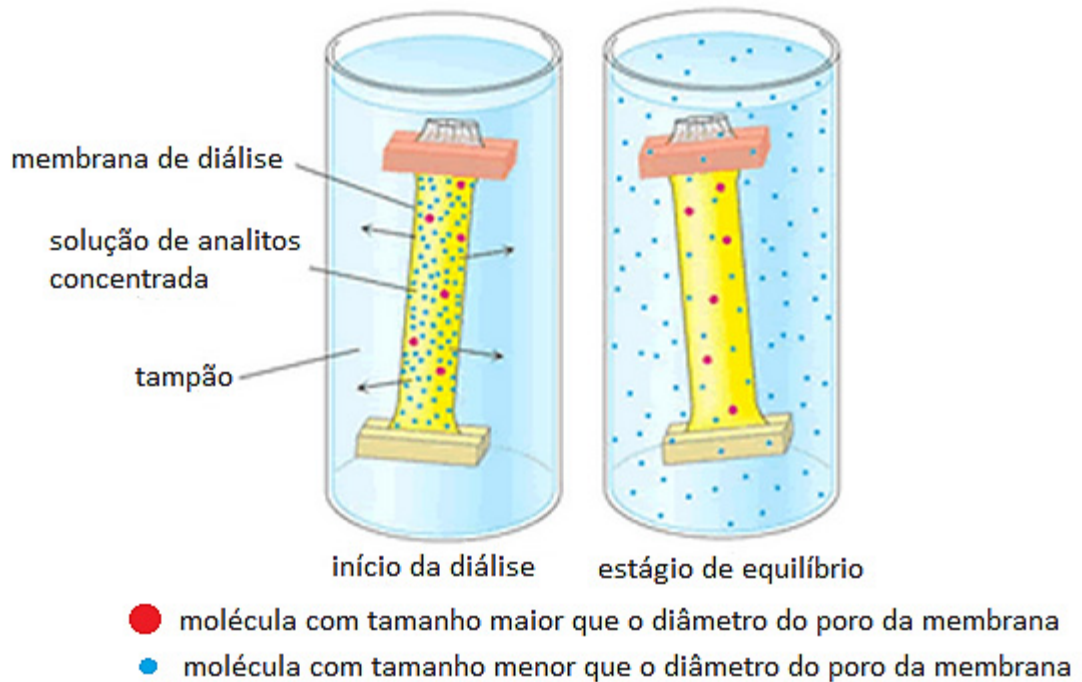


Figura 3. Esquema representando o princípio de funcionamento da diálise (http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html - adaptado)

A diálise geralmente é utilizada para dessalinização de amostras, troca de tampão em solução de proteínas ou outras macromoléculas, remoção de substâncias de massa molecular (menor que o MWCO da membrana de diálise) a partir de uma mistura de biomoléculas de elevada massa molecular.

1.1.1.3 Filtração em membranas com MWCO

Caracteriza-se por ser uma técnica simples na qual se utilizam dispositivos de filtração compostos por membranas com tamanho de poro determinado, o qual se refere à massa molecular de corte (MWCO). Este tipo de filtração permite concentrar a molécula de interesse, ao mesmo tempo em que remove substâncias com massas moleculares menores que o MWCO da membrana utilizada.

A amostra de interesse é inserida no interior do dispositivo, o qual é submetido a centrifugação. Durante a centrifugação, as substâncias com massas moleculares menores que o MWCO da membrana são eluídas e ficam retidas na porção inferior do dispositivo. A substância de interesse, cujo valor de massa molecular deve ser maior que o MWCO da

membrana, fica retida na porção superior do dispositivo. Após remoção do volume eluído, a porção superior do dispositivo é invertida e novamente centrifugada. Ao final desta etapa é possível recuperar a molécula de interesse, a qual estará mais concentrada quando comparada à amostra inicial (Figura 4).

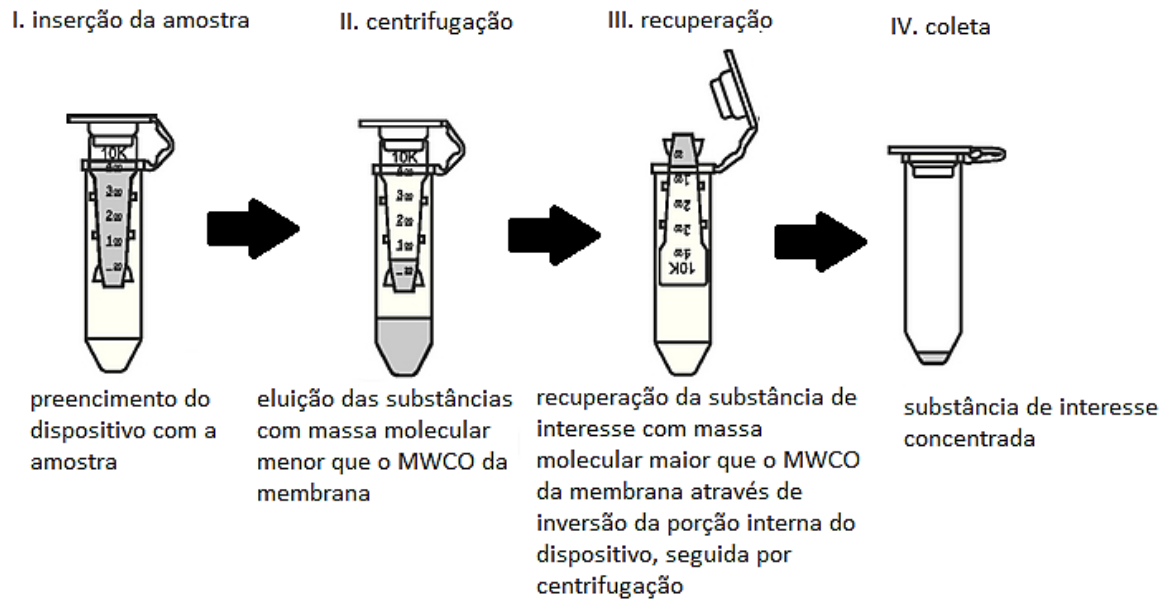


Figura 4. Esquema representando as etapas utilizadas na ultrafiltração em dispositivo contendo membrana com 10 kDa MWCO.

1.1.1.4 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido se baseia na transferência de um ou mais solutos de uma fase líquida para outra fase de acordo com a sua solubilidade. Na prática, normalmente uma das fases é a água ou uma solução aquosa e a outra um solvente orgânico que é imiscível com a água, formando um sistema de duas fases líquidas (Figura 5). Há ainda a possibilidade de formação de interface quando há moléculas anfipáticas na mistura.

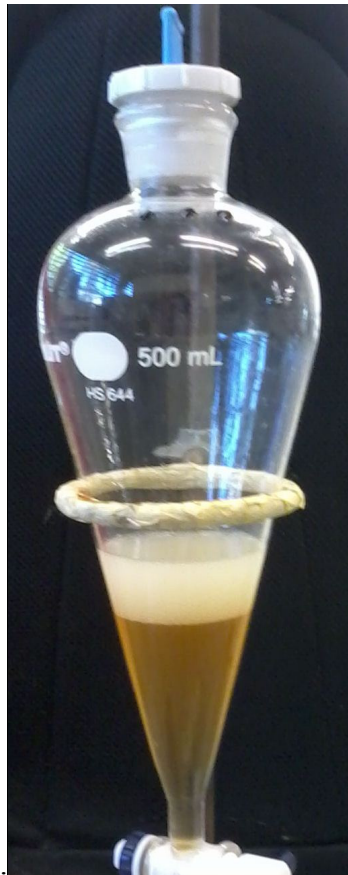


Figura 5. Extração líquido-líquido de caldo fermentado por actinomiceto endofítico TR-1 (BOARINI *et al.*, 2013).

O termo *partição* é comumente usado para se referir ao processo físico-químico envolvido na extração líquido-líquido. Outro sinônimo utilizado é extração por solvente, que indica que a substância a ser purificada, a partir de uma mistura, preferencialmente solubiliza-se em determinado solvente.

A partição diferenciada da molécula-alvo culmina em aumento do seu grau de pureza. Assim, essa técnica pode ser usada para separar seletivamente uma substância de uma mistura complexa (caldos fermentados, extratos vegetais) ou para remover impurezas de uma solução. A extração se torna uma ferramenta útil na separação de compostos orgânicos se forem escolhidos os solventes de extração adequados, sendo bastante empregada na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos.

1.1.2 Princípios em cromatografia

Historicamente, a cromatografia teve início no século XX e foi primeiramente utilizada na separação de pigmentos vegetais (*Chroma* significa cor e *graphie* escrever).

Cromatografia é um método físico-químico de separação que envolve o uso de duas fases: uma móvel e uma estacionária. A fase móvel, que pode ser constituída por um líquido (ou mistura) ou gás, percorre a fase estacionária (leito de material poroso – sílica, polímeros sintéticos, polímeros orgânicos), removendo gradualmente os solutos por migração diferencial. Uma mistura de componentes (chamados analitos) é inserida na fase estacionária seja pela aplicação direta na fase estacionária ou indiretamente através do uso da fase móvel. De acordo com as interações intermoleculares estabelecidas entre analitos-fase estacionária-fase móvel, resulta o processo de adsorção (separação sólido-líquido) ou de partição (separação líquido-líquido).

Moléculas podem ser purificadas de acordo com seu tamanho, carga, afinidade de ligação ou uma mistura destes mecanismos (Deutcher, 1990). A taxa de migração diferencial dos analitos é resultante destas interações. Se um soluto é adsorvido fracamente na superfície da fase estacionária, ele será eluído primeiramente do que outro soluto que adsorveu mais fortemente. Desta maneira, haverá separação entre os compostos de uma mistura se houver diferenças na adsorção na fase sólida.

O aumento de resolutividade e, portanto, da eficiência da técnica cromatográfica, pode ser obtido com o uso de fase estacionária com reduzido tamanho de partículas. Isto decorre devido ao aumento substancial na superfície de interação da fase estacionária. Materiais contendo este tipo de partículas foram produzidos por volta de 1960, quando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) obteve maior avanço (Lindsay, 1992). O diâmetro das partículas diminuiu progressivamente, sendo que atualmente as micropartículas possuem 10, 5, 4 ou 3 μm . As partículas, geralmente constituídas de sílica, são recobertas com diferentes grupamentos químicos. O processo de empacotamento das micropartículas em colunas resulta em considerável resistência a passagem da fase móvel. Como consequência, o solvente necessita ser bombeado para a coluna sob alta pressão.

O método de eluição é chamado isocrático quando a composição da fase móvel é constante. Por outro lado, se a composição da fase móvel varia no decorrer da corrida cromatográfica, a eluição é denominada gradiente. A eluição em gradiente é utilizada quando

a interação soluto-fase estacionária é forte o suficiente para não ser desfeita utilizando um único solvente ou uma mistura de solventes.

Os solutos eluídos de uma coluna cromatográfica são detectados por um equipamento (detectores UV-Ultravioleta, DAD-*Diode Array Detector*) e o sinal é enviado para um computador para visualização e interpretação. O tempo de retenção (TR) de cada soluto é característico do composto quando submetido a determinado conjunto de condições cromatográficas (fase móvel, fase estacionária, fluxo, pH, temperatura).

De acordo com a disposição da fase estacionária, os tipos de cromatografias podem ser divididos em planar e em coluna. O termo cromatografia em coluna é utilizado quando a fase estacionária está contida numa coluna, podendo ainda ser subdividida em cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida (CL) para refletir o estado físico da fase móvel (Hancock, 1990). A Figura 6 esquematiza os principais tipos de cromatografias utilizadas em processos de separação.

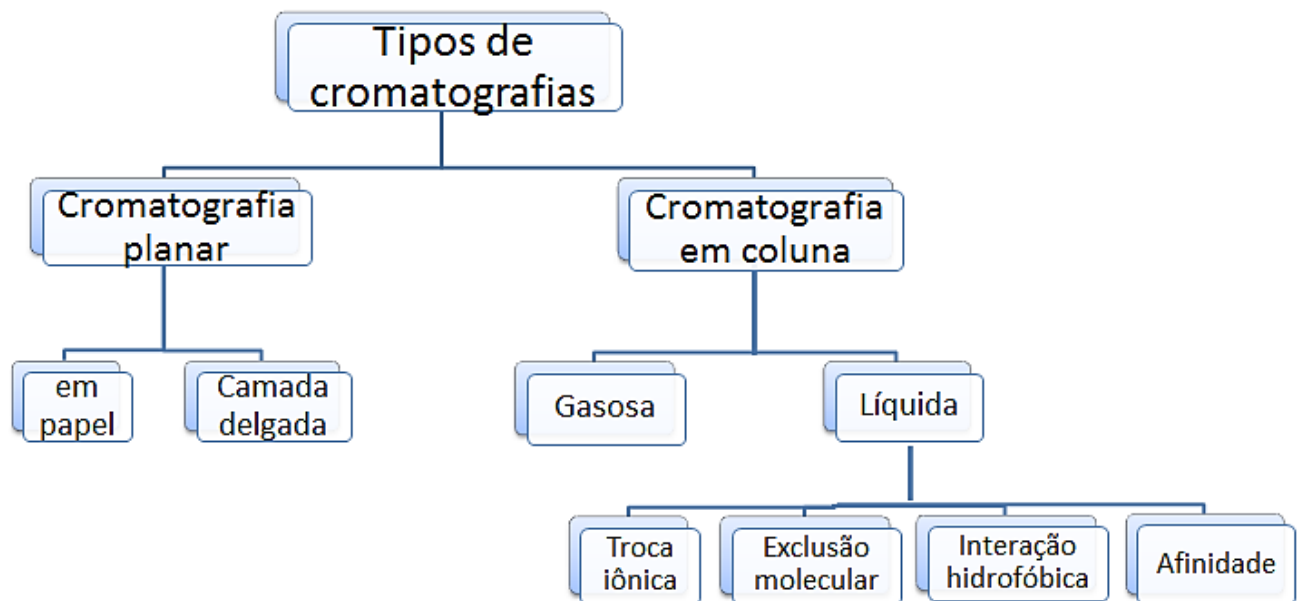


Figura 6. Exemplos de tipos de cromatografias.

1.1.3 *Técnicas cromatográficas*

1.1.3.1 *Cromatografia planar*

1.1.3.1.1 *Cromatografia em papel (CP)*

Esta técnica de partição baseia-se na diferença de solubilidade das substâncias em questão entre duas fases imiscíveis, sendo geralmente a água um dos líquidos. Este método é muito útil para a separação de compostos polares. A cromatografia em papel envolve tanto o fluxo ascendente quanto descendente da fase móvel, sendo que neste último o fluxo é mais rápido devido à ação da gravidade (Miller, 1988).

Após a migração da fase móvel por toda a extensão do papel, via ação capilar e no interior de uma cuba cromatográfica, os *spots* correspondentes às moléculas separadas podem ser visualizados a olho nu ou sob luz UV. Alguns compostos possuem coloração distintiva e outros incolores podem ser marcados com reagentes.

1.1.3.1.2 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

A CCD é uma técnica simples e muito importante para a separação rápida e análise quantitativa de pequenas quantidades de amostras. Ela é usada para determinar a pureza de um composto, identificar componentes em uma mistura comparando-os com padrões; acompanhar o curso de uma reação pelo aparecimento dos produtos e desaparecimento dos reagentes, para isolar componentes de uma mistura e também para o pré-estabelecimento de determinada condição cromatográfica (fase estacionária e composição de solventes) que será utilizada na etapa de cromatografia em coluna.

O princípio de funcionamento é semelhante ao da CP; entretanto, aplica-se apenas o fluxo ascendente da fase móvel. À medida que o solvente sobe pela placa, a amostra é compartilhada entre a fase líquida móvel e a fase sólida estacionária. Durante este processo, os diversos componentes da mistura são separados. Quando estiverem presentes várias substâncias, cada uma se comportará segundo suas propriedades de solubilidade e adsorção, dependendo dos grupos funcionais presentes em sua estrutura (Fried & Sherma, 1994).

Para a visualização dos compostos incolores pode-se "revelar a placa" utilizando diferentes reagentes, tais como nitrato de prata (para derivados halogenados), 2,4-dinitrofenilidrazina (para cetonas e aldeídos), verde de bromocresol (para ácidos), ninhidrina (para aminoácidos), etc.

1.1.3.2 Cromatografia em coluna

1.1.3.2.1 Cromatografia gasosa (CG)

Neste tipo de cromatografia a fase estacionária é constituída por um líquido com elevado ponto de ebulição e a fase móvel é um gás inerte. A separação dos compostos de interesse por CG é alcançada através da solubilidade diferenciada dos compostos nas fases móvel e estacionária. (Cseke *et al.*, 2004). O equipamento de CG basicamente é constituído por um tanque para o gás (por exemplo, hélio ou hidrogênio), um forno contendo coluna cromatográfica, injetor de amostra e detector (FID - detector de ionização de chama, condutividade termal e captura de elétrons).

Considerando-se detector FID, um *loop* é posicionado sobre a chama para detectar os compostos que saem da coluna e passam pela chama. FIDs são muito sensíveis à maioria dos compostos orgânicos. Devido às condições operativas, as amostras são destruídas quando se utiliza este tipo de detector (Jennings, 1987). Embora menos sensitivos, detectores termocodutivos permitem a captação de amostras e compostos pelo fato de não serem destrutivos.

Assim, CG geralmente não é aplicada para a purificação de compostos, mas sim como técnica analítica para identificação qualitativa e quantificação de compostos.

1.1.3.2.2 Cromatografia líquida

Os tipos de cromatografias líquidas mais utilizados são de troca iônica, de exclusão molecular, de interação hidrofóbica e de afinidade.

1.1.3.2.2.1 Cromatografia de troca iônica (CTI)

Através da CTI é possível separar compostos com base em sua carga. O princípio básico de funcionamento da CTI é que, em determinado valor de pH, as moléculas tem uma carga líquida positiva ou negativa, de acordo com sua constituição. Esta característica torna possível a interação/adsorção de solutos com uma matriz cromatográfica carregada com carga oposta. A fase estacionária é composta de uma resina de troca iônica, e as separações são guiadas pela força das interações entre os íons do soluto e os sítios de troca da resina.

Na cromatografia de troca aniônica, a fase estacionária é carregada positivamente e permite a adsorção de moléculas com carga líquida negativa (moléculas que possuem em sua constituição os aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico). A adsorção de moléculas com carga líquida positiva (moléculas que possuem em sua constituição os aminoácidos histidina, lisina, arginina) ocorre em fase estacionária carregada negativamente, caracterizando a cromatografia de troca catiônica.

A eluição (desorção) de solutos ocorre após eles serem trocados por outros íons, presentes na fase móvel, com mesma carga e maior afinidade pela matriz. A fase móvel geralmente é constituída por tampões adicionados de sal; a eluição em gradiente permite o aumento da força iônica.

1.1.3.2.2.2 Cromatografia de exclusão molecular (CEM)

Também conhecida como cromatografia de filtração em gel, CEM separa por partição devido à diferença no tamanho das moléculas presentes em uma mistura. Algumas proteínas que possuem a mesma massa molecular podem ter diferentes arranjos estruturais e conformação; assim, na CEM estes aspectos irão prevalecer sobre o valor da massa molecular.

Após inserção dos solutos na coluna, as moléculas pequenas entram nos poros das partículas, levando, portanto, mais tempo para percorrerem a coluna, enquanto as maiores fluem pela superfície externa das partículas, sendo eluídas primeiramente do sistema (Figuras 7 e 8). A faixa de fracionamento da coluna é característica da fase estacionária e está relacionada com o tamanho dos poros das partículas.

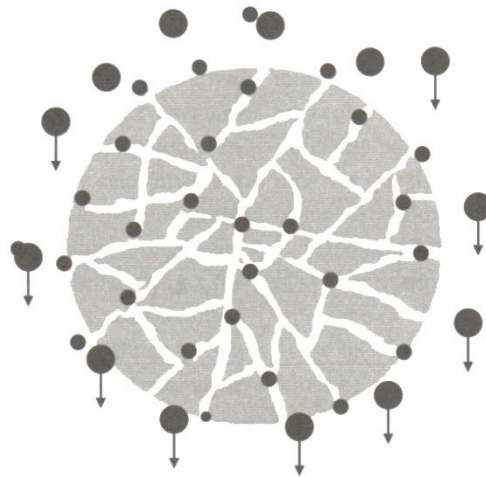


Figura 7. Representação esquemática do princípio da CEM; (●) moléculas maiores que o poro da matriz; (●) moléculas menores que o poro da matriz (Pessoa-Jr & Kilikian, 2005).

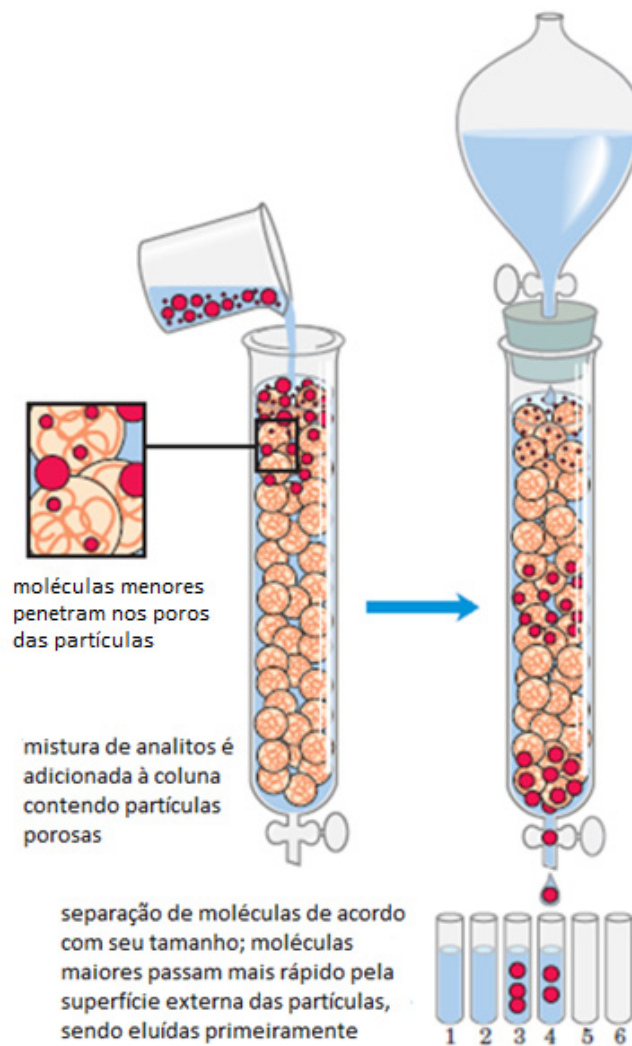


Figura 8. Representação esquemática de uma separação de analitos por CEM (Cseke *et al.*, 2004-adaptado).

Alguns fatores que influenciam a cromatografia de exclusão molecular são o tipo de matriz (agarose, poliacrilamida, dextrana, sílica), tamanho dos poros, empacotamento da coluna, fluxo e viscosidade da fase móvel, geometria da coluna (altura x diâmetro), volume de amostra aplicado.

A CEM é geralmente utilizada para separação de moléculas, fracionamento de misturas em determinadas faixas de tamanho molecular, dessalinização e troca de tampão, polimento final no processo de purificação (separar contaminantes da molécula de interesse).

1.1.2.2.2.3 Cromatografia de interação hidrofóbica (CIH)

A técnica de CIH está baseada na interação hidrofóbica entre analito e matriz, sendo mais efetiva na separação de moléculas grandes e hidrofóbicas. Caracterizam-se como moléculas com porções hidrofóbicas aquelas que possuem cadeias de hidrocarbonetos, aminoácidos (alanina, valina, leucina, isoleucina) e aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina). Assim, é notável um aumento da capacidade adsorvente em função do aumento da cadeia de hidrocarboneto.

A amostra precisa conter alta concentração de sal para permitir que as moléculas adsorvam na coluna hidrofóbica. Comumente sulfato de amônio é utilizado. Para compostos mais hidrofílicos, a concentração inicial de sal precisa ser aumentada para permitir a adsorção à matriz (Scopes, 1987).

CIH utiliza fase estacionária não-polar e fase móvel polar. A eluição é tipicamente sob a forma de gradiente linear (força iônica decrescente), partindo de alta concentração de sal para um tampão sem sal (ou com baixa concentração de sal). Colunas de IH são geralmente constituídas de matriz polimérica revestida por cadeias de hidrocarbonetos (fenil, butil, metil).

1.1.2.2.2.4 Cromatografia de afinidade (CA)

CA envolve o uso de um receptor o qual é ligado covalentemente a uma fase sólida inerte. O receptor tem alta afinidade por um dos componentes (ligante) da mistura. A ligação receptor-ligante deve ser seletiva e reversível.

A técnica é amplamente aplicada na purificação de proteínas rotuladas (principalmente aquelas com cauda de histidina – 6x His tag). Neste caso, colunas com matrizes associadas a ácido iminodiacético carregado com Ni^{+2} são empregadas para purificar proteínas com cauda de histidina.

A Figura 9 ilustra as etapas intrínsecas à cromatografia de imunoafinidade. Após eluição de compostos indesejados, o ligante é eluído facilmente da coluna pela mudança do pH da fase móvel.

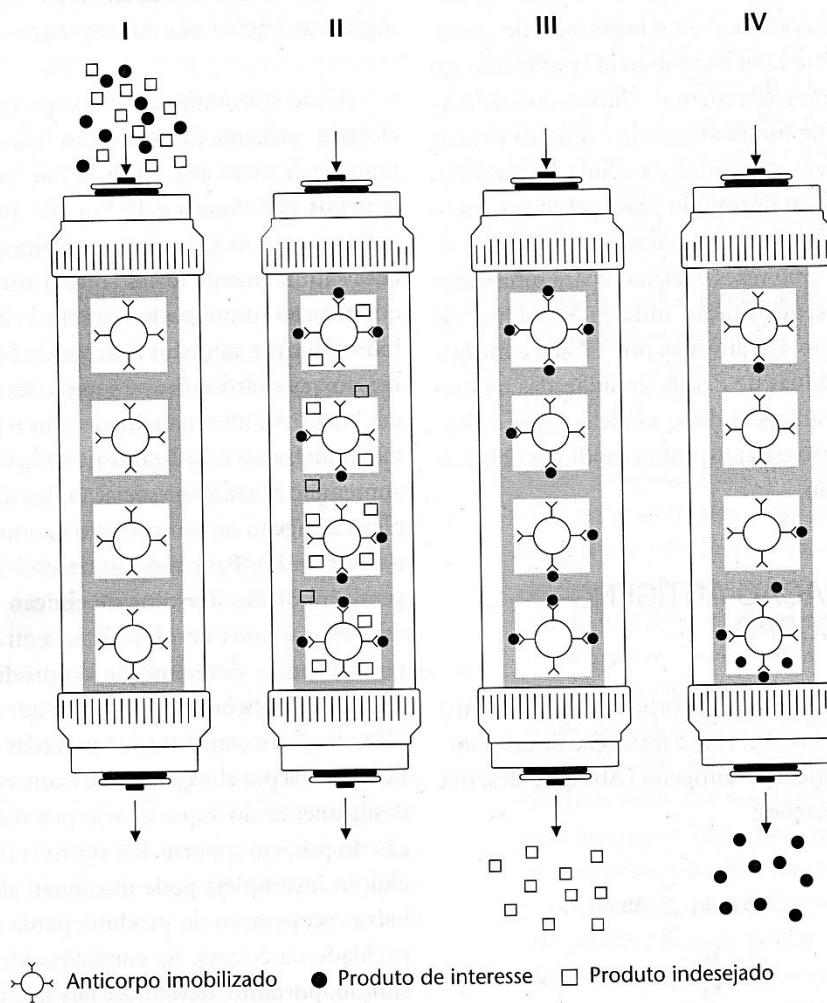


Figura 9. Esquema das etapas de cromatografia de imunoafinidade. I e II: entrada de amostra; III: lavagem; IV: eluição (Pessoa-Jr & Kilikian, 2005).

Devido a esta alta seletividade e eficiente capacidade de ligação, CA representa uma excelente técnica de separação e purificação de moléculas biológicas, sendo utilizada como processo de purificação de única etapa em pequena e larga escala. As aplicações incluem

purificação de proteínas (incluindo anticorpos e enzimas), ácidos nucleicos ou qualquer outro composto que atue como ligante para determinado receptor.

1.1.4 Espectrometria de massas para caracterização e identificação de biomoléculas

A técnica analítica de espectrometria de massas (EM) pode ser usada para identificar e elucidar a estrutura de compostos desconhecidos, detectar e quantificar moléculas conhecidas. EM vêm se apresentando como uma técnica de alta resolutividade para amostras biológicas complexas, incluindo proteínas, DNAs ou extratos de plantas, nas quais a informação relativa à identidade e estrutura dos analitos é requerida (Nika *et al.*, 2014).

Um espectrômetro de massas é um equipamento capaz de medir a relação massa/carga (m/z) de moléculas individuais que foram convertidas a íons. A protonação ou desprotonação das moléculas são exemplos de eventos que induzem à perda ou ganho de carga.

1.1.4.1 Técnicas de ionização

Ionização por *spray* de elétrons (ESI) e ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI) são técnicas que permitem o exame de amostras em soluções líquidas ou imersas em matriz sólida. ESI e MALDI caracterizam-se como os processos de ionização mais aplicados devido à grande sensibilidade e disponibilidade de amplo intervalo de detecção de massas.

1.1.4.1.1 Ionização por spray de elétrons (ESI)

Moléculas ionizadas no estado gasoso são geradas por ESI partindo-se de uma solução líquida. A fonte de ESI requer um elevado campo elétrico na extremidade do capilar e conduz à formação de gotículas altamente carregadas. O campo elétrico leva ao acúmulo de carga na superfície do líquido, que está no terminal capilar, o que resulta na ejeção de gotículas. Conforme o tamanho da gota diminui, a densidade do campo elétrico em sua superfície aumenta. A repulsão mútua entre as cargas superficiais torna-se forte o bastante para exceder as forças de tensão superficial; os íons então emergem da gotícula e são direcionados ao orifício no analisador de massas (Figura 10). ESI produz íons multi-carregados.

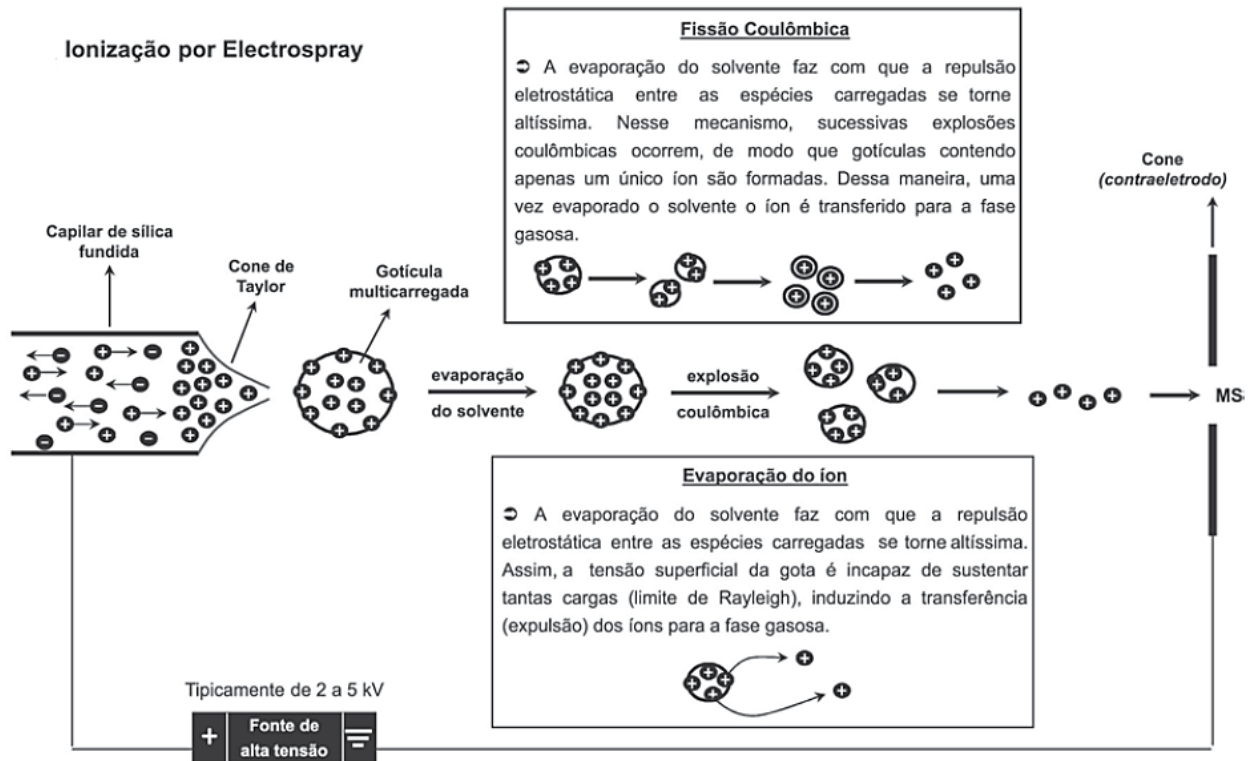


Figura 10. Esquema do modo de ionização por *spray* de elétrons (Cantu *et al.*, 2008).

1.1.4.1.2 Ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI)

Este tipo de ionização é realizada direcionando-se um feixe de laser pulsado na amostra que está misturada a uma matriz. A matriz absorve a energia do laser, transferindo-a para a amostra, o que resulta na vaporização e ionização dos analitos. Um esquema deste tipo de ionização pode ser visualizado na Figura 11. Em contraste com ESI, MALDI geralmente produz íons moleculares mono-carregados.

Ionização por MALDI

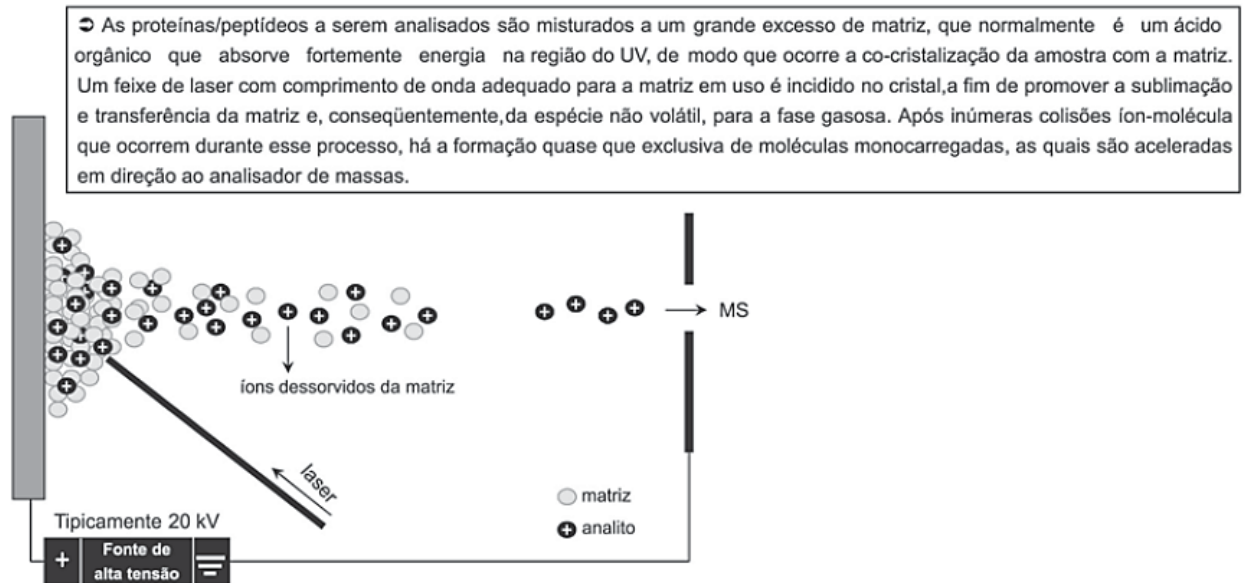


Figura 11. Esquema do modo de ionização por MALDI (Cantu *et al.*, 2008).

1.1.4.2 Analisadores

1.1.4.2.1 Espectrômetro de massas quadrupolo

A classificação de massas depende do deslocamento do íon que é resultante da corrente elétrica aplicada e frequência de campo elétrico. A varredura é realizada sistematicamente alterando-se força/resistência dos campos, modificando o valor de m/z que é transmitido através do analisador. O equipamento quadrupolo consiste em quatro polos paralelos que funcionam como filtros de massas. Quando o campo é aplicado, íons movendo-se através da região de campo irão oscilar de acordo com suas razões m/z . Em determinada frequência de campo, apenas íons com particular m/z podem passar pelos quadrupolos e atingir o detector. A relação m/z de um íon é determinada correlacionando-se o campo aplicado nos quadrupolos. Um espectro de massas pode ser obtido através da varredura do campo elétrico.

1.1.4.2.2 Espectrômetro de massas ion-trap

Em espectrômetros do tipo *ion-trap* há um eletrodo em formato de argola na posição central e dois eletrodos em cada extremidade. Dentro de uma faixa selecionada de m/z determinada pelas voltagens aplicadas, íons são contidos no espaço limitado pelos eletrodos.

O espectro de massas é produzido pela variação das voltagens aplicadas para ejetar íons de crescente razão m/z .

1.1.4.2.3 Espectrômetro de massas *time-of-flight* (TOF)

Equipamentos TOF separam íons de acordo com seus diferentes tempos de vôos sobre determinada distância. Ions são acelerados e recebem igual energia cinética, sendo direcionados para o tubo de vôo. Uma vez que energia cinética é igual $\frac{1}{2} mv^2$, onde m equivale a massa do íon e v sua velocidade, quanto menor a massa de um íon, maior a sua velocidade e, conseqüentemente, seu tempo de vôo é mais curto. O tempo de vôo a partir da fonte de ionização, passando pelo tubo e atingindo o detector, é medido em microssegundos e pode ser transformado em valor de m/z .

1.1.4.3 Espectrometria de massas *tandem*

Ambos ESI e MALDI são usados para análise espectrométrica de moléculas não voláteis grandes, tais como proteínas, DNA e outras biomoléculas. A formação de íons-fragmento pode ser limitada e, como consequência, a informação estrutural torna-se limitada. Com o objetivo de obter informação estrutural mais detalhada, fragmentação adicional de íons selecionados pode ser induzida e analisada por técnicas MS/MS denominadas *espectrometria de massas tandem* (abreviada por MS_n, onde n refere-se ao número de gerações de íons-fragmentos). Os íons-fragmentos são gerados por processo de colisão a partir de um íon particular (íon-precursor). Esta fragmentação pode ser realizada em equipamentos do tipo *tandem-in-space* tais como espectrômetros de massas triplo-quadrupolo, ou em aparelhos do tipo *tandem-in-time* tais como espectrômetros *ion-trap*.

Em um espectrômetro triplo-quadrupolo, o segundo quadrupolo é usado como célula de colisão para gerar íons-fragmentos. O íon com m/z de interesse é selecionado pelo primeiro quadrupolo Q1, e somente o íon selecionado entra no segundo quadrupolo Q2, onde a fragmentação é adquirida pela colisão íon-átomos de argônio. Os fragmentos gerados são então analisados pelo terceiro quadrupolo Q3, para obtenção da informação estrutural.

Se em um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo Q3 for substituído por um analisador TOF, a combinação quadrupolo-TOF proverá maior resolução e alcance de massas do que o tipo convencional.

Um importante aspecto de aparelhos *ion-trap* é sua habilidade em realizar MS_n experimentos, enquanto espectrômetros *tandem in space* podem apenas realizar MS₂.

1.1.4.4 Espectrometria de massas MALDI-TOF

A técnica de EM MALDI-TOF, desenvolvida em 1987 (Karas *et al.*, 1987), tem aumentado o limite superior de análise espectrométrica de massas de biomoléculas para acima de 300 kDa, além de tornar tais análises mais fáceis e sensíveis.

O equipamento MALDI-TOF pode operar em no modo linear (um único estágio) ou em modo *reflectron* (duplo estágio), no qual a resolução de massas é aumentada. Neste último caso, o refletor, localizado no final do tubo de vôo, é usado para compensar a diferença nos tempos de vôos de íons com mesma *m/z* cuja energia cinética difere minimamente.

Determinações de massas e informação sobre sequência primária podem ser obtidas através da ferramenta EM MALDI-TOF. A fragmentação de peptídeos por EM para posterior análise de sua sequência de aminoácidos é comumente realizada por meio do processo de dissociação induzida por colisão (Tabb *et al.*, 2003). Neste processo os peptídeos são inicialmente introduzidos em uma região de vácuo do espectrômetro de massas por MALDI.

Os peptídeos ionizados são acelerados para uma região do espectrômetro de massas preenchida por gás inerte (hélio, argônio ou nitrogênio) proporcionando assim a colisão entre os peptídeos ionizados e as moléculas do gás inerte. Como resultado, a energia translacional transferida em cada colisão é convertida em energia interna, a qual desestabiliza as ligações do esqueleto polipeptídico (Mann *et al.*, 1989). Os íons fragmentos resultantes são classificados como íons que retêm a carga residual (próton) do lado n-terminal (gerando fragmentos -a, -b, -c, de acordo com a ligação que é fragmentada) e como íons que retêm a carga residual na região C-terminal (gerando os fragmentos -x, -y, -z de acordo com a ligação que é fragmentada) (Figura 12) (Biemann, 1990).

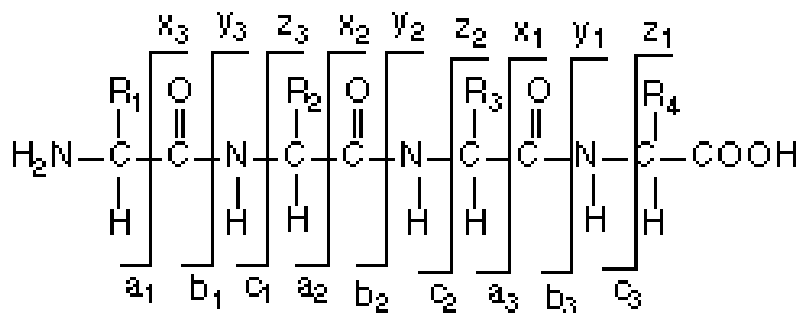


Figura 12. Ilustração dos fragmentos formados (pares a/x, b/y, c/z) através da clivagem de ligações ao longo do esqueleto da cadeia peptídica linear (<http://www.abrf.org/ABRFNews/1997/June1997/jun97lennon.html>).

Como a fragmentação de um peptídeo pode ser de certa forma previsível, as massas dos íons fragmentos resultantes são usadas para determinar a seqüência peptídica. Como a interpretação dos espectros de massa pode ser demorada e trabalhosa, softwares têm sido desenvolvidos para auxiliar este processo. Entretanto, a interpretação feita de modo manual ainda é muito utilizada, especialmente para moléculas com menor número de aminoácidos.

A sequência de peptídeos a partir do C-terminal pode ser interpretada diretamente do espectro de massas pela determinação dos valores de diferenças de massas entre picos adjacentes.

Os fragmentos de íons produzidos de peptídeos e proteínas tipicamente podem incluir perdas neutras de moléculas tais como água, amônia e porções de cadeias laterais de aminoácidos). Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, a formação do par de íons -b/-y é mais frequente, o que pode facilitar a interpretação dos espectros.

1.2 Resistência a antimicrobianos versus pesquisa & desenvolvimento de novas drogas

A identificação e o desenvolvimento da antibioticoterapia representam uma das principais conquistas científicas do século XX em termos de impacto sobre a morbidade e a mortalidade humanas (Bastos *et al.*, 2009). Entretanto, patógenos multirresistentes às drogas de uso corrente têm se sobressaído na população microbiana, ocasionando infecções de difícil controle e supressão. Além disso, o número de novas drogas desenvolvidas, que poderiam ser utilizadas no tratamento de infecções causadas por esses patógenos resistentes têm se mostrado limitado.

A necessidade de compostos novos e aplicáveis para prover assistência em todos os aspectos das necessidades humanas é uma condição sempre crescente. Resistência à drogas em microrganismos, o aparecimento de viroses que representam ameaça à vida e o aumento na incidência de infecções fúngicas na população mundial impulsionam a pesquisa para prospecção e descoberta de novos compostos para prevenir e tratar doenças humanas, animais e de vegetais (Ratti *et al.*, 2008).

Por outro lado, o mercado de antibióticos não é tão promissor quanto o mercado para o tratamento de doenças crônicas tais como alto colesterol, depressão ou hipertensão arterial. Para estas doenças incuráveis, as drogas devem ser tomadas por longos períodos de tempos, frequentemente durante a vida toda. Antibióticos, os quais curam infecções, são apenas administrados por dias ou semanas (Shales, 2010). Soma-se a isto o fato de que a ciência para a descoberta de novos antibióticos está mudando e a economia de antibióticos está se tornando menos e menos favorável. As agências regulatórias, tais como a americana FDA (*Food and Drug Administration*), estão contribuindo para o problema com a barragem de requerimentos para ensaios clínicos que os tornam difíceis, caros e mais vagarosos.

Frente a este cenário, de acordo com Cooper & Shlaes (2011), os governos deveriam tornar o desenvolvimento de novos antibióticos viáveis para a indústria. Apenas quatro novas classes de antibióticos foram lançadas nos últimos 40 anos e por conta disso a Organização Mundial de Saúde prevê um desastre devido ao rápido aumento na resistência microbiana.

Ensaio clínico de fase III (em grandes grupos de pacientes) de um antibiótico em indicação para uma única doença custa aproximadamente US\$ 70 milhões. Financiamento para empresas de Biotecnologia provenientes de capital de risco ou concessões governamentais não cobrem estes gastos para uma droga que irá ser vendida somente em

curtos períodos, sem contar o fato de que a resistência microbiana frente a esta droga poderá emergir. Muitas companhias grandes têm abandonado a pesquisa e desenvolvimento em antibióticos, como indicam os dados da Figura 13 (Cooper & Shlaes, 2011).

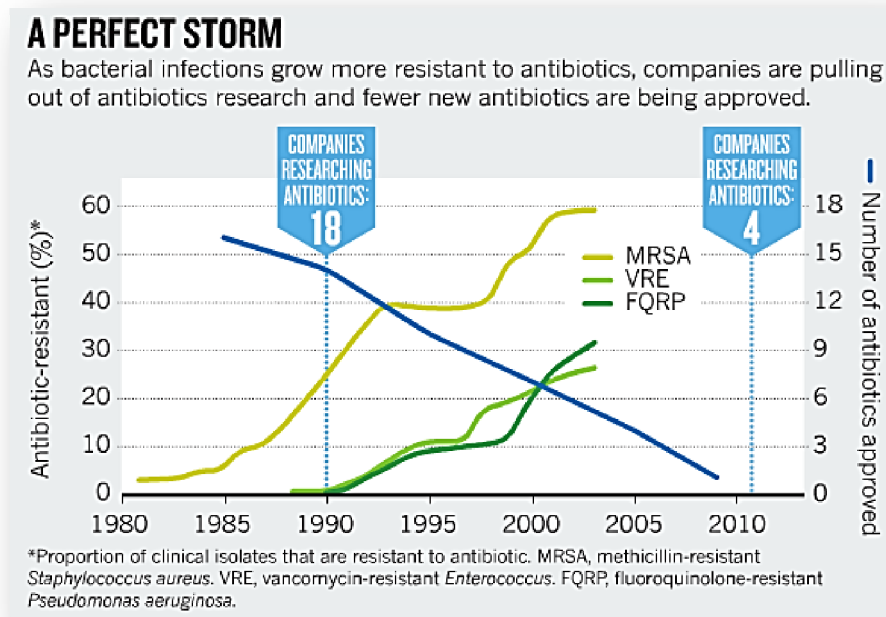


Figura 13. Correlação entre a porcentagem de cepas resistentes a antibióticos com o número de companhias que pesquisam novos antibióticos, desde 1980 a 2011 (Cooper & Shlaes, 2011).

A Escola de Economia de Londres desenvolveu em 2009 um modelo econômico para investimento em drogas que cumprem estrito critério para necessidades médicas a probabilidade de sucesso no registro: o incentivo “empurra-puxa” (Mossialos *et al.*, 2009). O “empurra” envolveria fundos governamentais para cobrir o alto custo dos ensaios de fase clínica III e incentiva o custo de entrada no mercado, principalmente para pequenas empresas com fundos limitados. O “puxa” no modelo proposto é garantido pela aquisição por parte do governo de uma quantidade de antibiótico para um estoque nacional – como já ocorrido para a pandemia de Influenza e Antrax. No mesmo sentido de incentivos “puxa”, o congresso americano propôs conceder a certos antibióticos 5 anos extra de proteção por patente.

A adoção de medidas econômicas direcionadas para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos é fundamental para governos, empresas e sociedade (Morel & Mossialos, 2010). Governos teriam um retorno significativo de investimento à medida que houvesse

redução dos estimados 2 milhões de pacientes que adquirem infecções hospitalares a cada ano nos Estados Unidos, dos quais 175 mil morrem. Resistência a antibióticos tem um custo estimado para os hospitais de mais de US\$ 20 bilhões anuais e adicionam 2 semanas a mais no tempo de internação de cada paciente. Subsidiando empresas que pesquisam novas drogas pode parecer “inapropriado” por alguns ângulos; entretanto, é necessário para superar o abismo entre o alto valor de novos antibióticos para a sociedade e o baixo retorno que eles dão para as companhias (Shales, 2010).

O Departamento Norte-Americano de Saúde e Serviços Humanos e a Comissão Europeia de Saúde Pública criaram em 2009 um comitê denominado *Transatlantic Task Force on Antimicrobial Resistance* (TATFAR) que possui foco em questões relacionadas ao uso de antimicrobianos. Este comitê tem preparado relatórios com propostas para futura cooperação e política de alinhamento entre indústria e agências governamentais americanas e europeias (TATFAR, 2014). As recomendações redigidas dividem-se em grandes áreas, sendo elas: (i) Apropriado uso terapêutico de drogas antimicrobianas em medicina e comunidades veterinárias; (ii) Prevenção de infecções resistentes a drogas; e (iii) Estratégias para pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, procedimentos diagnósticos e técnicas para manutenção de drogas já existentes no mercado.

De acordo com Shales (2010), resistência a antimicrobianos é uma crise global que requer ações globais a fim de evitar que a mais valiosa descoberta científica do século XX seja perdida no século XXI.

Paralelamente a estes conflitos na pesquisa por novos antibióticos, as alternativas que têm sido investigadas para substituição (ou uso em paralelo) aos antibióticos convencionais incluem derivados de plantas, bacteriófagos e peptídeos antimicrobianos de uma variedade de fontes (Bocchinfuso *et al.*, 2009).

1.3 Peptídeos antimicrobianos (PAM)

1.3.1 Características e classificação

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são um grupo único e variado de moléculas as quais são produzidas por organismos vivos de todos os tipos e que fazem parte do sistema imune inato (Giuliani *et al.*, 2007; Zasloff, 2002). Tais peptídeos têm demonstrado potente atividade antimicrobiana e são rapidamente mobilizados para neutralizar ampla quantidade de espécies incluindo vírus, bactérias, protozoários e fungos (Mookherjee & Hancock, 2007). Considerando-se o sistema imune de organismos, PAMs atuam como um sistema de defesa não-específico que complementa a alta especificidade da resposta imune mediada por células.

O aumento da resistência bacteriana a antibióticos convencionais vêm estimulando o isolamento e caracterização de diferentes PAMs para uso potencial como novos agentes antibacterianos e antifúngicos. Mais significativamente, a habilidade destas moléculas naturais em suprimir microrganismos multi-droga resistentes direciona a elas considerável atenção e interesse clínico (Giuliani *et al.*, 2007).

Com base em seu modo de síntese, PAMs são divididos em duas grandes categorias, sendo ribossomalmente sintetizados e não-ribossomalmente sintetizados (Finking & Marahiel, 2004; Papagianni, 2003). Síntese de peptídeos mediada por ribossomos é uma função celular bem conhecida em todos os organismos. Mas muitas bactérias e poucos outros organismos eucarióticos exibem síntese de peptídeos independente de ribossomos (Dittmann *et al.*, 2001). Na presença de RNAase e antibióticos como estreptomicina, cloranfenicol, rifampicina e eritromicina, a maquinaria para síntese de proteínas mediada por ribossomos é adversamente prejudicada, ao passo que a síntese de peptídeos não-ribossomais permanece inalterada (Katz & Demain, 1977).

PAM são moléculas pequenas, carregadas positivamente, anfipáticas, com composição variável de aminoácidos (até 100 resíduos). De acordo com sua estrutura secundária, PAMs são agrupados em quatro classes: folhas- β , α -hélice, loop e peptídeos estendidos (Figura 14). Atualmente, mais de 800 PAMs naturais com sequências bastante variadas têm sido isolados de vasto número de organismos (Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) (Peters *et al.*, 2010).

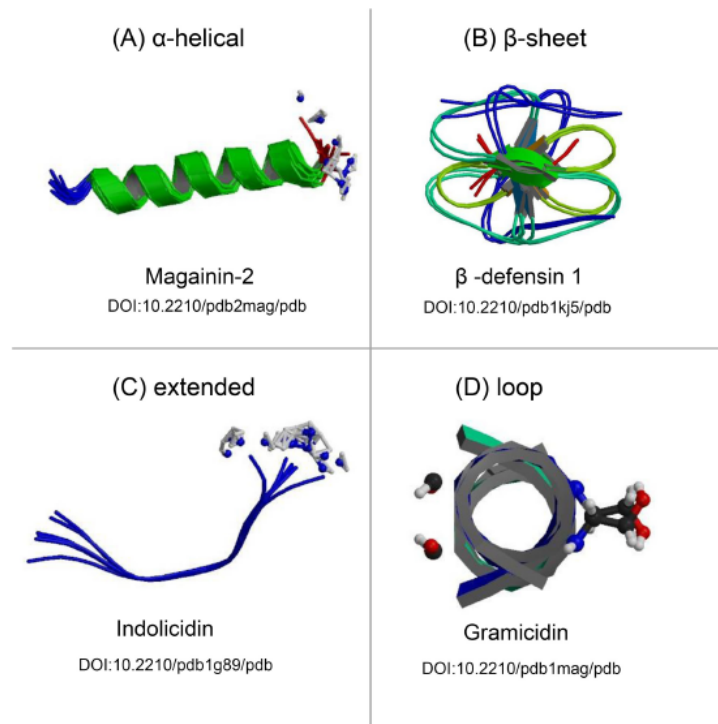


Figura 14. Modelos representando as diferenças estruturais nas quatro classes de peptídeos antimicrobianos. PAMs podem ser agrupados em quatro classes de acordo com suas estruturas secundárias, incluindo (A) peptídeos α -hélice, (B) peptídeos compostos por uma série de folhas- β , (C) peptídeos que possuem estruturas não convencionais, tais como hélices estendidas e (D) peptídeos com estrutura em *loop*. As estruturas foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>) e foram referenciadas de acordo com o Identificador de Objeto Digital (DOI) (Berman *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2010).

1.3.2 Mecanismos de ação

Embora haja grande diversidade de moléculas, a maioria dos PAMs danifica a membrana celular como parte do seu mecanismo de ação através da formação de poros, os quais permitem o efluxo de substâncias, desestabilizando e conduzindo à morte celular. Embora os mecanismos pelos quais os peptídeos se associam e permeabilizam a membrana celular microbiana não estejam totalmente esclarecidos, acredita-se que PAMs liguem-se a membrana citoplasmática, criando agregados que se posicionam de tal modo a formar poros, o que conduz a um efeito disruptivo (Figura 15).

Entretanto, outras evidências indicam mecanismos adicionais ou complementares nos quais os peptídeos têm como alvo componentes citoplasmáticos cruciais para a adequada fisiologia celular (Figura 15) (Harris *et al.*, 2009; Yeaman & Yount, 2003). Assim, a interação

inicial entre peptídeos e a membrana celular microbiana permite que eles penetrem na célula e possam se ligar a moléculas e organelas intracelulares, resultando na inibição da biossíntese da parede celular, DNA, RNA e proteínas.

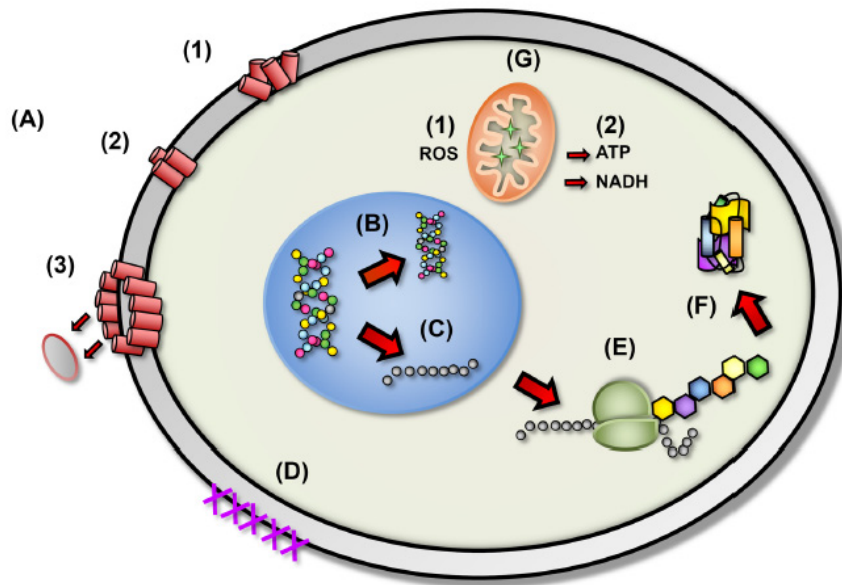


Figura 15. Mecanismos de ação propostos para atuação de PAMs em células microbianas. (A) Rompimento da integridade da membrana celular: (1) inserção randômica na membrana, (2) alinhamento das sequencias hidrofóbicas, e (3) remoção de seções da membrana e formação de poros. (B) Inibição da síntese de DNA. (C) Bloqueio da síntese de RNA. (D) Inibição das enzimas necessárias para ligação de proteínas estruturais da parede celular. (E) Inibição da função ribossomal e síntese de proteínas. (F) Bloqueio de proteínas chaperonas atuantes no enovelamento de proteínas. (G) Atuação na mitocôndria: (1) inibição da respiração celular e indução de formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) e (2) rompimento da integridade da membrana celular e efluxo de ATP e NADH (Peters *et al.*, 2010).

A constatação de que um número elevado de PAMs, com tamanhos e sequências variadas, são ativos em concentrações similares sugere um mecanismo geral para induzir a morte bacteriana, ao invés de um mecanismo específico que requer estruturas ativas preferenciais (Shai, 2002). Tal mecanismo está em concordância com o “modelo do tapete” que não requer uma estrutura específica ou sequência. Provavelmente, quando há um balanço apropriado entre hidrofobicidade e carga positiva líquida os peptídeos são ativos em bactérias. Entretanto, atividade seletiva depende também de outros parâmetros, tais como volume da molécula, sua estrutura e sequência, concentração, estado oligomérico em solução e em membranas. Além disso, embora vários estudos sustentem que o dano na membrana bacteriana

seja o evento letal para o microrganismo, outros estudos apontam para mecanismo multissucessivo no qual o PAM liga-se a vários alvos na região citoplasmática da bactéria (Shai, 2002).

Uma condição essencial para qualquer agente antimicrobiano é que tenha toxicidade seletiva para o alvo microbiano. Esta é uma importante característica dos PAMs, uma vez que sua interação preferencial com células microbianas faz com que eles não sejam tóxicos para células de mamíferos. Baseado nas distinções significativas entre células de mamíferos e microbianas, vários fatores determinam a seletividade dos PAMs, tais como composição de membrana, potencial transmembrana, polarização e aspectos estruturais (Bradshaw, 2003; Harris *et al.*, 2009; Yeaman & Yount, 2003).

PAMs apresentam diversas vantagens potenciais como futuros terapêuticos; soma-se ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana e rápida ação biocida o fato de que eles neutralizam endotoxinas e não são afetados por mecanismos clássicos de resistência a antimicrobianos (Peschel & Sahl, 2006). Uma aplicação promissora de PAMs, consequente a sua propensão para permeabilizar membranas, é o aumento da potência de antimicrobianos já existentes por facilitar o acesso à célula microbiana, resultando em efeito terapêutico sinérgico (Hajji *et al.*, 2010). Além disso, ao contrário de antibióticos convencionais, os quais micróbios rapidamente circunvertem, PAMs não induzem a resistência, mais provavelmente devido às profundas mudanças na estrutura da membrana, as quais conduzem rapidamente a célula à morte.

Molécula isolada de *Streptomyces* spp. endofítico da planta *Monstera* spp., a coronamicina é um PAM ativo contra fungos patogênicos tais como *Cryptococcus neoformans*, que também apresenta atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* com IC₅₀ de 9,0 ng/ml (Ezra *et al.*, 2004).

P. polymyxa é conhecido por produzir dois grupos de PAMs. Um grupo compreende moléculas ativas contra bactérias Gram-negativas, incluindo polimixinas (Shoji *et al.*, 1977). O outro grupo é constituído por PAMs ativos contra fungos e bactérias Gram-positivas, incluindo fusaricidinas A, B C e D (Beatty & Jensen, 2002) e compostos análogos a fusaricidinas (Raza *et al.*, 2010).

1.3.3 Lipopeptídeos antimicrobianos

Lipopeptídeos são moléculas constituídas por uma sequência de aminoácidos, dipostos de forma linear ou cíclica, na qual uma porção lipídica está associada. Tais compostos apresentam-se ativos contra um grande número de espécies de bactérias, fungos e oomicetos (Ongena & Jacques, 2008).

Uma característica importante dos lipopeptídeos é sua propriedade biosurfactante. Neste sentido, surfactantes presentes em extratos de *Bacillus subtilis* demonstraram capacidade para remoção de metais (cobre, níquel e cobalto), além de potencial para remoção de compostos orgânicos a partir de solo contaminado com tolueno (Herculano *et al.*, 2011). A mesma espécie foi reconhecida pela produção dos lipopeptídeos surfactina e iturina, os quais estão associados à atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antimicoplasma (Etchegaray *et al.*, 2008; Jacques, 2011). Na área ambiental, surfactinas são capazes de remover óleos (Schaller *et al.*, 2004) e metais pesados (Benetazzo & Etchegaray, 2011).

A bactéria marinha *Bacillus circulans* produz um lipopeptídeo biosurfactante não-hemolítico que possui atividade biológica contra amplo número de espécies Gram-positivas, Gram-negativas e isolados clínicos multi-droga-resistentes, incluindo cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes (Das *et al.*, 2008). Através de ensaio *in vitro* os autores verificaram que *Proteus vulgaris* e *Alcaligenes faecalis* são inibidos pelo lipopeptídeo descrito na concentração mínima de 10 µg/ml. Uma característica de destaque da nova molécula é sua atividade não-hemolítica, em contraposição ao lipopeptídeo surfactina produzido por *Bacillus subtilis*. Este fato confere vantagens para o uso deste novo lipopeptídeo em tratamentos animais.

Estudos demonstraram que lipopeptídeos biosurfactantes podem ser utilizados para inibir a adesão e formação de biofilme por patógenos em próteses e cateteres (Rufino *et al.*, 2011). Complementarmente, lipopeptídeos podem atuar como agentes antivirais e antitumorais, imunomoduladores ou inibidores de toxinas e enzimas (Rodrigues *et al.*, 2006, a). Assim, o potencial de aplicação de lipopeptídeos abrange as áreas de remediação ambiental (Pacwa-Ptocińczak *et al.*, 2011), saúde/médica (Cameotra & Makkar, 2004).

Estudo realizado por Guo *et al.* (2012) constatou que a cepa de *P.thiaminolyticus* OSY-SE produz um lipopeptídeo cíclico, denominado *paenibacterin*, cujo espectro de atividade abrange bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O composto consiste em um

peptídeo cíclico com 13 resíduos a uma cadeia lipídica de 15 carbonos acoplada na posição N-terminal. A estrutura desta nova molécula está demonstrada na Figura 16.

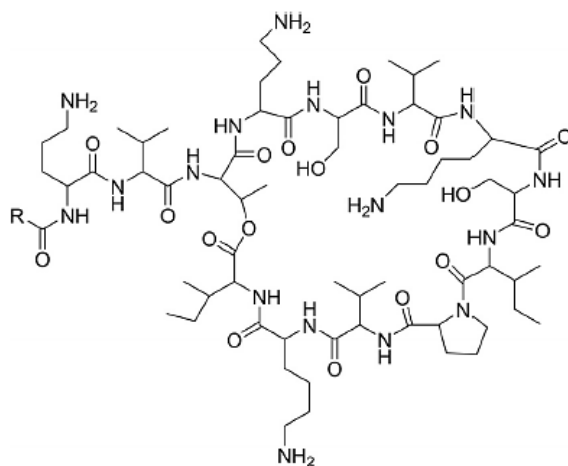


Figura 16. Estrutura molecular de *paenibacterin*; lipopeptídeo cíclico produzido por *P.thiaminolyticus* OSY-SE. R = CH₃(CH₂)₁₃ (cadeia normal), CH₃CH(CH₃)(CH₂)₁₁ (cadeia iso), ou CH₃CH₂CH(CH₃)(CH₂)₁₀ (cadeia anteiso) (Guo *et al.*, 2012).

A despeito do mecanismo de ação de *paenibacterin*, o lipopeptídeo catiônico mostrou forte afinidade pelos lipopolissacarídeos (LPS) carregados negativamente presentes na membrana externa de *E. coli*. *Paenibacterin* também danificou a membrana citoplasmática bacteriana, como evidenciado pela despolarização do potencial de membrana e extravasamento de íons potássio intracelulares de *E. coli* e *S. aureus*. Portanto, a atividade bactericida de *paenibacterin* é atribuída ao rompimento da membrana externa da bactéria Gram-negativa e dano à membrana citoplasmática de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (Huang & Yousef, 2014 b).

Paenibacterin mostrou baixa toxicidade contra linhagem celular de rim humano (ATCC CRL-2190), com IC₅₀ ≥ 109 µg/ml (Huang & Yousef, 2014 a). Em um modelo de choque séptico murino, duas doses de 500 µg de *paenibacterin* aumentaram significativamente a sobrevivência de camundongos submetidos a níveis letais de *Pseudomonas aeruginosa*. Considerando que o lipopeptídeo é efetivo contra várias outros patógenos resistentes a antibióticos, os autores sugerem que este agente antimicrobiano é um candidato promissor a nova droga (Huang & Yousef, 2014 a).

1.3.4 Lantibióticos

Um grande número de PAMs é sintetizado nos ribossomos e sequencialmente recebem modificações para adquirirem formas biologicamente ativas. Tais peptídeos, produzidos por certo tipos de bactérias, são genericamente denominados bacteriocinas (Tagg *et al.*, 1976; Nissen-Meyer & Nes, 1997; Ennahar *et al.*, 2000). Lantibióticos pertencem à classe I de bacteriocinas, e caracterizam-se por conter aminoácidos não usuais tais como aminoácidos com ligações cruzadas de tio-éter, lantionina, 3-metil-lantionina e aminoácidos desidratados (Chatterjee *et al.*, 2005; McAuliffe *et al.*, 2005). Estes resíduos modificados estabilizam a conformação molecular sendo essenciais para a atividade antimicrobiana e também para resistência a ação de proteases – secretadas pelas próprias espécies produtoras de lantibióticos (Osapay *et al.*, 1997; van Kraaij *et al.*, 2000).

O nome lantibióticos foi designado em 1988 como uma abreviação para antibióticos que contém lantionina (Schenell *et al.*, 1988). Nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, foi o primeiro e mais proeminente membro dos lantibióticos, que foi descoberto pouco antes da penicilina, e vem sendo utilizado extensivamente como conservante em alimentos (Delves-Broughton, 1990).

A produção de um novo lantibiótico por *P. polymyxa* OSY-DF foi reportada por He *et al.* (2007). O PAM, denominado *paenibacillin*, mostrou-se ativo contra *Bacillus* spp., *Clostridium sporogenes*, *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria* spp., *Pediococcus cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. De acordo com os autores, o novo lantibiótico, que apresenta alto grau de modificações pós-traducionais, possui propriedades físico-químicas de um agente antimicrobiano ideal em termos de solubilidade em água, resistência térmica e estabilidade a tratamento ácido/alcalino (pH 2.0 a 9.0).

1.3.5 Potencial terapêutico de PAMs

Interessantemente, embora o papel biológico fundamental de PAMs seja a atividade antimicrobiana, estudos têm assinalado novas funções alternativas para estas moléculas, incluindo atividade imunomodulatória, cicatrização de feridas e propriedades anti-neoplásicas (Brown & Hancock, 2006; Diamond *et al.*, 2009; Mader & Hoskin, 2006; Mookherjee &

Hancock, 2007; Steintraesser *et al.*, 2008). PAMs também possuem propriedades antivirais, inibindo fusão viral e egresso, impedindo a infecção e disseminação através de interações diretas com o envelope viral membranoso e moléculas da superfície celular do hospedeiro (Peters *et al.*, 2010). Alguns estudos também verificaram que PAMs possuem atividade anticâncer (Papo & Shai, 2005; Mader & Hoskin, 2006). Um esquema representativo do potencial terapêutico de PAMs pode ser observado na Figura 17.

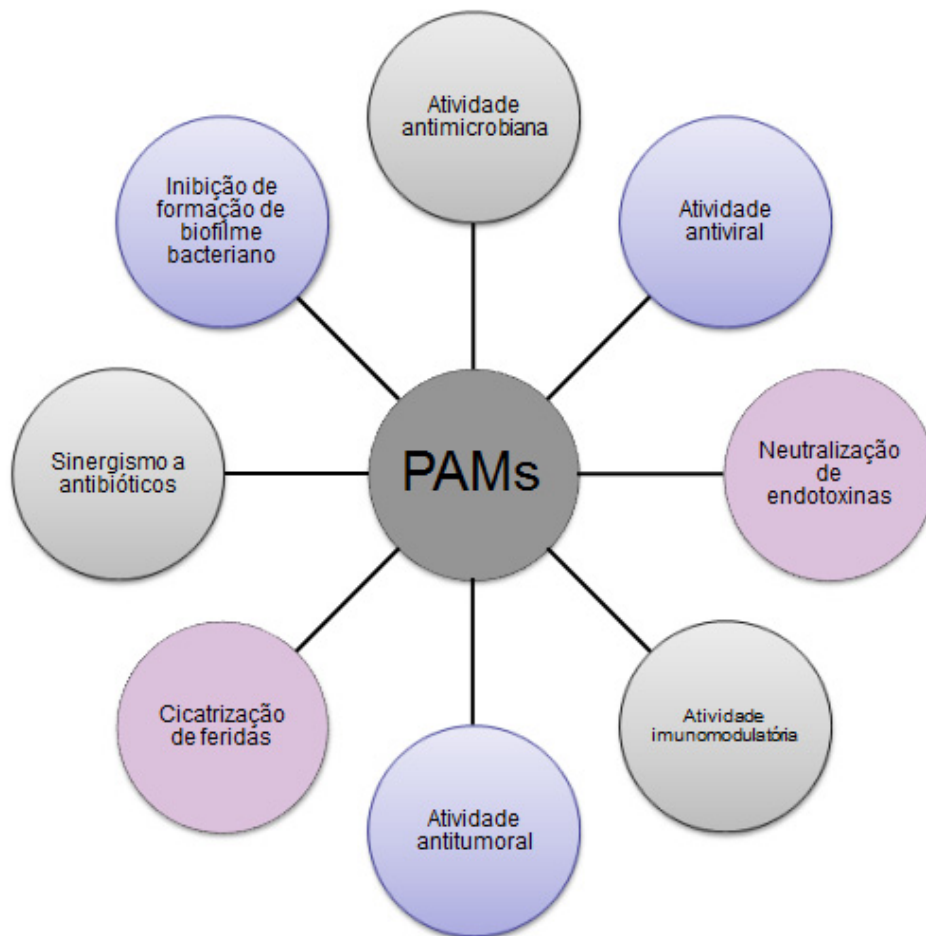


Figura 17. Esquema representativo do potencial terapêutico dos PAMs.

Estas propriedades, associadas com o amplo espectro de atividade e o curto tempo de contato requerido para induzir a morte apontam os PAMs como excelentes candidatos para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Alguns impedimentos potenciais poderiam restringir a aplicação de PAMs como agentes terapêuticos comerciais, tais como altos custos de produção e suscetibilidade a

degradação proteolítica. Contudo, estes peptídeos suportam modificações químicas extensivas, as quais podem aliviar alguns destes obstáculos (Meiller *et al.*, 2009).

Estratégias de aprimoramento para uso terapêutico de PAMs visam aumentar a estabilidade destas moléculas para evitar a ação de proteases acionadas pelo sistema imunológico, através de alteração na sequência de aminoácidos, redução do tamanho da molécula, ciclização *head-to-tail*, inserção em lipossomas e acoplamento de caudas de polietilenoglicol.

Avanços recentes em química de peptídeos, biologia molecular e genética tem melhorado as técnicas aplicadas em engenharia de peptídeos e proteínas. Substituição de aminoácidos, reposição de D-aminoácidos, modificações químicas, glicosilação e ciclização da cadeia principal são tecnologias que podem incrementar a potencialidade de peptídeos e proteínas (Lee, 2002). O design molecular e a alteração da estrutura e função de peptídeos/proteínas pela introdução de aminoácidos não usuais têm atraído interesse para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Nagao *et al.*, 2006).

Parte I: Purificação e caracterização do lipopeptídeo polycerradin

2. Experimental

2.1 Estimativa da massa molecular dos compostos bioativos

O extrato total (ET) produzido por *P. polymyxa* RNC-D foi concentrado em evaporador centrífugo (*speed-vac*); nesta etapa, tubos contendo 10 ml de extrato total tiveram seu volume reduzido para 1 ml. Para estimar a massa molecular das substâncias bioativas, o ET concentrado foi submetido à filtração em membranas de 10, 3 e 1 kDa. Volumes de 1,2 ml de ET foram adicionados aos dispositivos de filtração Amicon Ultra[®] (Millipore) e a centrifugação (4.629 g) foi mantida até que as frações retida e eluída atingissem o mesmo volume.

As frações foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 através do teste de difusão em ágar (CLSI, 2011), realizado em triplicata. As bactérias indicadoras Gram-positiva e Gram-negativa foram cultivadas por 16 h em caldo TSB a 37° C, 120 rpm. Após incubação, as células foram centrifugadas e as biomassas bacterianas ressuspensas em caldo Mueller-Hinton (MH). Os inóculos foram ajustados para 1×10^6 UFC/ml e alíquotas de 100 µl das suspensões bacterianas foram transferidas e semeadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton. Após a secagem da superfície, poços (orifícios) foram feitos no ágar com a utilização de uma pipeta Pasteur esterilizada. Então, volumes de 100 µl das frações retidas e eluídas nas membranas (ET>10kDa, ET<10kDa, ET>3kDa, ET<3kDa, ET>1kDa, ET<1kDa) foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas a 37 °C/18-24h. Os resultados foram expressos em mm de acordo com o halo de inibição.

2.2 Estabilidade bioquímica do extrato fermentado por *P. polymyxa* RNC-D

A natureza química das substâncias bioativas presentes no ET produzido por *P. polymyxa* RNC-D foi determinada através de tratamentos enzimáticos e subsequente avaliação da atividade antimicrobiana residual. Em 100 µl de ET concentrado foi adicionado 1 mg das enzimas: protease (tipo XVIII, 0,58 U/mg, Sigma, St Louis, USA), proteinase K (0,2 U/mg, Boehringer Ingelheim, Mannheim), pronase E (tipo XXV, 0,2 U/mg, Sigma, St Louis,

USA), pepsina proveniente de mucosa gástrica porcina (0,7 U/mg , Boehringer Ingelheim, Mannheim, Germany), tripsina (410 U/mg, Boehringer Ingelheim, Mannheim, Germany) e lipase (3,14 U/mg, Calbiochem, San Diego, California). As preparações foram incubadas a 37° C por 1 hora.

O teste de difusão em ágar, descrito anteriormente no item 2.1, foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana do ET submetido aos tratamentos enzimáticos. Volumes de 100 µl das preparações foram depositados em poços de placas contendo os microrganismos indicadores Gram-positivo e Gram-negativo previamente semeados. O ET concentrado sem tratamento foi utilizado como controle positivo; ao mesmo tempo, o meio de cultivo YPM adicionado das enzimas descritas anteriormente foi utilizado como controle negativo. As placas foram incubadas por 18-24 h para observação e mensuração das zonas de inibição.

2.3 Preparo do extrato lipopeptídico

O pH do ET concentrado foi ajustado nos valores de 3,0, 6,0 e 9,0 adicionando-se volumes necessários de soluções de HCl ou NaOH 5M. Nesta etapa objetivou-se verificar qual o valor de pH mais adequado para aquisição do extrato lipopeptídico (ELP), ou seja, em qual pH os lipopeptídeos concentravam-se mais na fase orgânica. Então, um sistema de duas fases (partição líquido-líquido) foi aplicado para obtenção dos ELPs seguindo-se a metodologia descrita por Folch *et al.* (1957). Neste sentido, para cada valor de pH, 4 ml de ET concentrado foram adicionados a 80 ml de clorofórmio/metanol (2:1 v/v); a mistura foi homogeneizada durante 3 min. Na sequência, 2 ml de água foram adicionados à mistura, a qual foi novamente mantida sob agitação constante (3 min). A mistura foi centrifugada (3.500 g/5 min) para separação das fases. A fase aquosa superior (FA) foi retirada e os resíduos de solventes orgânicos removidos em evaporador rotativo a vácuo.

A interface (emulsão) foi lavada três vezes com pequenos volumes de solução de metanol/água (1:1 v/v), lentamente e com auxílio de uma pipeta, de modo a não causar distúrbio na fase inferior. Resquícios da fase superior e o fluido de enxague foram removidos com uma pipeta. A extração foi realizada três vezes. A interface e fase orgânica inferior foram reunidas e denominada ELP. Imediatamente após as extrações, os solventes foram completamente removidos em *speed-vac* e as massas relativas aos ELPs foram quantificadas

(Figura 18). Para o teste de atividade biológica os ELPs foram ressuspensos em solução aquosa contendo 5% de dimetil sulfóxido (DMSO).

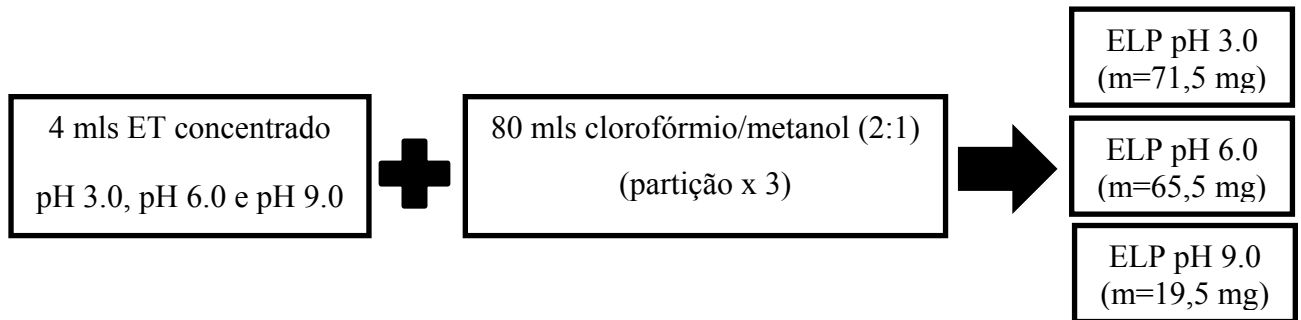


Figura 18. Esquema representativo do preparo dos ELPs

2.4 Avaliação do espectro antimicrobiano do ELP, ET e FA

O espectro de atividade antimicrobiana dos ELPs e do ET foram avaliados frente a um amplo número de microrganismos, quais sejam: bactérias Gram-negativas - *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pasteurella haemolytica* ATCC 33396, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715; bactérias Gram-positivas - *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* Wood 46, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813; fungos - *Candida albicans* ATCC 10231, *Proteus mirabilis* ATCC 29906. Bactérias e fungos foram obtidos da Coleção de Culturas do Departamento de Patologia e Microbiologia, Universidade de Montreal (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá).

Os ELPs foram solubilizados em 400 µl de solução aquosa contendo 5% DMSO, resultando em soluções com concentrações de 71,5 mg/ml (pH 3,0), 65,5 mg/ml (pH 6,0) e 19,5 mg/ml (pH 9,0). A partir destas soluções foram feitas diluições duplo-seriadas em água. O teste de difusão em ágar, descrito anteriormente na seção 2.1, foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana dos ELPs. Volumes de 10 µl das preparações foram depositados na superfície de placas com ágar MH contendo os microrganismos previamente semeados (*Spot test*). Solução aquosa contendo 5% de DMSO foi utilizada como controle negativo. As placas foram incubadas por 18-24 h para verificar as zonas de inibição, consideradas positivas

se a área ≥ 3 mm em diâmetro. Concomitante, volumes de 100 μ l de ET (nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62.5 e 31.25 μ g/ml) foram dispostos em orifícios das placas de ágar MH para quantificação da atividade biológica. A menor concentração que inibiu o crescimento microbiano (diâmetro de 5 mm) foi considerada como concentração inibitória mínima (CIM).

A FA, formada durante a obtenção do ELP, também foi verificada quanto à atividade contra os microrganismos indicadores Gram-positivo e Gram-negativo. No teste de difusão em ágar, alíquotas de 100 μ l foram dispostas nos poços. As placas foram incubadas por 18-24 h para observação e mensuração dos halos de inibição.

2.5 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Volumes de 10 μ l de ET pH 6.0, ELP pH 3.0, ELP pH 6.0 e ELP pH 9.0 foram depositados (no “formato de linhas”), com o auxílio de uma microseringa, na base de uma placa de camada delgada de sílica (HPTLC Silicagel 60 EMerck Science, Germany). As placas foram desenvolvidas usando-se a fase móvel clorofórmio/methanol/ácido acético (25:5:3 v/v/v) durante 2 horas (Minamino *et al.*, 2003). Então, aguardou-se até que as placas estivessem secas e as bandas foram visualizadas sob luz UV (λ 265 nm). Para verificar a natureza química das moléculas contidas no ET e ELPs, as placas foram borrifadas com solução de cloreto férrico de orcinol (Reagente Bial, Sigma) e aquecidas a 100 °C durante 10 min.

2.6 Concentração do(s) composto(s) bioativos presentes no ELP

A(s) molécula(s) bioativa(s) presente(s) no ELP foi(ram) selecionada(s) e concentrada(s) através de filtração em dispositivos com membranas de diâmetro de poro específicos. O ELP (pH 6,0) foi centrifugado em dispositivos Amicon Ultra[®] (Millipore) com membrana de 10 kDa e, sequencialmente, o volume eluído foi filtrado em membrana de 1 kDa (4629 g/20 min). A fração do ELP menor que 10 kDa e maior que 1 kDa foi selecionada e submetida a cromatografia líquida de fase reversa para isolamento e purificação dos compostos.

2.7 Cromatografia de fase reversa

As substâncias presentes no ELP pH 9.0 foram separadas e purificadas através de cromatografia de fase reversa. Para tal, em cada corrida cromatográfica um volume de 100 µl de 10 kDa > ELP >1kDa foi injetado na coluna MicroBondapack C18 (300 x 3,9 mm). As condições cromatográficas foram as seguintes: fases móveis - solução A (metanol/água 7:93 v/v) e solução B (metanol); gradiente de 0-40% solução B em 30 min. Sistema cromatográfico Waters Co composto por 2 bombas HPLC W515; injetor automático com refrigeração (W717); módulo de controle de temperatura da Waters Co; detector de PDA (W996). Condições de operação dos equipamentos: temperatura do injetor: 4° C; temperatura de separação: 28° C; vazão: 1.0 ml/min; eluição dos compostos monitorada a λ 254 nm (DAD 215- 600 nm).

Os picos de cinco injeções, coletados manualmente, foram reunidos de acordo com seu tempo de retenção e posteriormente concentrados em *speed-vac* para realização de bioensaio (*Spot test*) contra os microrganismos indicadores, conforme metodologia descrita anteriormente (item 2.1). Os picos foram ressuspensos em solução aquosa contendo 5% de DMSO e volumes de 10 µl foram dispostos sob a superfície das placas de Petri (Tupinamba *et al.*, 2008).

2.8 Análise por espectrometria de massas

O ELP e os compostos purificados através de cromatografia de fase reversa (item 2.7) foram analisados por espectrometria de massas. Nesta etapa, o espectrômetro de massas utilizado foi um MALDI-TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker). As frações liofilizadas foram ressuspensas em metanol e depositadas em quintuplicata (1 µl/*spot*) nas placas de MALDI. Após evaporação do solvente, adicionou-se sob cada amostra o volume de 1 µl de matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) (solução estoque 20 mg/ml). A ionização foi realizada em modo positivo, e a detecção em modo linear e modo *reflectron*. Foram aplicados 500 Hz de frequência de laser, 20 kV de voltagem de aceleração e λ 355 nm. A soma de dez espectros (25 shots/espectro) foi considerada na elaboração dos perfis de EM das amostras. A simulação da fórmula molecular dos compostos foi feita com o Smart Formula no software Flex Analysis. A análise por EM MALDI-TOF foram realizadas no Laboratório de

Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos).

As etapas utilizadas na purificação e caracterização do(s) lipopetídeo(s) biologicamente ativo(s) contra *S. aureus* e *E. coli* estão descritas na Figura 19.

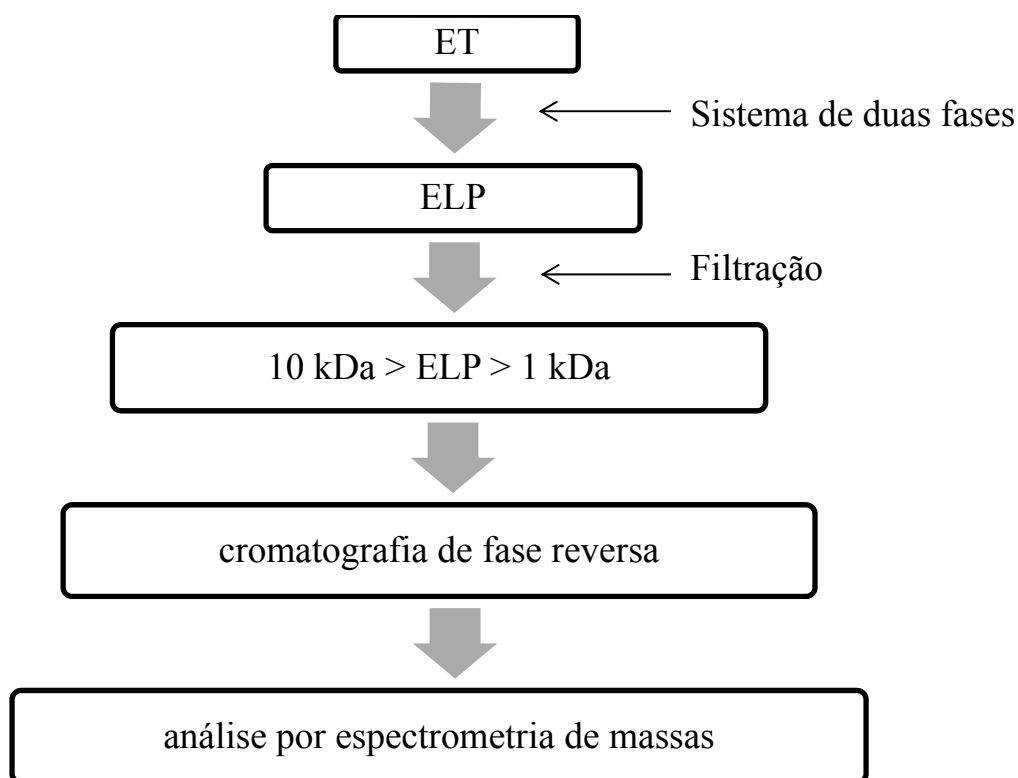


Figura 19. Representação esquemática da sequência utilizada para purificação e caracterização do lipopetídeo biologicamente ativo produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

3. Resultados e discussão

3.1 Massa molecular estimada e natureza química dos compostos bioativos

Os ETs foram filtrados em dispositivos constituídos por membranas com diâmetros de poro específicos para estimativa da massa molecular das substâncias bioativas. Foi detectada atividade biológica do ET contra *E. coli* nas frações retidas e eluídas nas membranas de 10, 3 e 1 kDa (Figura 20). Por conseguinte, ao menos um dos metabólitos bioativos contra a bactéria Gram-negativa tem massa molecular menor que 1 kDa; este fato não exclui a possibilidade de existência de compostos ativos com massas moleculares maiores, visto que as outras frações também apresentaram bioatividade. De modo similar, as frações eluídas em membranas de 10 e 3 kDa mostraram-se ativas contra *S. aureus*; entretanto, a fração eluída em membrana de 1 kDa apresentou atividade inibitória reduzida. Assim, existem moléculas antagonistas ao microrganismo Gram-positivo com massas moleculares estimadas em maior que 3 kDa (Figura 21) e menor que 1 kDa.

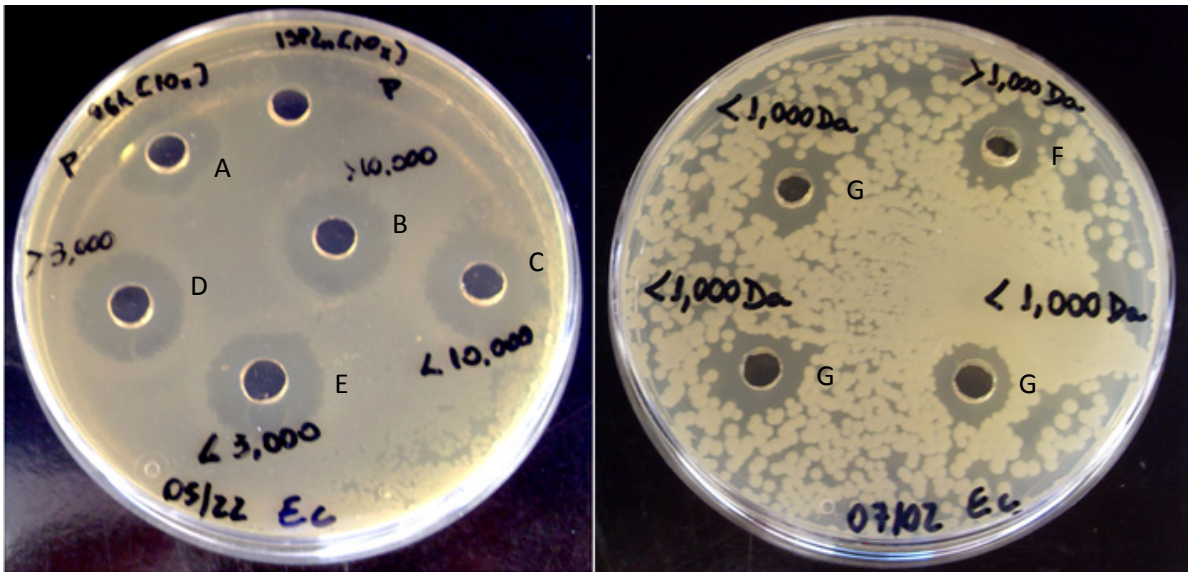


Figura 20. Estimativa da massa molecular dos compostos bioativos contra *E. coli* ATCC 25923. (A) ET (controle positivo); (B) ET > 10 kDa; (C) ET < 10 kDa; (D) ET > 3 kDa; (E) ET < 3 kDa; (F) ET > 1 kDa; (G) ET < 1 kDa.

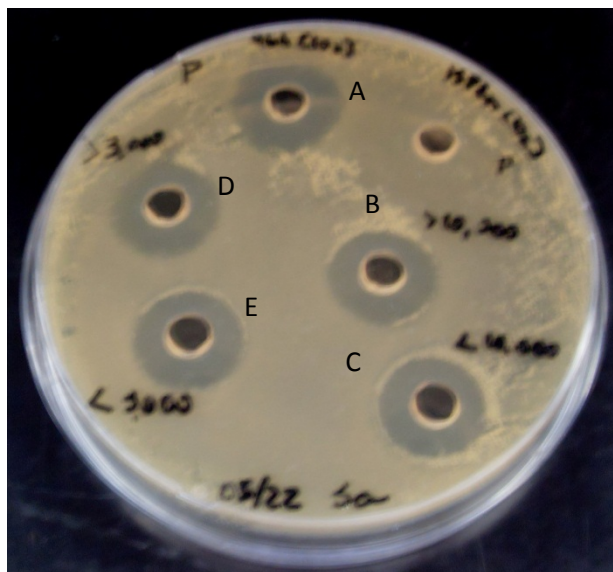


Figura 21. Estimativa da massa molecular dos compostos com atividade contra *S. aureus* ATCC 25922. (A) ET (controle positivo); (B) ET > 10 kDa; (C) ET < 10 kDa; (D) ET > 3 kDa; (E) ET < 3 kDa.

A natureza química dos compostos biologicamente ativos foi verificada através de ensaios enzimáticos, realizados no ET concentrado, e posterior teste de atividade antibacteriana residual. O ET manteve-se estável e ativo contra *E. coli* e *S. aureus* após tratamento com proteases (Tabela 1), ao mesmo tempo em que sua bioatividade residual foi reduzida após digestão com lipase (Tabela 1, Figuras 22 e 23).

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana do ET produzido por *P. polymyxa* RNC-D antes e após aplicação de tratamentos enzimáticos e filtração

Tratamento	Bioatividade contra	
	<i>E. coli</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 25922
nenhum (controle positivo)	+	+
Enzimático		
Protease (tipo XVIII)	+	+
Proteinase K	+	+
Pronase E (tipo XXV)	+	+
Pepsina	+	+
Tripsina	+	+
Lipase	±*	±*
Filtração		
ET < 10 kDa	+	+
ET < 3 kDa	+	+
ET < 1 kDa	+	±

*± indica redução parcial na bioatividade

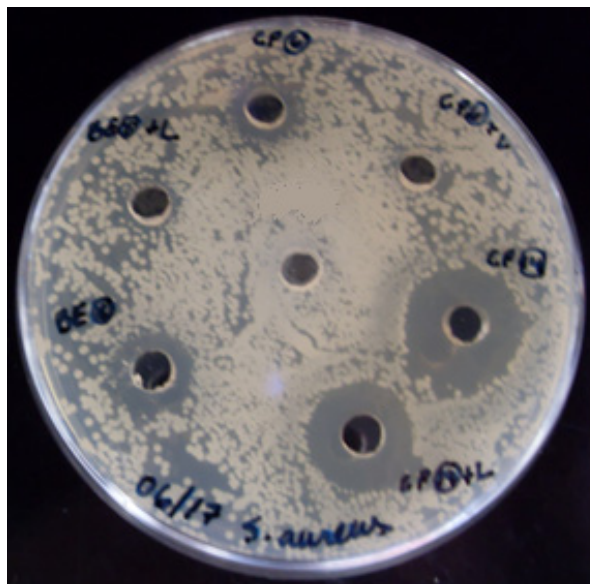


Figura 22. Redução na atividade antimicrobiana residual de diferentes ETs contra *S. aureus* após tratamento enzimático com lipase (L). Halos de inibição (em sentido horário, iniciando na parte inferior): ET(x) – 12 mm, ET(x)+L – 7 mm, ET(6) – 10 mm, ET(6)+L – 5 mm; ET(14) - 19 mm, ET(14)+L – 16 mm.

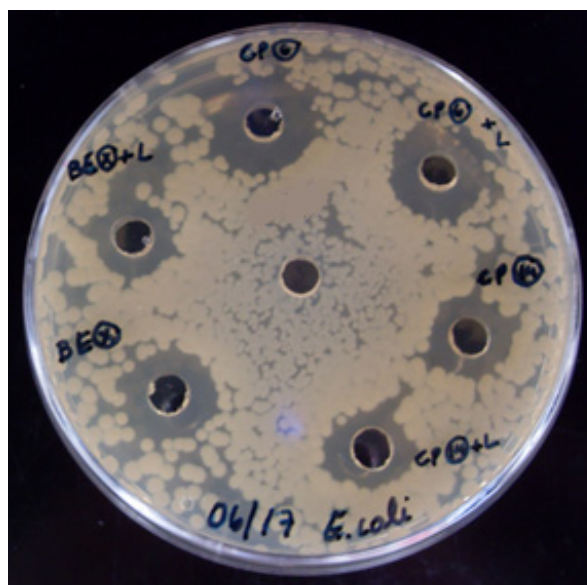


Figura 23. Redução na atividade antimicrobiana residual de diferentes ETs contra *E. coli* após tratamento enzimático com lipase. Halos de inibição (em sentido horário, iniciando na parte inferior): ET(x) – 15 mm, ET(x)+L – 13 mm, ET(6) – 17 mm, ET(6)+L – 16 mm; ET(14) - 13 mm, ET(14)+L – 12 mm.

De acordo com os resultados dos bioensaios, mostrados na Tabela 1 e Figuras 22 e 23, pode-se concluir que pelo menos um dos compostos bioativos presentes no ET é de natureza lipídica em sua composição. A redução na atividade antimicrobiana foi mais acentuada contra o microrganismo Gram-positivo; assim, pode-se inferir que a(s) molécula(s) com composição lipídica representa(m) o(s) componente(s) de maior potencial antagônico contra esta classe de microrganismos.

Compilando-se os dados sobre a estimativa da massa molecular e sobre a natureza química dos compostos (Tabela 1, Figuras 22 e 23), é possível afirmar que: (i) há pelo menos um composto de natureza lipídica (ou mista), bioativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; (ii) no ET existe pelo menos um composto, de massa molecular estimada em menor que 1 kDa, com atividade seletiva para bactérias Gram-negativas; (iii) há pelo menos uma molécula antibacteriana de natureza peptídica presente no ET produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

P. polymyxa P13, cepa isolada de linguiça fermentada, secreta um composto, denominado polixina, que inibe o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus*. Este composto antimicrobiano é efetivo contra diversos Gram-positivos e Gram-negativos incluindo deteriorantes de alimentos. Polixina, cuja massa molecular foi estimada em 10 kDa,

apresenta propriedades de bacteriocinas, tais como natureza proteínica (sensível a ação de proteinase K, pronase E e tripsina), insensibilidade a solventes orgânicos, estabilidade a elevação de temperatura (90 °C, 10 min) e pH ácido, mas instabilidade em condições alcalinas (Piuri *et al.*, 1998).

Extrato total produzido por *Paenibacillus polymyxa* HKA-15 mostrou intensa atividade antibacteriana contra as cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* CP-1-1 e M-5 (Mageshwaran *et al.*, 2011). A caracterização do extrato sugere natureza peptídica dos compostos bioativos, uma vez que há perda de bioatividade quando o extrato é tratado com pepsina (400 U/ml).

De acordo com Guo *et al.* (2012), *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE produz o lipopeptídeo *paenibacterin* (m/z 1.605,14) o qual é resistente ao tratamento com lipase, tripsina, lisozima e α -glicosidase. No presente estudo foi possível verificar a sensibilidade do ET frente ao tratamento com lipase, o que confronta com os dados apresentados por Guo *et al.* (2012), indicando a presença diferentes substâncias bioativas produzidas por *P. thiaminolyticus* OSY-SE e *P. polymyxa* RNC-D.

Em estudo realizado por He *et al.* (2007), o composto de massa molecular 2983,44 Da, produzido por *P. polymyxa* OSY-DF e denominado *paenibacillin* é responsável pela bioatividade contra microrganismos Gram-positivos (incluindo *S. aureus*). Tal composto mostrou perda parcial da bioatividade sob a ação de tripsina. Esta perda de bioatividade após tratamento enzimático não foi observada no presente estudo. Estes resultados podem explicar, provavelmente, que a substância bioativa isolada por He *et al.* (2007) é diferente daquela produzida por *P. polymyxa* RNC-D.

Resultados semelhantes aos apresentados neste estudo foram encontrados por Rosado e Seldin (1993); estes autores caracterizaram a substância produzida por *P. polymyxa* SCE2, cuja massa molecular foi estimada como menor de 3,5 kDa, como resistente a tratamento térmico (65° C, 2 horas) e diversas enzimas, incluindo proteases.

Em 2005, Svetoch *et al.* avaliaram a atividade anti-*Campylobacter* de três cepas de *P. polymyxa* originárias de ambientes de produção aviária. Neste estudo, os compostos bioativos foram purificados do meio de cultivo através de precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de troca iônica. As substâncias bioativas apresentaram sensibilidade à ação de proteases. As massas moleculares dos peptídeos foram estimadas em aproximadamente 3,5 kDa por eletroforese em gel de poliacrilamida. Em pesquisa complementar realizada por Stern

et al. (2005), o tratamento das aves com as bacteriocinas anteriormente descritas reduziu drasticamente a colonização intestinal por *Campylobacter jejuni*. Os autores ainda concluíram que a suplementação das aves com as bacteriocinas antes do abate representa um controle efetivo de *C. jejuni*, reduzindo a exposição deste patógeno a humanos.

3.2 ELP: etapa de partição e espectro de bioatividade

Com o objetivo de extrair a(s) molécula(s) de natureza lipídica (ou mista) do ET, para posterior isolamento e purificação, um sistema de duas fases foi aplicado (Figura 24). Na sequência, a atividade antimicrobiana do ET (controle positivo), FA e ELP (pH 3.0, pH 6.0 e pH 9.0) foi verificada contra *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados dos bioensaios podem ser visualizados nas Figuras 25 e 26.

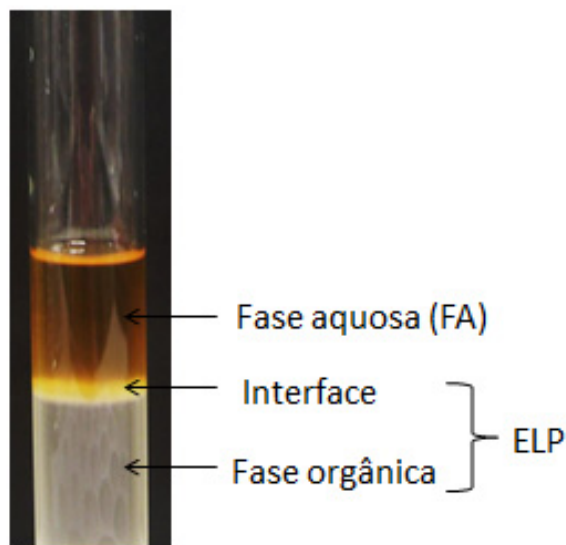


Figura 24. Sistema de duas fases utilizado para obtenção do ELP a partir do ET.

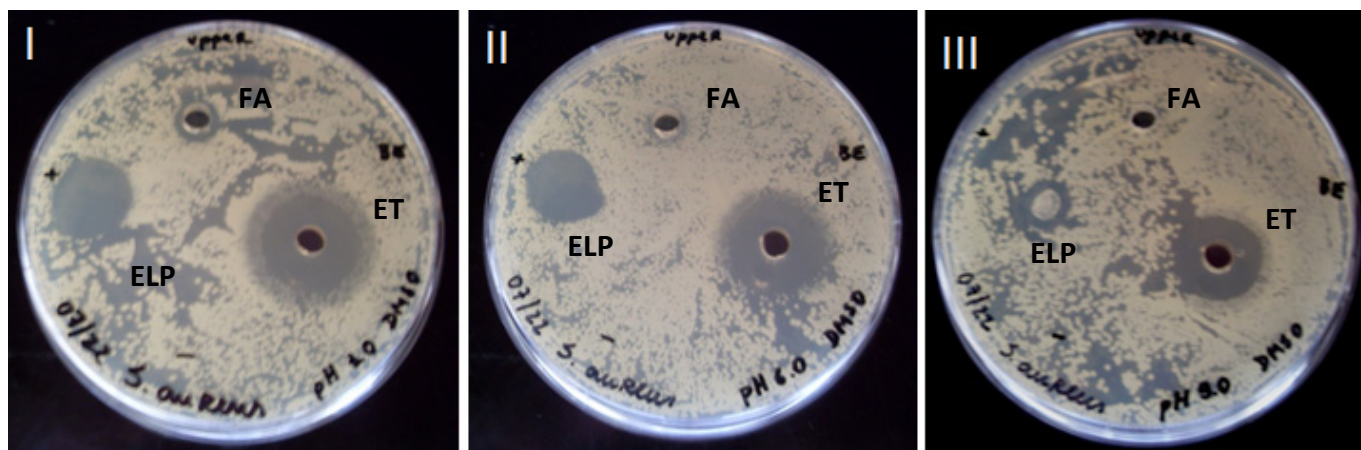


Figura 25. Atividade antimicrobiana do ET, FA e ELP em diferentes pHs contra *S. aureus*. Em I (pH 3.0): ET Ø 20mm, FA Ø 10 mm, e ELP Ø 17 mm; em II (pH 6.0): ET Ø 20 mm, FA Ø 7mm, ELP 16 mm; em III (pH 9.0): ET Ø 18 mm, FA negativo, ELP Ø 11mm.

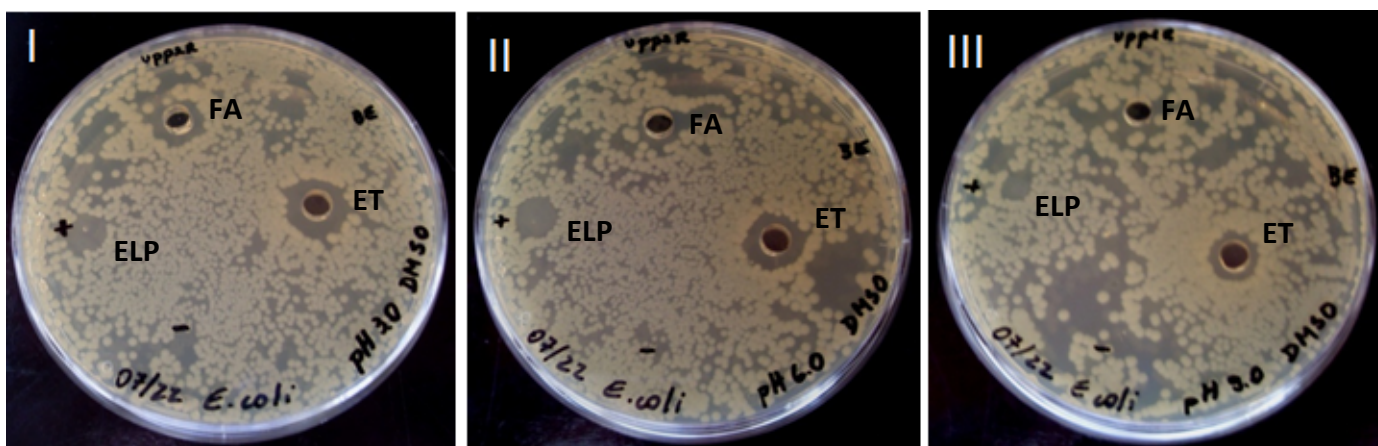


Figura 26. Atividade antimicrobiana do ET, FA e ELP em diferentes pHs contra *E. coli*. Em I (pH 3.0): ET Ø 12mm, FA Ø 11 mm, e ELP Ø 8 mm; em II (pH 6.0): ET Ø 12 mm, FA Ø 9 mm, ELP 8 mm; em III (pH 9.0): ET Ø 10 mm, FA negativo, ELP Ø 6 mm.

As Figuras 25 e 26 indicam que a alteração no pH dos ETs influenciou a separação dos compostos bioativos pela partição orgânica. Após a elevação do pH, as substâncias bioativas presentes no ET deslocaram-se para a fase orgânica, sendo que a FA (poço superior nas Figuras 25 e 26) e o ET (poço inferior direito nas Figuras 25 e 26) perderam gradativamente suas bioatividades.

O espectro de atividade antimicrobiana do ET e ELP (pH 3.0, pH 6.0 e pH 9.0) está plotado na Tabela 2. Todas as cepas testadas, exceto *Proteus mirabilis*, foram suscetíveis a ação de pelo menos um ELP. O ELP pH 9.0 apresentou maior potencial de atividade pois seu

menor valor de CIM (4,87 mg/ml) inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922. Considerando-se a inibição do mesmo microrganismo, foram necessários 71,50 mg/ml de ELP pH 3.0 e 16,37 mg/ml de ELP pH 6.0. Estes resultados, associados aos dados obtidos com o desenvolvimento das placas de CCD (Figura 27), indicam que o ELP pH 9.0 apresenta um maior grau de pureza de compostos biotivos – e, portanto, maior potencial antimicrobiano – quando comparado aos ELPs pH 3.0 e pH 6.0.

Tabela 2. Espectro antimicrobiano do ET e ELP (pH 3,0, pH 6,0 e pH 9,0) produzidos por *P. polymyxa* RNC-D

Reação de Gram e cepa	Bioatividade do			
	ET CIM(µg/ml)	ELP pH 3,0 CIM (mg/ml)	ELP pH 6,0 CIM (mg/ml)	ELP pH 9,0 CIM (mg/ml)
Bactérias Gram-negativas				
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	250	35,75	32,75	9,75
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	125	71,50	-	9,75
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	125	71,50	65,5	19,5
<i>Pasteurella haemolytica</i> ATCC 33396	125	71,50	65,5	19,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14207	250	35,75	32,75	9,75
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	250	71,50	65,5	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	250	35,75	65,5	19,5
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930	125	71,50	16,37	19,5
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	62,5	71,50	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	-	-	-	-
Bactérias Gram-positivas				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	500	35,75	32,75	9,75
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	125	35,75	32,75	9,75
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	125	71,50	16,37	4,87
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46	125	35,75	32,75	9,75
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	500	71,50	-	19,5
Fungos				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	250	71,50	65,5	19,5

(-) zona de inibição não observada;

Os valores de CIM do ET produzido por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D para bactérias Gram-negativas (250, 125 e 62.5 µg/ml) são inferiores aos obtidos em estudo conduzido por Mageshwaran *et al.* (2011), quais foram 1.700 e 1.520 µg/ml contra cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

Após a coloração das placas de CCD com o reagente Bial, os *spots* correspondentes ao ET pH 6.0, ELP pH 3.0 e ELP pH 6.0 revelaram-se violeta, apontando a presença de açúcares ou glicolípideos. Por outro lado, ELP pH 9.0 mostrou-se incolor subseqüente ao procedimento de coloração. Depois do desenvolvimento das placas, ET pH 6.0 e ELP pH 3.0 mostraram perfil de separação similar dos componentes, contrastando com o perfil demonstrado por ELP pH 6.0 e ELP pH 9.0 (Figura 27).

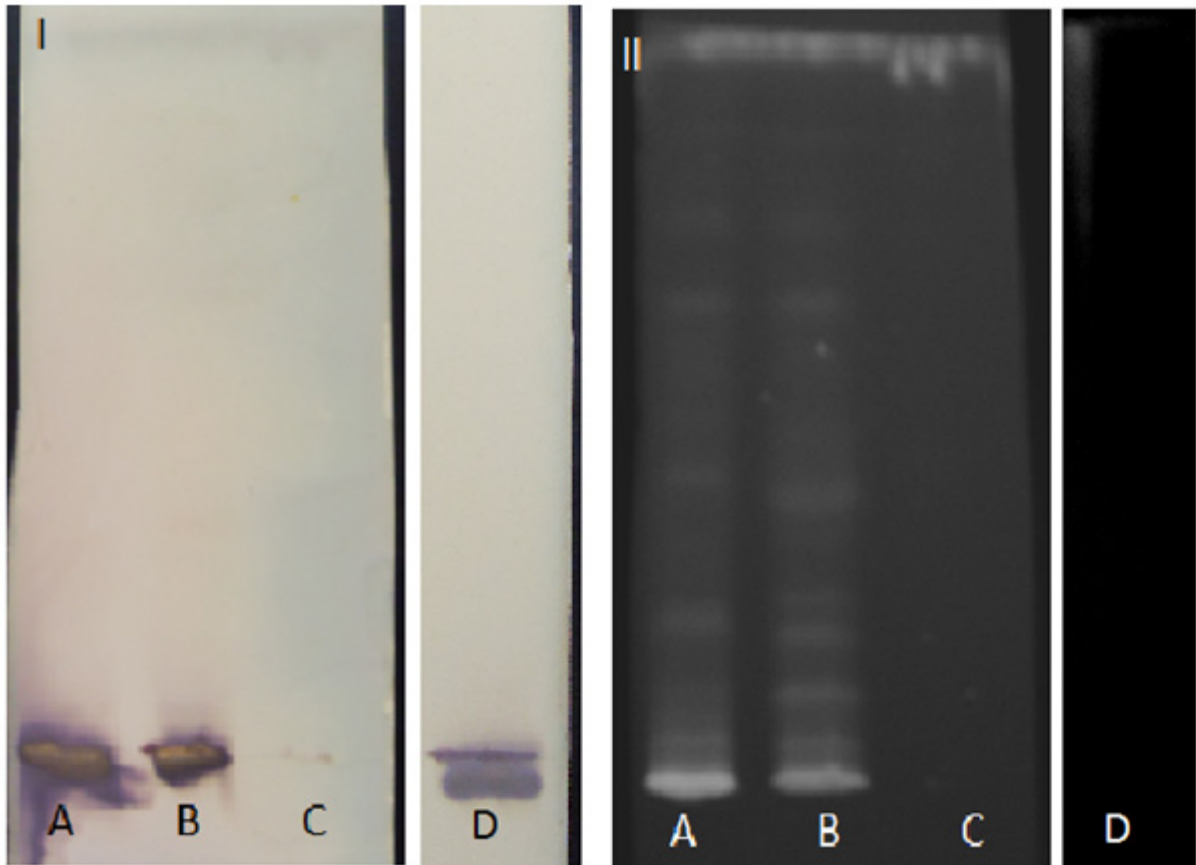


Figura 27. Em I: placa de CCD mostrando *spots* de ET pH 6.0 (A), ELP pH 3.0 (B), ELP pH 9.0 (C) e ELP pH 6.0 (D) corados com reagente de Bial (após desenvolvimento das placas). Em II: placa de CCD mostrando as bandas presentes em ET pH 6.0 (A), ELP pH 3.0 (B), ELP pH 9.0 (C) e ELP pH 6.0 (D) visualizada sob luz UV.

3.3 Purificação dos compostos presentes no ELP

O ELP foi submetido a filtração em dispositivos com membranas de MWCO e a fração bioativa maior ou igual a 1 kDa e menor que 10 kDa (Figura 28) teve seus compostos separados por cromatografia de fase reversa (Figura 29). O perfil cromatográfico revelou a presença de picos com tempos de retenção de 2,7 min, 4,1 min, 6,5 min e 10,4 min, que foram nomeados FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4, respectivamente. Os espectros de absorvância UV das frações podem ser visualizados nas Figuras 30, 31, 32, 33 e 34.

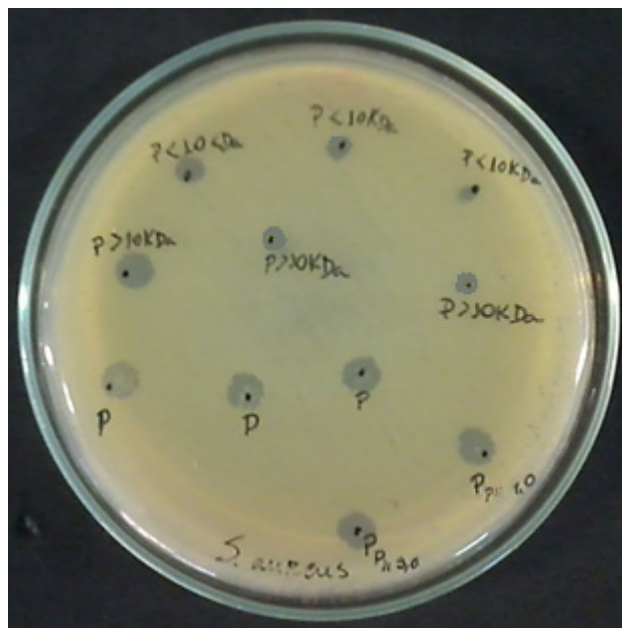


Figura 28. Atividade antimicrobiana do ELP (*spots* P), ELP ≥ 10 kDa (*spots* P>10 kDa) e ELP < 10 kDa (*spots* P<10 kDa) contra *S. aureus*.

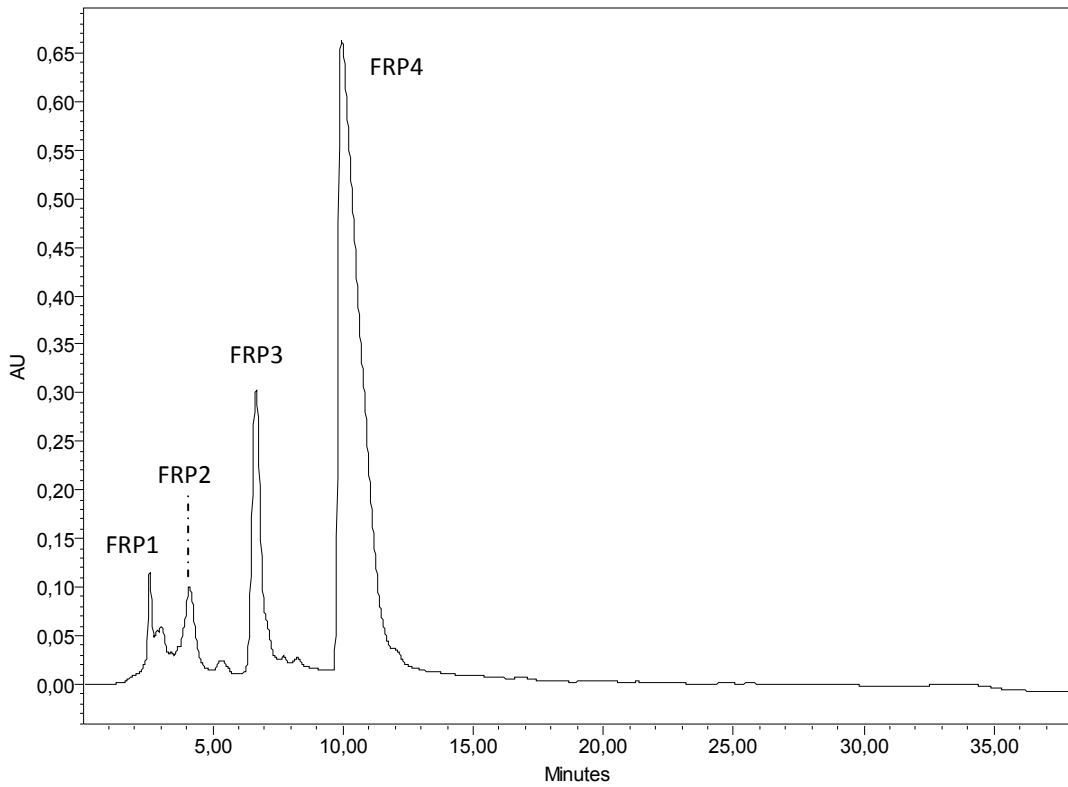


Figura 29. Cromatograma de 10 kDa > ELP > 1 kDa (cromatografia de fase reversa) com detecção a λ 254 nm, mostrando a presença dos picos FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4.

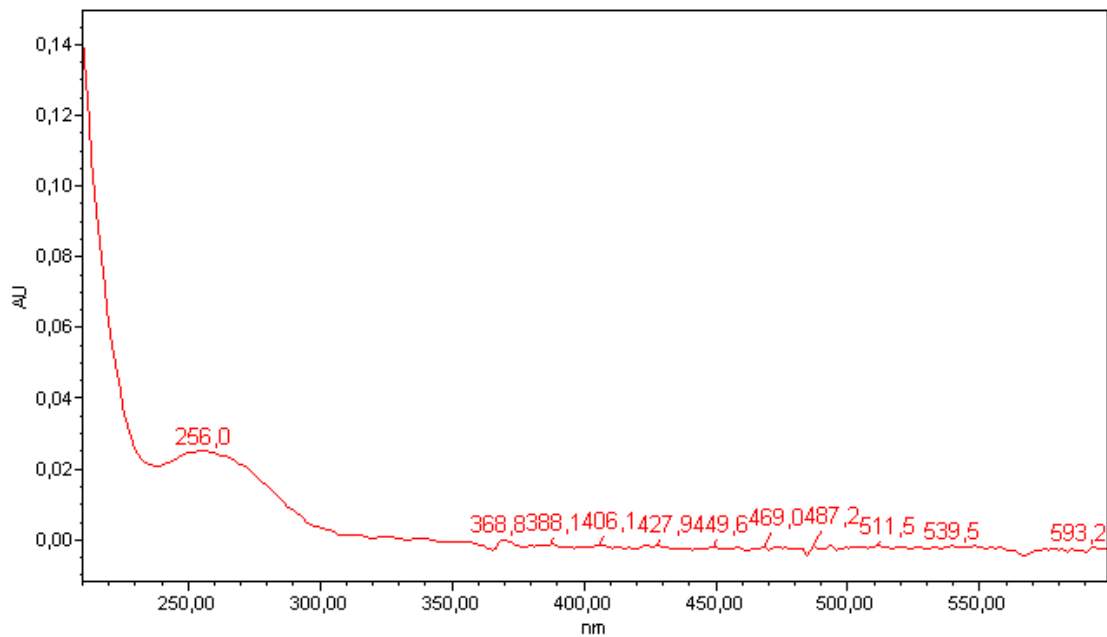


Figura 30. Espectro UV da FRP1(DAD 200 – 600 nm).

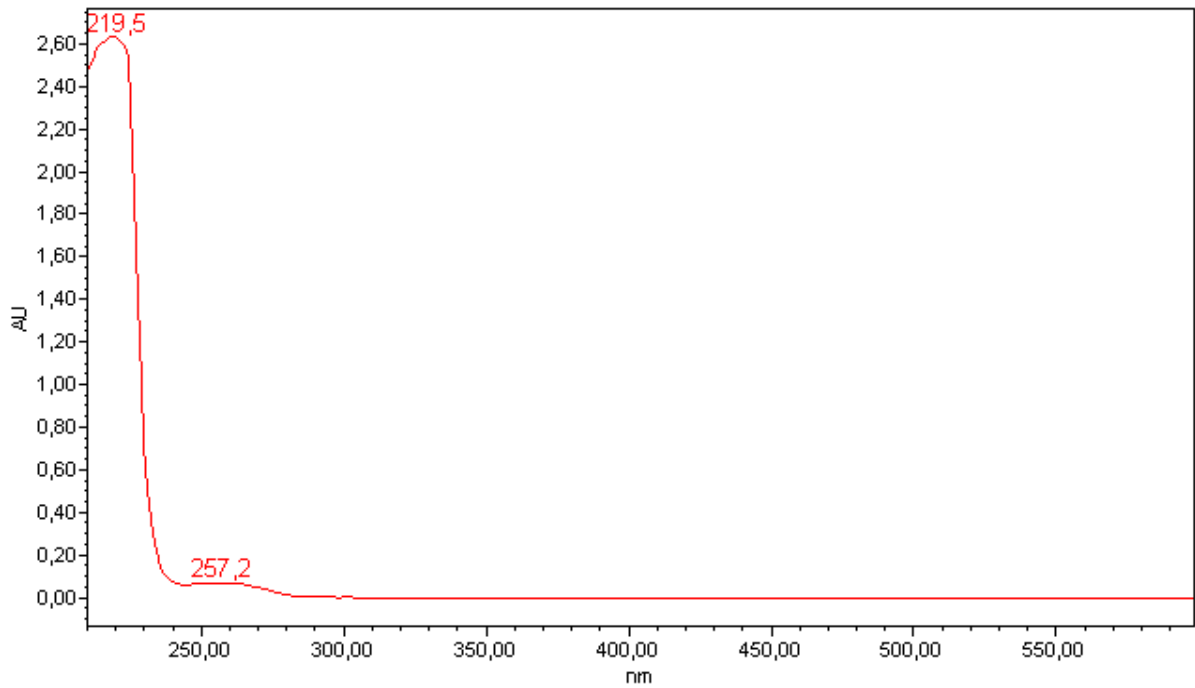


Figura 31. Espectro UV da FRP2 (DAD 200 – 600 nm).

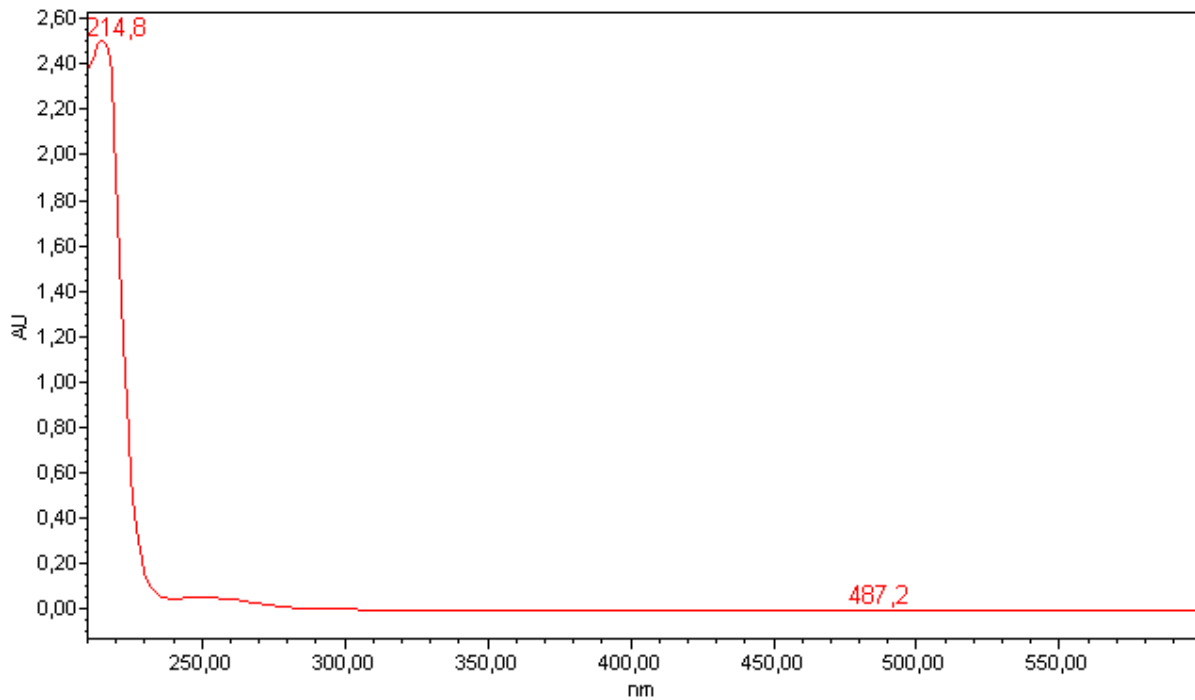


Figura 32. Espectro UV da FRP3 (DAD 200 – 600 nm).

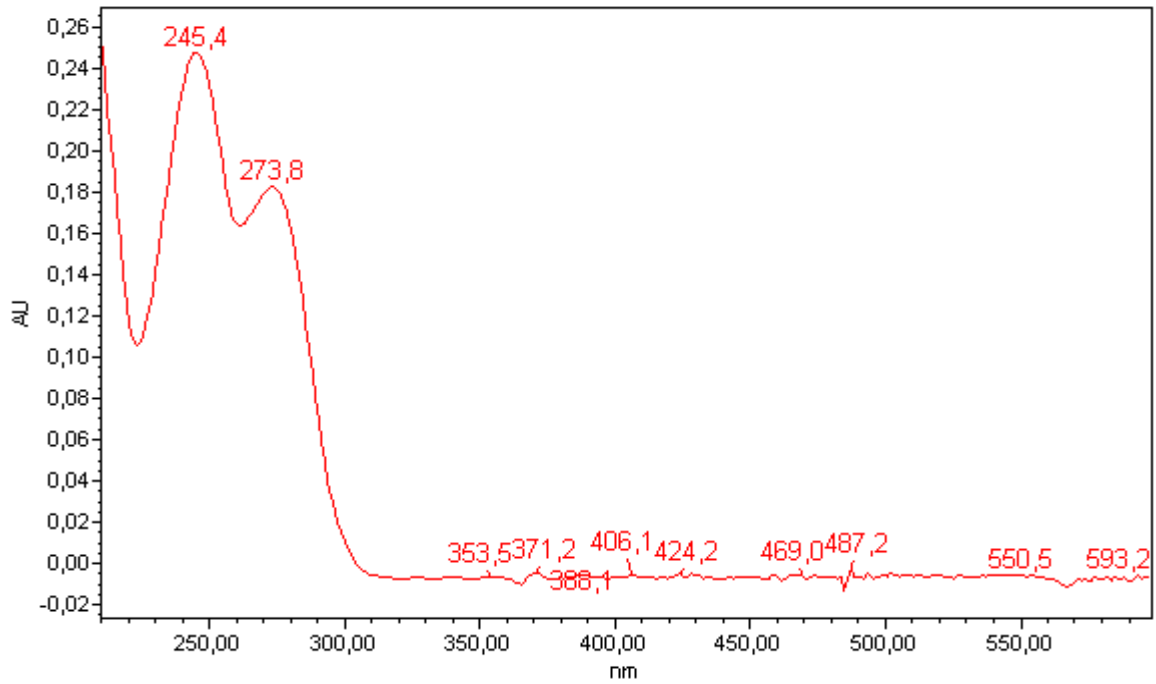


Figura 33. Espectro UV da FRP4 (DAD 200 – 600 nm).

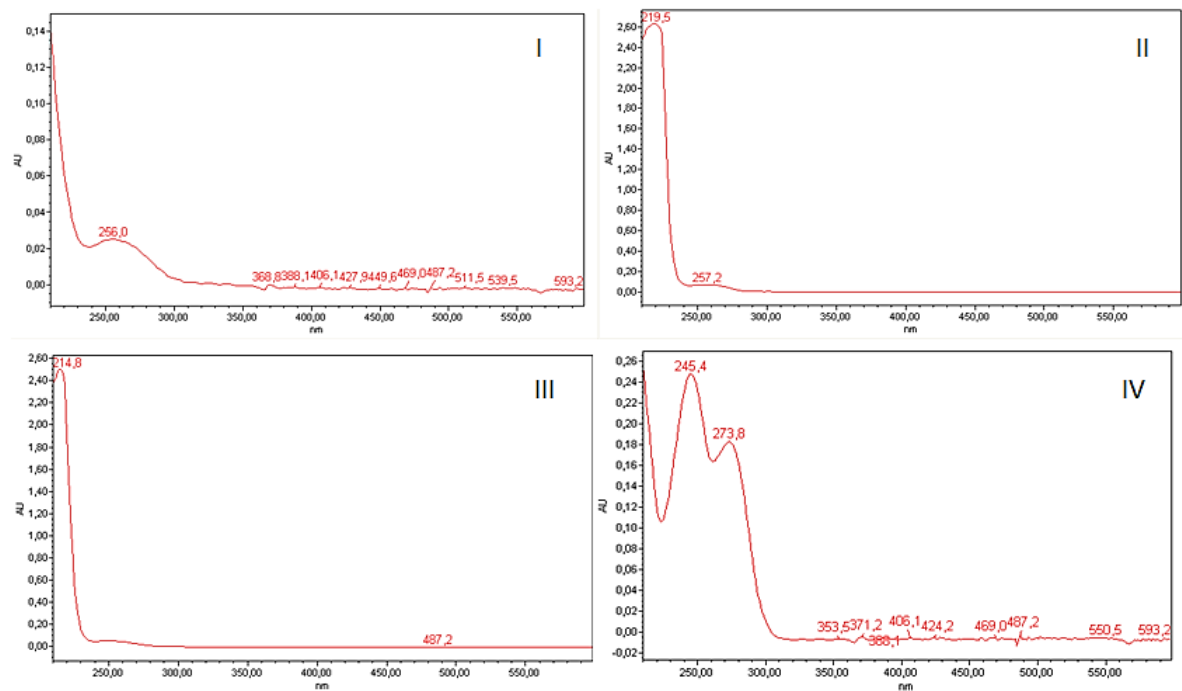


Figura 34. Comparação entre os espectros de absorvância UV de FRP1 (I), FRP2 (II), FRP3 (III), FRP4 (IV).

Os picos resolvidos por cromatografia de fase reversa apresentaram diferentes perfis de absorvância UV: FRP1 - $\lambda_{\text{máx}}$ 200 e λ_{min} 256 nm, FRP2 - $\lambda_{\text{máx}}$ 219,5 e λ_{min} 257,2 nm; FRP3 - $\lambda_{\text{máx}}$ 214,8 nm; FRP4 $\lambda_{\text{máx}}$ 254,4 e λ_{min} 273,8nm De acordo com estes resultados

pode-se inferir que o(s) composto(s) presente(s) em FRP4 são diferentes daqueles contidos em FRP1, FRP2 e FRP3. Embora o $\lambda_{\text{máx}}$ e λ_{min} de FRP1, FRP2 e FRP3 sejam distintos, os espectros de absorvância apresentam perfis semelhantes, principalmente FRP2 e FRP3.

O ensaio de bioatividade realizado com os componentes purificados por cromatografia de fase reversa revelou que a FRP4 apresentou atividade contra as bactérias Gram-positiva e Gram-negativa indicadoras. O(s) composto(s) presente neste pico foi(ram) submetido(s) à análise por EM.

3.4 Análise do lipopeptídeo polycerradin

Resultados da análise por espectrometria de massas MALDI-TOF (*full scan*) do ELP, FRP1, FRP2 e FRP3 estão demonstrados nas Figuras 35 a 38. A aplicação da técnica revelou a presença do íon com m/z 3376,459 Da (modo reflectron positivo) na amostra ELP.

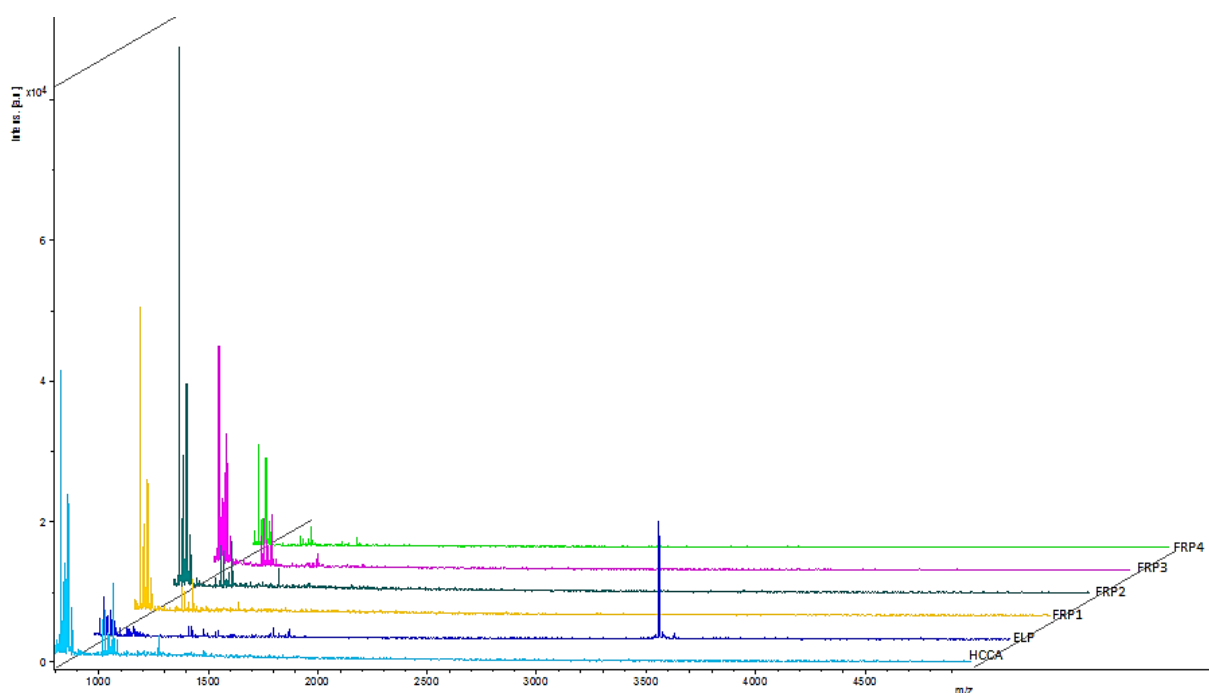


Figura 35. Espectros de massas *full scan* do ELP, HCCA (matriz), FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4 (m/z 900 – 4500).

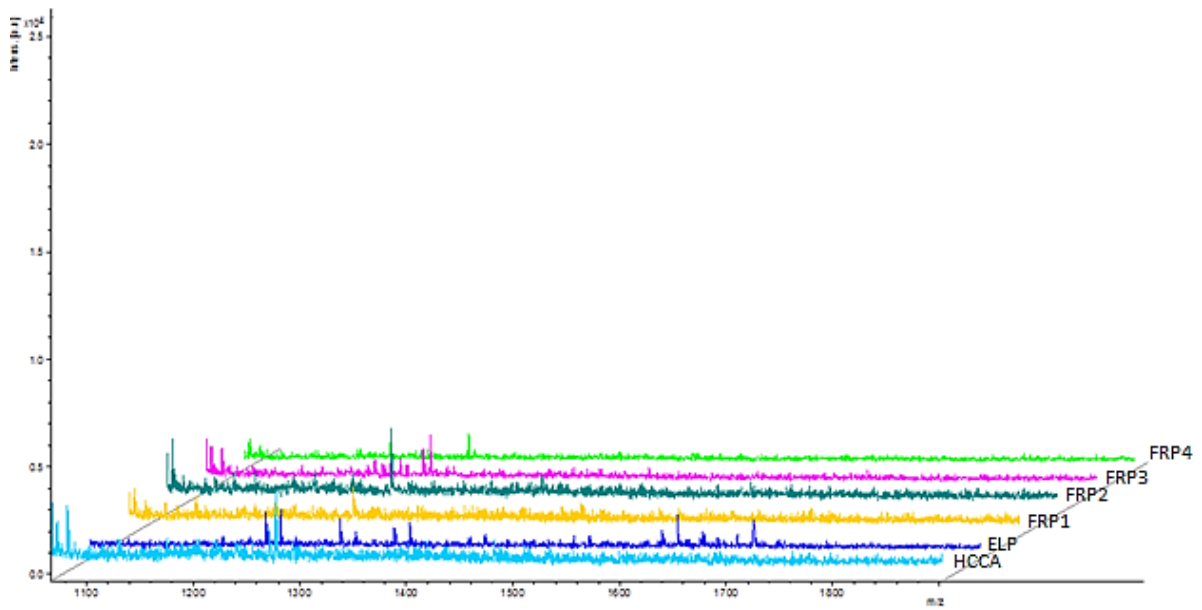


Figura 36. Espectros de massas *full scan* do ELP, HCCA (matriz), FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4 com *zoom* na região entre m/z 1000 – 1900.

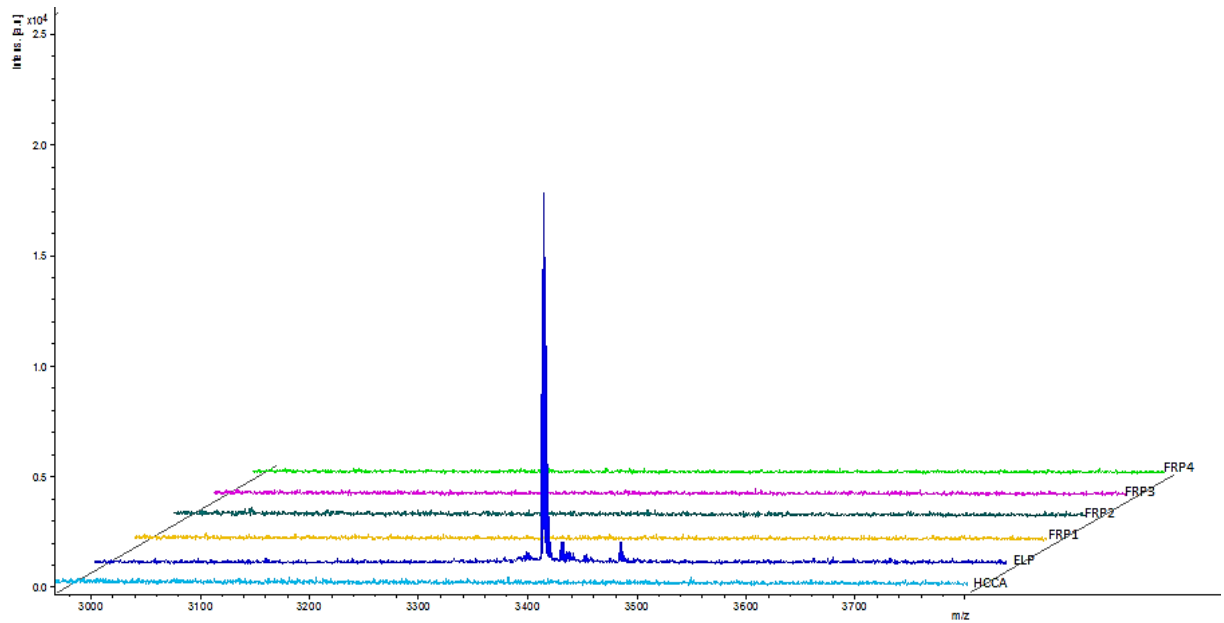


Figura 37. Espectros de massas *full scan* do ELP, HCCA (matriz), FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4 com *zoom* na região entre m/z 3000 – 3800.

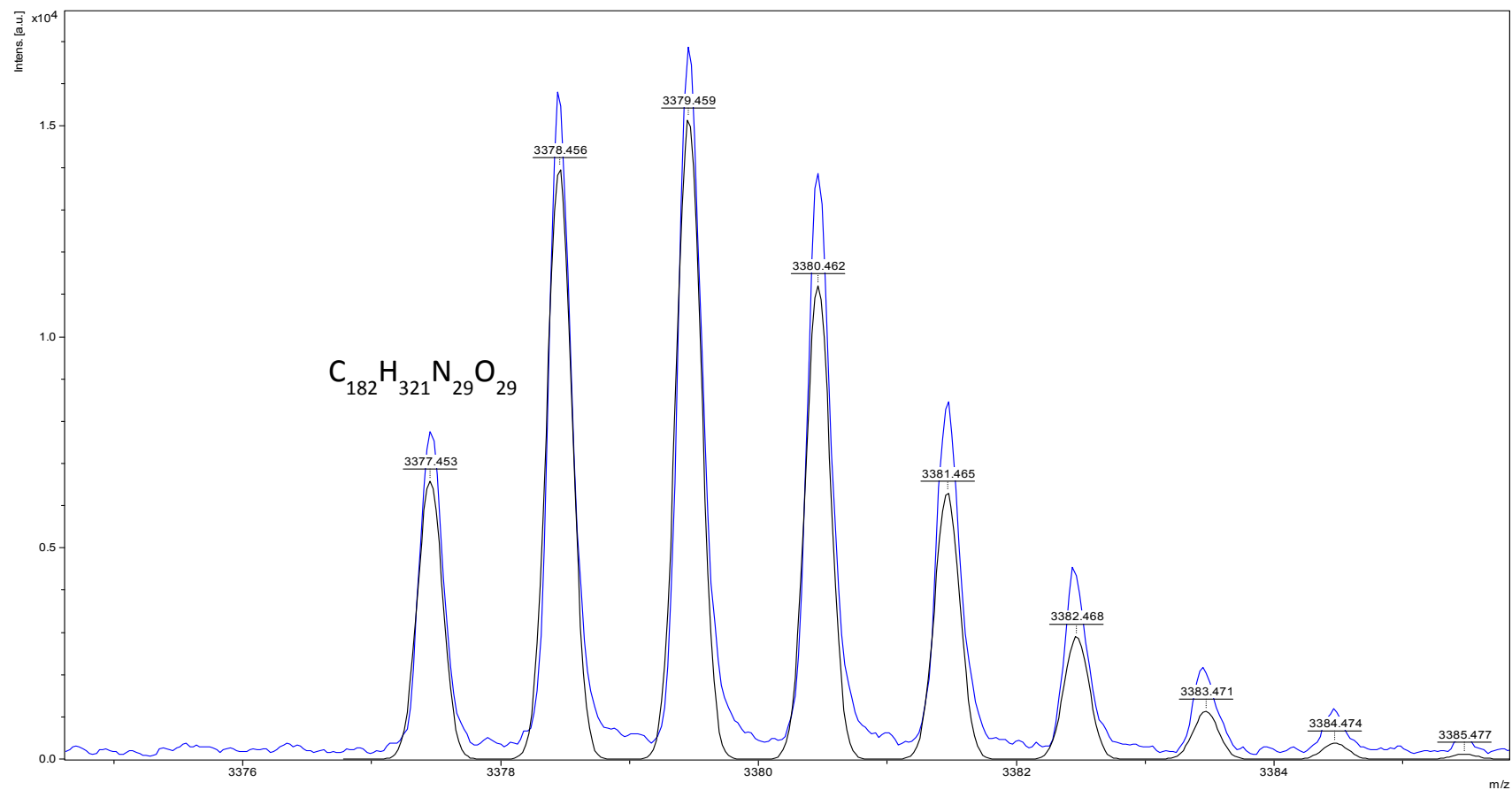


Figura 38. Espectro de massas do ELP com *zoom* na região de massas entre m/z 3375 – 3386. A fórmula $C_{182}H_{321}N_{29}O_{29}$ corresponde a simulação para o íon com m/z 3376,459 feita com o SmartFormula no software Flex Analysis

Nesta análise apenas o ELP apresentou picos significativos, o que fica muito claro nas Figuras 35 e 37. Nas outras amostras, os picos que são visualizados abaixo de m/z 1.300 são, em sua maioria, provenientes da matriz HCCA que foi utilizada em todas as amostras. Estes fato – ausência de picos abundantes – pode estar relacionada com a baixa concentração das moléculas nestas amostras ou ao seu baixo índice de ionização. Assim, serão necessárias análises suplementares (amostras mais concentradas e/ou outras condições de ionização) para determinar os componentes das demais bandas.

A Figura 38 foca o espectro de massas de ELP na região entre m/z 3.375 – 3.386, apresentando vários picos relativos ao perfil isotópico da molécula. O primeiro pico é composto apenas pelos isótopos de C^{12} H^1 O^{16} N^{14} ; os outros picos são formados por combinações de outros isótopos destes átomos. O primeiro pico aponta a m/z 3376,453 Da molécula mais abundante contida em ELP (o valor está acrescido de uma unidade pois a análise foi realizada em modo positivo). A simulação foi feita com o SmartFormula no software Flex Analysis resultou numa proposta de fórmula molecular $C_{182}H_{321}N_{29}O_{29}$.

Dois antimicrobianos foram isolados a partir de *P. polymyxa* OSY-DF: polimixina E1, a qual é ativa contra bactérias Gram-negativas, e um composto ativo contra Gram-positivos, cuja massa molecular é 2983,44 Da. Este PAM, denominado *paenibacillin*, é ativo contra bactérias deteriorantes de alimentos, incluindo *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. *Paenibacillin* possui propriedades físico-químicas de um agente antimicrobiano ideal em termos de solubilidade em água, resistência térmica, e estabilidade frente aos tratamentos ácido-alcalino (pH 2,0 – 9,0). O peptídeo foi caracterizado como um novo lantibiótico (He *et al.*, 2007). Com base na massa molecular e no espectro de atividade, pode-se concluir que o lipopeptídeo descrito neste estudo é diferente daquele relatado por He *et al.* (2007).

A cepa *P. polymyxa* P13 secreta a uma proteína denominada polixina, cuja massa molecular foi estimada em 10 kDa (Piuri *et al.*, 1998). Este composto tem propriedade bactericida contra Gram-positivos, e bacteriostática contra Gram-negativos.

A produção de bacteriocinas por cepas de *P. polymyxa* isoladas de intestino de frangos foi descrita por Svetoch *et al.* (2005). As bacteriocinas são ativas contra *Campylobacter jejuni* e as massas moleculares, bem como a sequência de aminoácidos,

foram determinadas por EM MALDI-TOF como 3214 Da (composto SRCAM 37) e 3864 Da (SRCAM 602).

Considerando-se os resultados aqui apresentados, bem como os dados da literatura, pode-se concluir que a molécula com m/z 3376,453 Da, com espectro de atividade que abrange bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungo, e cuja bioatividade é reduzida sob tratamento com lipase, representa um novo lipopeptídeo e foi denominado *polycerradin*. Estudos complementares serão necessários para determinar a sequência de aminoácidos (sequenciamento do N-terminal, fragmentação por CID – *collision induced dissociation*, e RMN – ressonância magnética nuclear), bem como a presença e estrutura de grupamento lipídico associado.

4. Conclusões do Capítulo 2-Parte I

A massa molecular dos compostos bioativos produzidos por *P. polymyxa* RNC-D foi estimada como menor que 1 kDa (contra bactérias Gram-negativas) e maior que 1 kDa (contra bactérias Gram-positivas). A redução na bioatividade da fração eluída em membrana de 1 kDa indica que também existem compostos menores que 1 kDa ativos contra *S. aureus*. Devido à redução na atividade biológica do ET após tratamento enzimático com lipase, conclui-se que uma das moléculas bioativas possui natureza lipídica ou mista. Ao mesmo tempo, a não redução na atividade após submissão do ET à ação de proteases sugere a presença de compostos peptídicos ativos. O ELP, extraído do ET pelo sistema de duas fases, apresentou amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo avaliados. Os ELPs, quando obtidos de ETs cujos pHs foram ajustados em diferentes valores (3.0, 6.0 e 9.0), apresentaram distintos perfis cromatográficos após o desenvolvimento de placas de CCD. Os ELPs pH 6.0 e 9.0 demonstraram semelhante perfil de separação cromatográfica, embora a subsequente coloração do ELP pH 6.0 tenha indicado a presença de açúcares ou glicolipídeos, fato que não ocorreu com o ELP pH 9.0. Esta indicação, associada ao menor valor de CIM do ELP pH 9.0 – quando comparado a CIM dos outros ELPs – apontam para um maior grau de pureza deste ELP, o qual foi utilizado para etapas posteriores de purificação. A submissão do ELP à cromatografia de fase reversa resultou na separação dos compostos em quatro picos nomeados FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4. O resultado do bioensaio demonstrou que FRP4 inibiu *E. coli* e *S. aureus*. As bandas eluídas por cromatografia de fase reversa, bem como ELP, foram então analisadas por EM. A aplicação desta técnica revelou a presença de um íon com m/z 3376,459 Da, cuja fórmula molecular proposta foi $C_{182}H_{321}N_{29}O_{29}$. Este estudo relata pela primeira vez este composto, um lipopeptídeo que foi denominado polycerradin, cujo espectro de atividade biológica abrange bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo.

Parte II: Purificação e caracterização do PAM PpRNCD

2. Experimental

2.1 *Fracionamento da FA*

A FA, obtida após aplicação do ET ao sistema de duas fases (conforme descrito no item 2.3 da Parte I), foi submetida à cromatografia de troca iônica, uma vez que tal fração apresentou bioatividade contra *E. coli* (Figura 40).

O equipamento cromatográfico foi composto pelo sistema Äkta Purifier10 (GE Healthcare), ao qual foi acoplada a coluna Mono Q (HR 5/5) de 1 ml de volume (Pharmacia). As condições cromatográficas adotadas foram as seguintes: fases móveis 20 mM TRIS HCl, pH 7.5 (tampão A) e 20 mM TRIS HCl + 1M NaCl, pH 7,5 (tampão B), com um fluxo de 0,5 ml/min. O volume injetado foi de 500 µl, sendo constituído por 250 µl de tampão A + 250 µl de FA. As amostras foram eluídas na coluna sob o gradiente linear de 0 a 100% de tampão B, durante 30 minutos. A eluição foi monitorada em λ 214 nm e as frações, coletadas manualmente, foram liofilizadas em *speed-vac* e ressuspendidas em 100 µl de água destilada para o ensaio de atividade antimicrobiana (difusão em ágar) contra a bactéria indicadora *E. coli*.

2.2 *CL-EM dos compostos fracionados por cromatografia de troca iônica*

As frações eluídas em cromatografia de troca iônica foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM). As amostras foram analisadas no Laboratório de Espectrometria de Massas e Química Médica da Universidade de Montreal (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá).

O sistema de CLAE consistiu nas bombas Thermo Surveyor e Thermo Surveyor MS (San Jose, CA, USA). O espectrômetro de massas usado foi Thermo LCQ Advantage (San Jose, CA, USA). Os dados foram adquiridos em computador Dell Optiplex (Round Rock, TX, USA) equipado com sistema de operação Windows XP Professional. A aquisição e análises foram realizadas usando X Calibur 1.4 (San Jose, CA, USA).

O gradiente da fase móvel foi usado com uma coluna Thermo Biobasic C₈ (10 x 1 mm) com tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel inicial consistiu de acetonitrila e 0.2% de ácido fórmico em água numa proporção de 5:95, respectivamente, a qual foi mantida de 0 a 2 minutos. No período de 2 a 10 minutos o gradiente foi crescente até a proporção de 70:30 e mantido por 4 minutos. A composição da fase móvel foi revertida – considerando-se a proporção inicial – e a coluna reequilibrada durante 5 minutos, totalizando 19 minutos de corrida. O fluxo foi de 55 µl/min.

O espectrômetro de massas foi acoplado ao sistema de CLAE usando ionização por *spray* de elétrons em modo íon-positivo (ESI+). O revestimento de gás foi regulado para 5 unidades e o eletrodo de ESI fixo em 4 kV. A temperatura do capilar foi ajustada para 300° C e a voltagem capilar para 6 V. O espectrômetro de massas foi operado em modo *full scan* abrangendo a escala m/z de 300 – 2.000 Da; o tempo de injeção máximo foi de 300 ms.

2.3 Espectro de bioatividade do(s) componente(s) presente(s) na fração TI-1

No total, 19 corridas cromatográficas foram realizadas e as frações TI-1, coletadas manualmente, foram reunidas e o volume liofilizado em *speed vac*. Teste de difusão em ágar, descrito anteriormente, foi utilizado para avaliar o espectro de atividade antimicrobiana do(s) componente(s) presente(s) na fração TI-1. A massa proveniente das corridas cromatográficas foi ressuspensa em tampão A (descrita no item 2.1, Parte II) resultando numa solução 215,5 µg/ml. Volumes de 100 µl foram colocados em poços de placas de Petri previamente semeadas com bactérias e fungo. O diâmetro dos halos de inibição foi medido após 24 h de incubação a 37° C e expresso em mm.

A atividade antimicrobiana da fração TI-1 foi verificada frente aos seguintes microrganismos: bactérias Gram-negativas -*Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pasteurella haemolytica* ATCC 33396, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715; bactérias Gram-positivas - *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313,

Staphylococcus aureus ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* Wood 46, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813; fungo - *Candida albicans* ATCC 10231. Bactérias e fungos foram obtidos da Coleção de Culturas do Departamento de Patologia e Microbiologia, Universidade de Montreal (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá).

2.4 Purificação dos metabólitos presentes na fração TI-1 e bioensaio

A fração TI-1 foi desalinizada em coluna HiTrap Desalting 5 ml (GE Healthcare). Um volume de 500 µl de amostra foi injetado, o qual foi eluído em tampão água a um fluxo 0,1 ml/min, com monitoramento a λ 280 nm. Sequencialmente, a amostra desalinizada foi concentrada em *speed-vac* e submetida à cromatografia de fase reversa.

Nesta etapa o equipamento utilizado foi um cromatógrafo LC 1500 (Jasco) A fase estacionária consistiu na coluna C₁₈ EC (250 x 4,6 mm, Nucleosil) com diâmetro de poro 120 Å e tamanho de partículas 5µm. As fases móveis foram água + 0,1% TFA (solução A) e acetonitrila + 0,1% TFA (solução B). A eluição ocorreu sob a forma de gradiente linear (0 a 100% de B em 30 minutos) a um fluxo de 1,0 ml/min e detecção em λ 214 nm (DAD 200 – 280 nm). A cada injeção a amostra foi composta de 100 µl da fração TI-1 desalinizada (Liu *et al.*, 2004 – adaptado).

Os picos provenientes das corridas cromatográficas foram coletados manualmente, concentrados em *speed vac*, ressuspensos em água esterilizada e bioensaiados (*spot test*) contra *E. coli*. A metodologia utilizada no preparo do bioensaio foi anteriormente descrita nas seções 2.1 e 2.3 da Parte I.

A substância presente no pico TI-1/FR-1 que apresentou bioatividade foi submetida a sequenciamento.

2.5 Sequenciamento da substância presente em TI-1/FR-1

No preparo das amostras para sequenciamento foram utilizadas três FAs distintas, as quais foram preparadas com o uso de ETs provenientes de três cultivos de *P. polymyxa* RNC-D independentes.

As amostras contendo o pico TI-1/FR-1, proveniente de cromatografia de fase reversa, foram ressuspensas em 30 µl de solução aquosa contendo 0,1% TFA e adsorvidas em filtro de fibra de vidro. A sequência do N-terminal foi determinada em sete ciclos através do sequenciador automático de proteínas Procise (Applied Biosystems). Este sequenciamento foi realizado no Laboratório de Espectrometria de Massas, Unidade de Serviços Analíticos, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Portugal. A Figura 38 apresenta as etapas utilizadas na purificação do peptídeo biologicamente ativo produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

2.6 Análise por MS/MS

Para complementar os resultados obtidos pela determinação do N-terminal, a estrutura primária do peptídeo foi investigada por meio de EM *tandem*. Para tanto, foi utilizado um instrumento LTQ Orbitrap Velos ETD (ThermoFisher Scientific) interfaceado com um cromatógrafo EasyLC (Proxeon), ambos controlados pelo software Thermo Xcalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific). Condições cromatográficas: coluna ReproSil-Pur C₁₈-AQ (150 x 4 mm) (Dr Maisch GmbH); solvente A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%), solvente B (acetonitrila/água 9:1 + ácido fórmico 0,1%), gradient linear de 0 – 30% de solução B em 60 minutos, fluxo de 0,3 µl/min. Fonte de nanoeletronebulização (Proxeon) operada com voltagem de 2,3 kV e temperatura de 250°C. Os espectros de MS e MS/MS foram visualizados e deconvoluídos por meio do *software* AMDIS versão 2.66, sendo que a interpretação foi feita manualmente.

A Figura 38 apresenta as etapas utilizadas na purificação do peptídeo biologicamente ativo produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

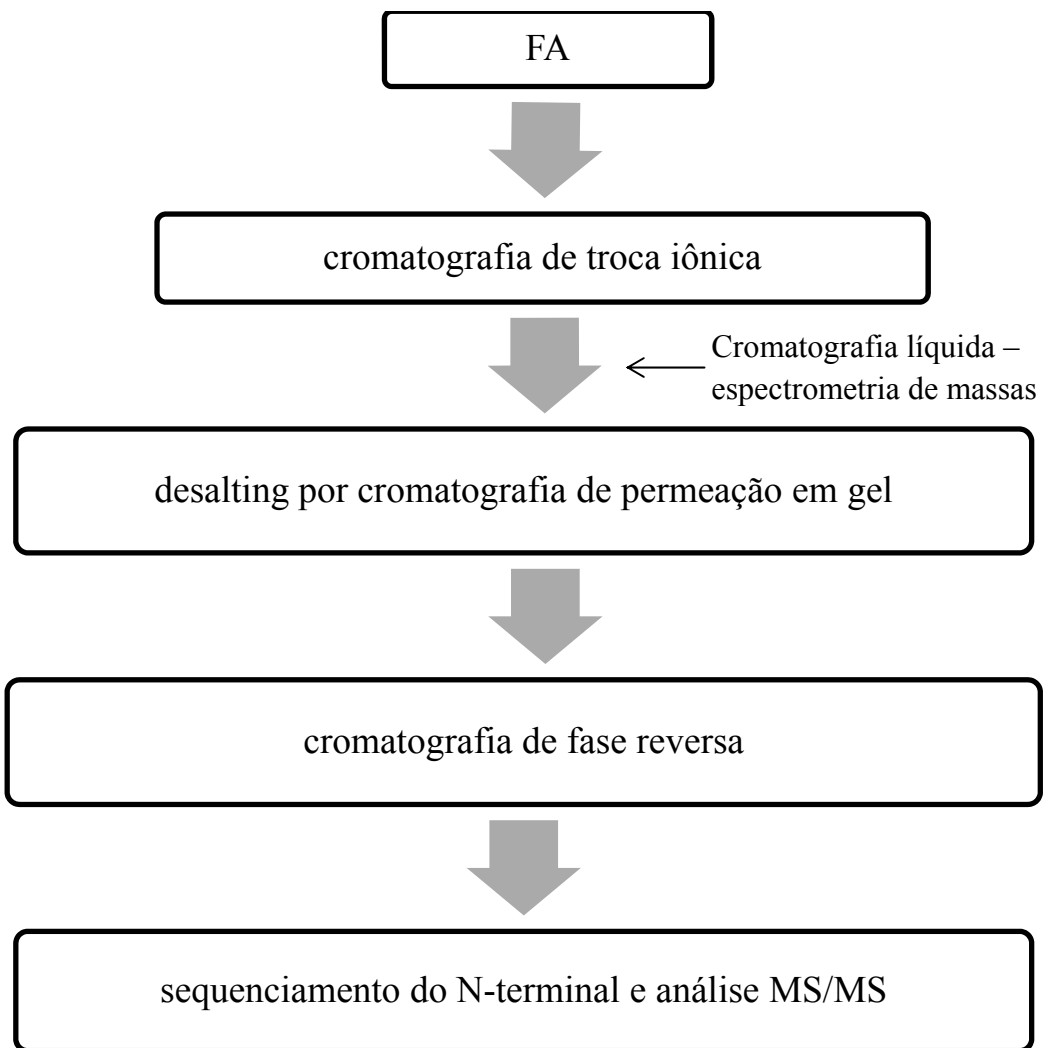


Figura 39. Representação esquemática da sequência utilizada para purificação e caracterização do peptídeo biologicamente ativo produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

3. Resultados e discussão

3.1 FA: perfil cromatográfico e identificação de seus compostos bioativos

A FA, obtida após aplicação do ET ao sistema de duas fases (conforme descrito no item 2.3 da Parte I), apresentou bioatividade contra *E. coli* (Figura 40) e foi submetida à cromatografia de troca iônica. Frações com TR 6,6 min, TR 7,2 min, TR 8,4 min, TR 8,7 min, TR 9,9 min, TR 10,8 min foram denominadas TI-1, TI-2, TI-3, TI-4, TI-5 e TI-6, respectivamente. O perfil cromatográfico obtido está demonstrado na Figura 41.



Figura 40. Teste de difusão em ágar demonstrando a bioatividade do ET (*spot* inferior à direita) e da FA (*spot* superior) contra *E. coli*

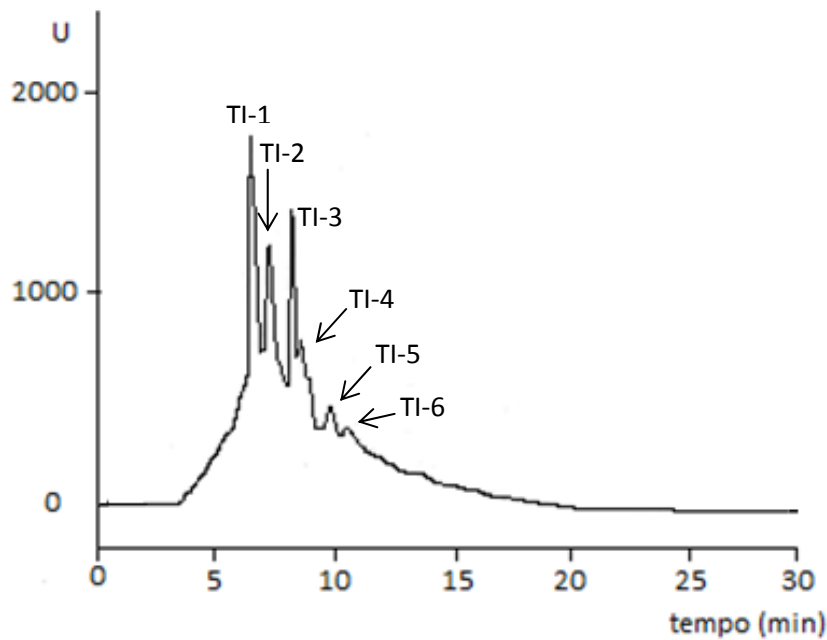


Figura 41. Cromatograma da FA após submissão à cromatografia de troca iônica.

As seis frações obtidas foram bioensaiadas contra *E. coli* e diâmetro dos halos de inibição foram os seguintes: TI-1 – 12 mm; TI-2 – 8 mm; TI-3 – 12 mm; TI-4 – 8 mm; TI-5 – 10 mm; TI-6 – 11 mm.

Resultados obtidos por CL-EM (modo *full scan*) determinaram a massa molecular dos metabólitos contidos nas frações. Análise da fração TI-1 revelou a presença de íon com m/z diferente daqueles já descritos na literatura como referentes a compostos produzidos por espécies de *P. polymyxa*. Fusaricidina A, cuja massa é 882 Da (Kurusu e Fukushima, 1987), foi detectada em TI-2. Este composto apresenta bioatividade contra bactérias Gram-positivas e fungos. Em TI-3 foi identificada a presença de gavaserin, peptídeo de 911 Da bioativo contra *Xanthomonas campestris* (bactéria Gram-negativa) (Pichard *et al.*, 1995) Na fração com TI-5 foi identificada a presença do íon com m/z 1267 Da, previamente descrito como o antibiótico polimixina E (colistina A) (Spinosa, 2002). As outras frações não apresentaram picos significativos em CL-EM, e a bioatividade apresentada pode ser decorrente de uma “contaminação” de fração adjacente, visto que os picos não são bem definidos.

Por tratar-se de uma fração bioativa com moléculas ainda não descritas na literatura, TI-1 foi verificada quanto ao seu espectro de atividade e utilizada para etapas de purificação e sequenciamento.

3.2 Fração TI-1: espectro de atividade e purificação das substâncias bioativas

A Tabela 5 apresenta os dados referentes ao ensaio de atividade biológica da fração TI-1, sendo possível constatar que o(s) componente(s) desta fração atua(m) especificamente contra bactérias Gram-negativas (exceto *Proteus mirabilis* ATCC 29906).

Tabela 5. Espectro antimicrobiano da fração TI-1 obtida por cromatografia de troca iônica.

Reação de Gram e cepa	Bioatividade
	Fração TI-1 (mm)*
Bactérias Gram-negativas	
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	8
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	10
<i>Pasteurella haemolytica</i> ATCC 33396	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14207	8
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	8
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	9
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930	10
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	14
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	-
Bactérias Gram-positivas	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	-
Fungo	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-

*solução 215,5 µg/ml, volume utilizado por poço - 100 µl; (-) zona de inibição não observada.

A fração TI-1 foi desalinizada (Figura 42) e então submetida a cromatografia de fase reversa. Os cromatogramas referentes a etapas da purificação estão locados nas Figuras 43 a 45.

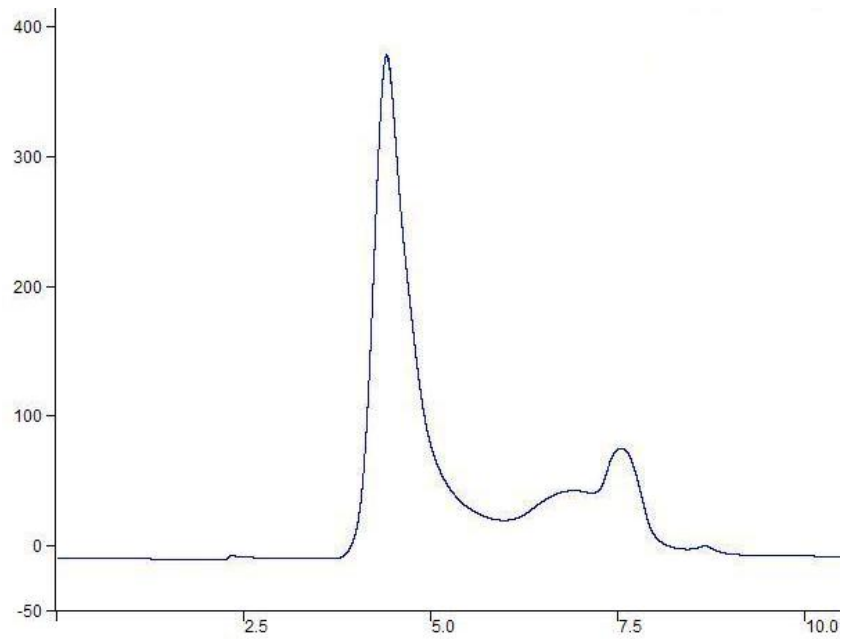


Figura 42. Desalinização da fração TI-1 monitorado em λ 280 nm.

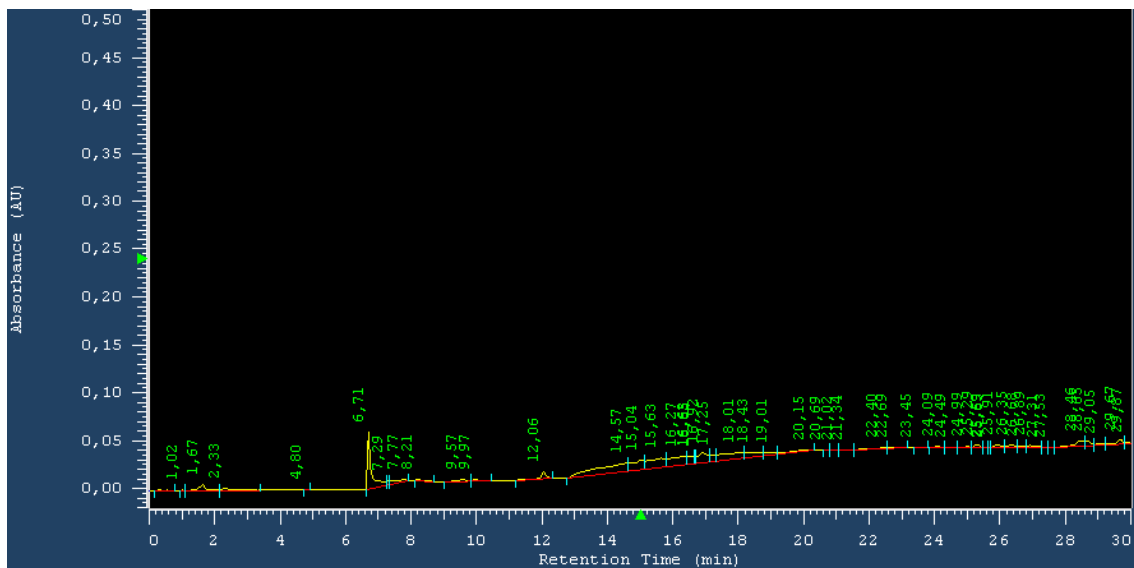


Figura 43. Cromatograma de 100 μ l de água (“branco”) obtido por cromatografia de fase reversa.

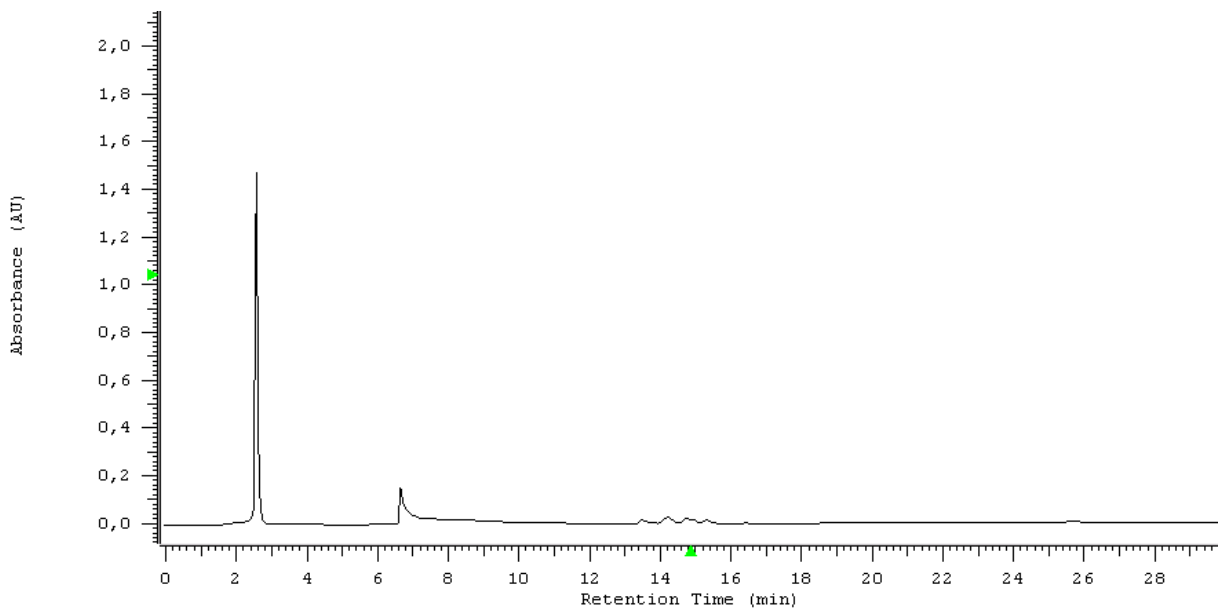


Figura 44. Cromatograma da fração TI-1 desalinizada (λ 214 nm).

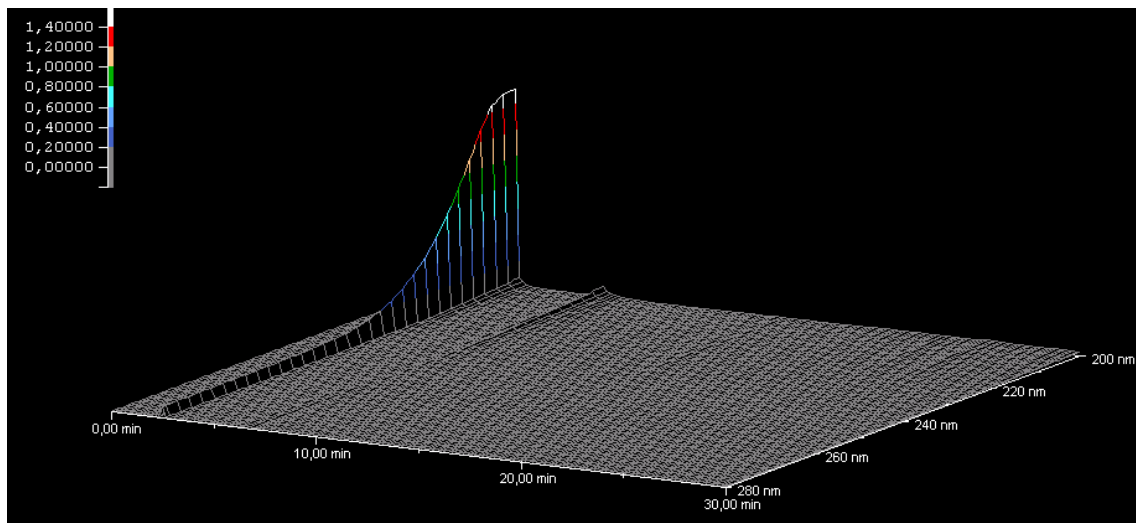


Figura 45. Cromatograma e espectro UV tridimensionais da fração TI-1 (DAD 200 – 280 nm).

A cromatografia de fase reversa revelou a presença de um pico com tempo de retenção 2,45 min que foi denominado TI-1/FR-1. O espectro de absorbância UV, visualizado na Figura 45, evidencia absorção máxima na faixa de λ 200 – 215 nm. Os picos TI-1/FR-1 foram reunidos e bioensaiados contra *E. coli*, sendo que a atividade inibitória foi comprovada.

3.3 Determinação da sequência de aminoácidos do PAM PpRNCD

A Figura 46 apresenta o resultado do sequenciamento N-terminal da molécula contida em TI-1/FR-1.

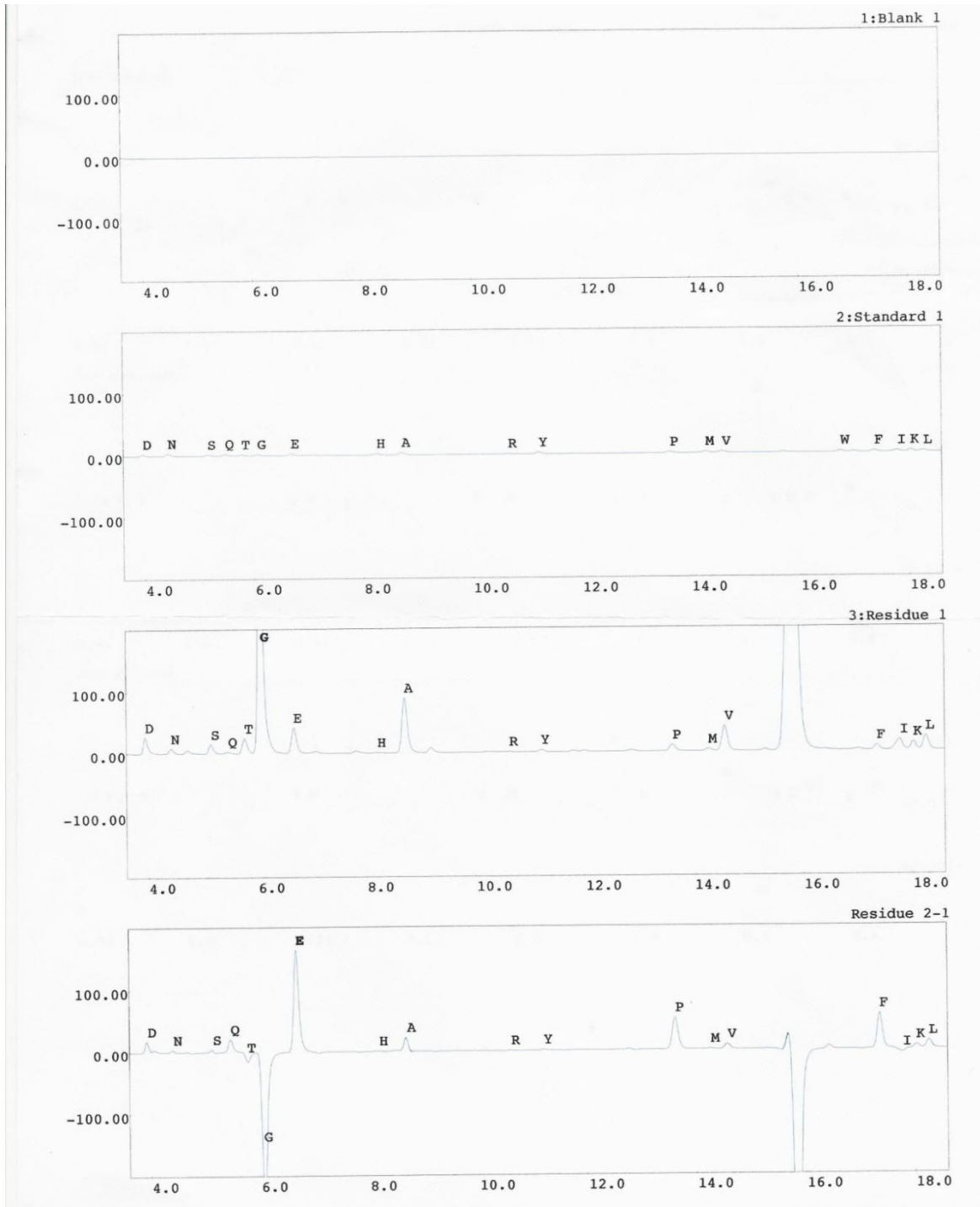


Figura 46. Sequenciamento N-terminal da molécula contida em TI-1/FR-1. Cromatograma 1: branco; cromatograma 2: aminoácidos padrões; cromatograma 3: resíduo 1 (Gly); cromatograma 4: resíduo 2 (Glu); cromatograma 5: resíduo 3 (Hyp), cromatograma 6: resíduo 4 (Gly), cromatograma 7: resíduo 5 (Ala ou Pro).

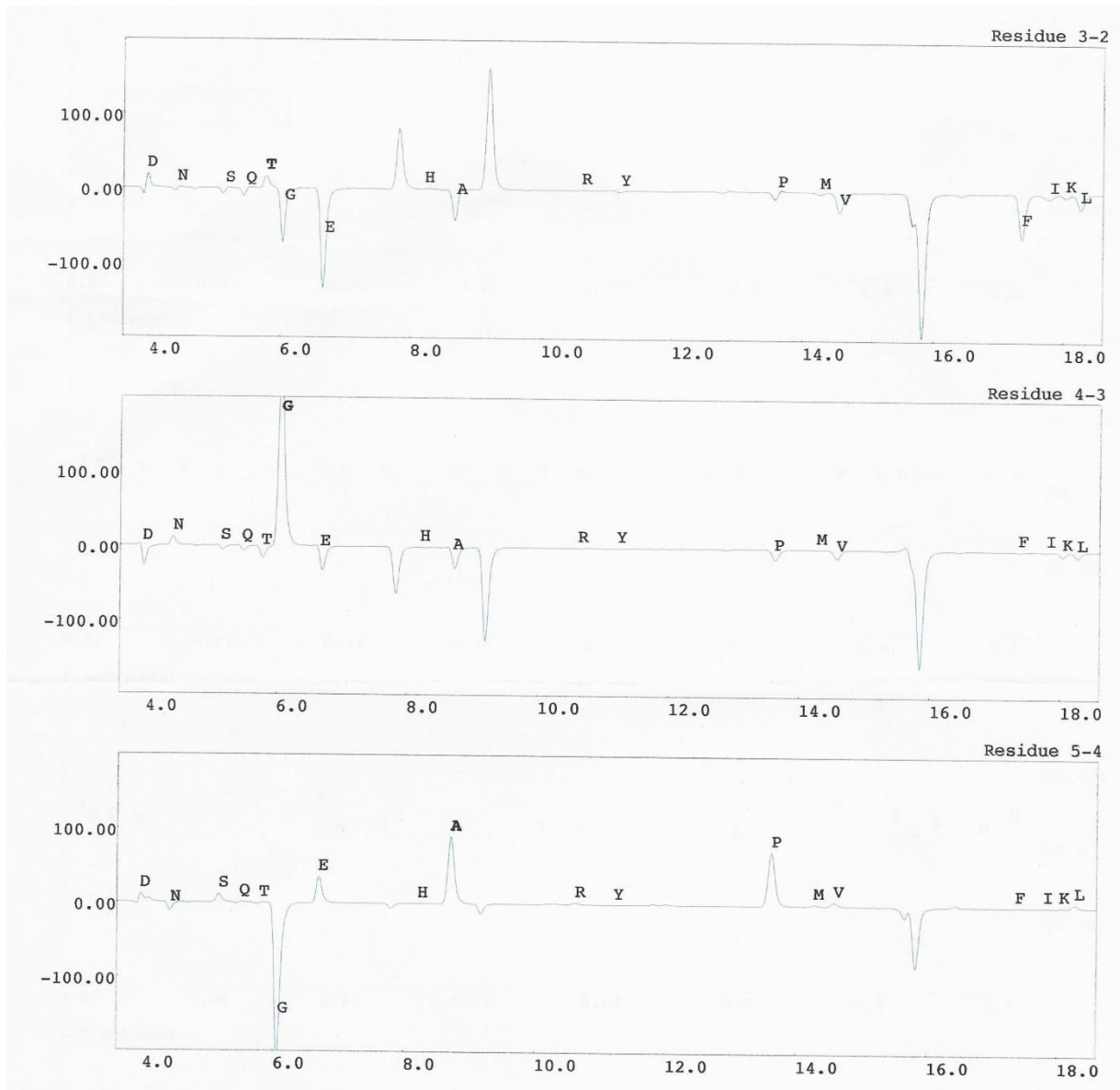


Figura 46. Continuação.

O peptídeo antimicrobiano presente em TI-1/FR-1 teve sua sequência determinada como: glicina - ácido glutâmico – hidroxiprolina – glicina – alanina/prolina (Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala/Pro). Este novo PAM foi denominado PpRNCD.

As três amostras analisadas apresentaram a mesma sequência do N-terminal. Nos quatro primeiros ciclos, o resíduo considerado como primeira atribuição apresentou predominância inequívoca relativamente aos resíduos restantes (eventualmente pertencentes a contaminantes da amostra). Na determinação do peptídeo não foi

possível afirmar que a sequência termina no 4° ou 5° ciclo, pois no quinto ciclo ainda são visualizados resíduos (Ala e Pro) no cromatograma (Figura 46, Cromatograma 7) que podem pertencer a cadeias contaminantes ou ao próprio peptídeo. Esta incerteza é devido ao *washout* da amostra, que provocando uma diminuição do sinal dos resíduos do peptídeo de interesse, aproxima a intensidade deste sinal à intensidade do sinal dos resíduos de contaminantes.

O resíduo correspondente ao terceiro ciclo, Hyp, não é reconhecido pelo software do equipamento dado que não faz parte dos aminoácidos integrados no padrão PTH-AA® (Applied Biosystems). Entretanto a sua posição é bem conhecida, apresentando-se como um pico duplo, o primeiro saindo com tempo de retenção imediatamente anterior ao da Histidina, e o segundo imediatamente a seguir à Alanina.

A hidroxiprolina é um aminoácido não essencial constituinte de proteínas (representa 10% da molécula de colágeno); glicoproteínas ricas em hidroxiprolina também podem ser encontradas na parede celular vegetal. A presença deste aminoácido confere maior estabilidade química às moléculas. Para a hidroxilação da prolina, existe uma proteína chamada prolil hidroxilase, que reconhece a prolina como seu substrato. A condição é que a prolina (Pro) a ser hidroxilada esteja ao lado de uma glicina (Gly) na sequência, no sentido amino a carboxilo (CASSAB, 1998).

Recentemente, estudo realizado por Mandal (2012) identificou um peptídeo antifúngico de massa molecular 4 kDa extraído da planta *Datura stramonium*. A molécula possui cadeia lateral de glicosídeos (GlcNAc-) e o sequenciamento completo por EM MALDI revelou a presença de hidroxiprolina no centro de dois resíduos de cisteína. O composto antifúngico denominado datucin foi testado contra isolados clínicos multi-droga resistentes e *C. albicans*.

A produção de peptídeos antibióticos que possuem em suas estruturas o aminoácido hidroxiprolina foi relatada por Shoji *et al.* (1995). As substâncias denominadas plusbacin A1, A2, A3, A4 e plusbacin B1, B2, B3 e B4, são produzidas por *Pseudomonas* spp.

Considerando que peptídeos lineares são rapidamente degradados por proteases séricas e que PAMs com elevado conteúdo de prolina apresentam baixa toxicidade e alta eficácia *in vivo*, Knappe *et al.* (2014) conduziram estudo de modificação do PAM drosocin. A substituição de resíduos de prolina nas posições 3, 5, 10 e 14 por trans-4-

hidroxiprolina ((t)Hyp) resultou em aumento de atividade antibacteriana contra os patógenos Gram-negativos *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Ainda, o novo análogo de drosocin possui tempo de meia-vida prolongado, sendo oito vezes mais estável no soro de ratos quando comparado a drosocin não modificado.

O presente estudo relata pela primeira vez a produção do PAM PpRNCD que possui o aminoácido hidroxiprolina em sua constituição. Considerando-se a espécie bacteriana *P. polymyxa*, a presença do aminoácido hidroxiprolina, o qual confere maior estabilidade às moléculas em que está presente, foi detectada primeiramente no peptídeo aqui abordado.

Em termos de tamanho de molécula, pode-se considerar que o PAM PpRNCD, o qual contém apenas 5 resíduos de aminoácidos, é um dos menores peptídeos naturais ativos relatados. O menor PAM secretado por cepa de *P. polymyxa* KT-8 é a Fusaricidina A com 882 Da (Kurusu e Fukushima, 1987). PAMs contendo 5 aminoácidos também foram isolados de *Eisenia foetida*, sendo denominados OEP3121 (Ala-Cys-Ser-Ala-Gly) (Liu *et al.*, 2004), F-1 (Ala-Met-Val-Ser-Ser) e F-2 (Ala-Met-Val-Gly-Thr) (Zhang *et al.*, 2002).

3.4 Confirmação da estrutura primária por MS/MS

Na determinação do N-terminal do PAM PpRNCD não foi possível concluir se a sequência termina no 4° ou 5° resíduo. Complementarmente, então, utilizou-se análise por MS/MS para confirmar a massa molecular do PAM, bem como qual número e tipo de resíduo C-terminal. Os dados apresentados no espectro da Figura 47 indicam que a massa molecular do PAM PpRNCD é 463 Da (íon m/z 464). O pico m/z 446 (464 – 18) indica possivelmente a perda de uma molécula de água, a qual é bastante comum em peptídeos que possuem em sua estrutura ácido glutâmico (Cantu *et al.*, 2008). O pico m/z 186 pode ser atribuído ao dipeptídeo glicina-ácido glutâmico. A diferença 446 – 375 = 71 refere-se ao resíduo de alanina. Desta maneira, os dados aqui obtidos por MS/MS complementam o sequenciamento do N-terminal, concluindo que a sequência do PAM PpRNCD é glicina - ácido glutâmico – hidroxiprolina – glicina – alanina.

A representação esquemática da sequência utilizada para purificação e caracterização do PAM PpRNCD está inserida na Figura 48.

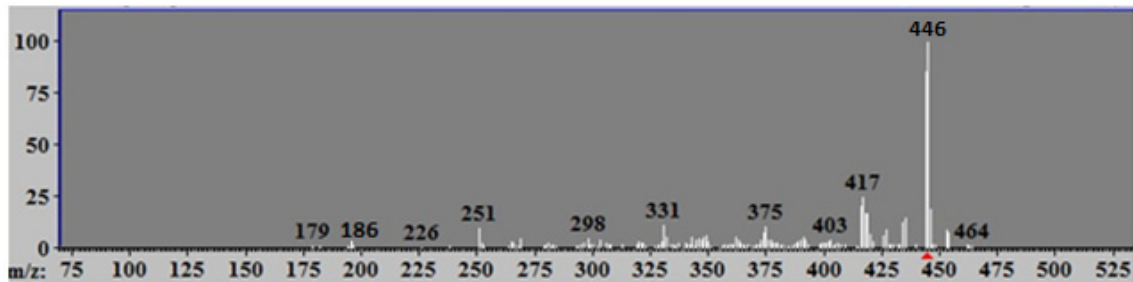


Figura 47. Espectro de fragmentação MS/MS do íon m/z 464.

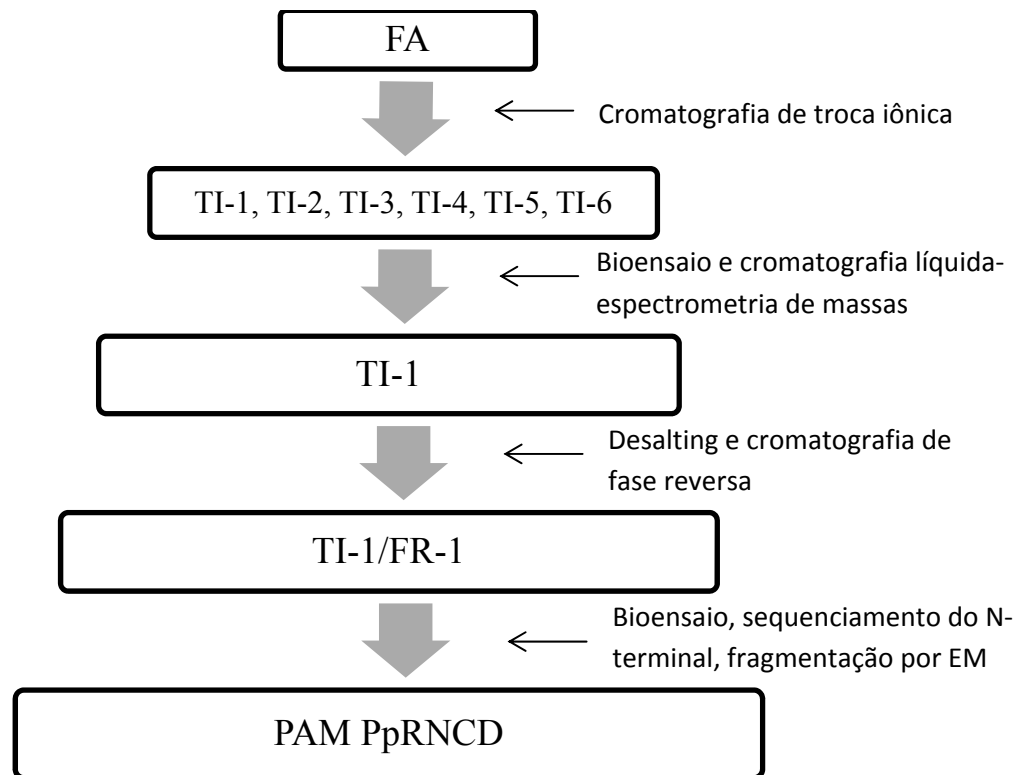


Figura 48. Representação esquemática da sequencia utilizada para purificação e caracterização do PAM PpRNCD.

4. Conclusões do Capítulo 2 - Parte II

A purificação do novo PAM produzido por *P. polymyxa* RNC-D envolveu uma partição orgânica seguida por 3 etapas cromatográficas, as quais incluíram cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular (desalting) e cromatografia de fase reversa. A bioatividade do composto foi avaliada e confirmada frente às bactérias Gram-negativas *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*. O composto não foi ativo contra a cepa de *Proteus mirabilis* avaliada.

A análise do N-terminal determinou a sequência do PAM PpRNCD como glicina - ácido glutâmico – hidroxiprolina – glicina – alanina. A confirmação da estrutura primária deste novo composto foi feita por MS/MS.

O presente estudo relata pela primeira vez a produção do PAM PpRNCD que possui o aminoácido não usual hidroxiprolina em sua constituição. Considerando-se a espécie bacteriana *P. polymyxa*, a presença do aminoácido hidroxiprolina, o qual confere maior estabilidade às moléculas em que está presente, foi detectada primeiramente no peptídeo aqui abordado.

Em termos de tamanho de molécula, pode-se considerar que o PAM PpRNCD (massa molecular 463 Da), que contém apenas 5 resíduos de aminoácidos, é um dos menores peptídeos naturais ativos relatados. O menor PAM secretado por cepa de *P. polymyxa* KT-8 é a Fusaricidina A com massa molecular de 882 Da (Kurusu e Fukushima, 1987). Outros PAMs contendo 5 aminoácidos também foram isolados de *Eisenia foetida*; entretanto, o aminoácido hidroxiprolina constitui tais moléculas.

Parte III: Purificação e caracterização de PAMs do grupo LI-F

2. Experimental

2.1 Cromatografia de troca iônica

O pH do ET foi ajustado no valor de 3,0 e o sistema de duas fases, descrito no item 2.3 da Parte I, foi aplicado para obtenção da FA, a qual foi utilizada em cromatografia de troca iônica.

O cromatógrafo utilizado foi um Akta Purifier10 (GE Healthcare), no qual foi acoplada a coluna HiTrap QFF (1-ml volume, GE Healthcare). As fases móveis aplicadas foram solução aquosa 20 mM TRIS HCl, pH 7.5 (tampão A) e solução aquosa 20 mM TRIS HCl + 1 M NaCl, pH 7.5 (tampão B). A amostra injetada consistiu de 250 μ l de FA + 250 μ l de tampão A. A eluição ocorreu sob fluxo de 1,0 ml/min na forma de gradiente linear de 0 a 50% de tampão B durante 30 minutos, com monitoramento a λ 280 nm. Frações de 1 ml foram coletadas (TIF2, TIF3, TIF14 a TIF28) para realização dos bioensaios (*spot test*). As frações foram concentradas em *speed-vac* e ressuspensas em 10 μ l de tampão A para ensaio contra *E.coli* e *S. aureus*. O volume de 10 μ l de FA foi utilizado como controle positivo.

A fração bioativa TIF2 foi escaneada para o espectro de absorção em comprimento de onda ultravioleta visível (λ 200 a 800 nm) utilizando um espectrofotômetro Shimadzu-UV 160A.

2.2 Cromatografia de exclusão molecular

O volume de 100 μ l da fração TIF2 previamente concentrada em *speed vac* foi aplicado em coluna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare), sob fluxo de 0,5 ml/min com eluição isocrática utilizando água MiliQ esterilizada. Picos EMB1, EMB2, EMB3, EMB4 e EMB5 foram coletados manualmente com eluição monitorada a λ 216 nm. O *spot test* foi aplicado para verificar a atividade antimicrobiana dos picos contra as bactérias indicadoras.

2.3 Cromatografia de fase reversa

As moléculas bioativas contidas na fração EMB2 foram separadas por cromatografia de fase reversa. O volume de 100 µl de amostra foi injetado em coluna C₁₈ (Luna 5µ, 150 mm x 4,60 mm; Phenomenex) e eluído em gradiente bifásico linear. A fase móvel consistiu em solvente A (água) e solvente B (metanol), fluxo constante de 0,7 ml/min. Método cromatográfico: 4% solvente B – 13 min; 4 a 100% solvente B – 12 min (+8% solvente B/min); 100% solvente B – 5 min; 100 a 4% solvente B em 2 min (-48% solvente B/min); 4% solvente B durante 5 min. Sistema cromatográfico Waters Co composto por 2 bombas HPLC W515; injetor automático com refrigeração (W717); detector de PDA (W996). A eluição foi monitorada em λ 216 nm (DAD 190- 800 nm). Os picos foram coletados manualmente e concentrados em speed vac para avaliação antimicrobiana (*spot test*).

2.4 Análise por EM MALDI-TOF

As frações liofilizadas FRP1, FRP2, FRP3 e FRP4 foram ressuspensas em metanol e depositadas em quintuplicata (1 µl/*spot*) nas placas de MALDI. Após evaporação do solvente, adicionou-se sob cada amostra o volume de 1 µl de matriz HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) (solução estoque 20 mg/ml). A ionização foi realizada em modo positivo, e a detecção em modo linear. Foram aplicados 500 Hz de frequência de laser, 20 kV de voltagem de aceleração e λ 355 nm. A soma de dez espectros (25 shots/espectro) foi considerada na elaboração dos perfis de EM das amostras. O espectrômetro de massas utilizado foi um MALDI-TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker). As análises por EM MALDI-TOF foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos).

2.5 Fragmentação dos peptídeos (MS/MS)

Para obtenção de informação detalhada sobre a sequência dos compostos analisados por EM MALDI-TOF, íons foram selecionados para fragmentação. O equipamento MALDI-TOF/TOF AutoFlex Speed (Bruker) equipado com fonte de *electrospray* ortogonal foi operado em modo íon positivo. m/z range 200 – 2.500. As amostras diluídas em uma mistura de H₂O/acetonitrila/ácido acético (50:50:2,5) foram infundidas na fonte de *electrospray* a 2 μ l/min. Para atingir o *electrospray* ótimo, voltagem do capilar foi ajustada em 3 kV, fonte de temperatura 130° C, voltagem do cone 50 V. O primeiro quadrupolo Q1 foi ajustado para passagem de íons entre m/z 200 e 2.000. O íon selecionado foi isolado e fragmentado no segundo quadrupolo adicionando-se entre 20 a 40 V. Os íons fragmentos foram então analisados no tubo de tempo de voo. Dados foram adquiridos em modo contínuo. Os espectros resultantes foram analisados manualmente.

3. Resultados e discussão

3.1 Purificação bioguiada das substâncias antimicrobianas

O perfil de fracionamento da FA, obtido por cromatografia de troca iônica, está mostrado na Figura 49. O resultado do bioensaio contra *E. coli* (Figura 50) e *S. aureus* apontou a fração TIF2 como biologicamente ativa. O espectro de absorbância UV desta fração está apresentado na Figura 51.

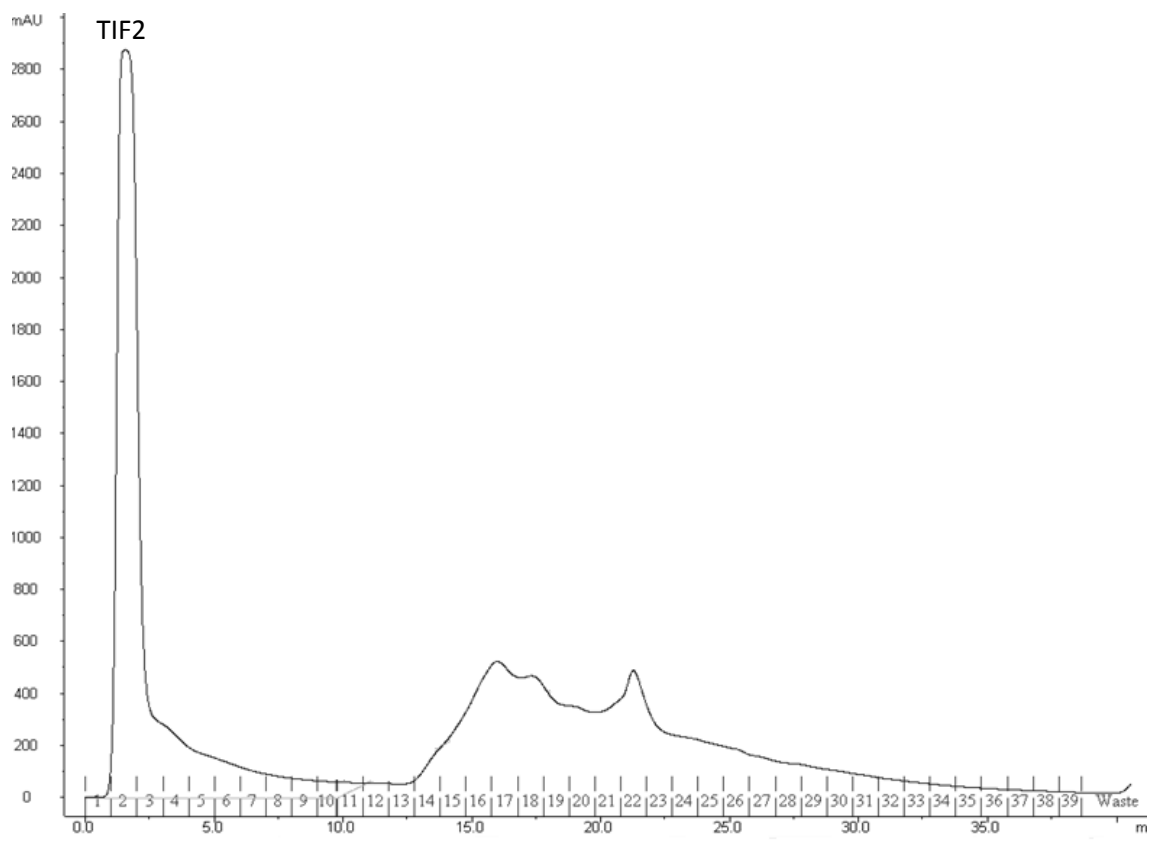


Figura 49. Perfil de fracionamento da FA obtido por cromatografia de troca iônica.

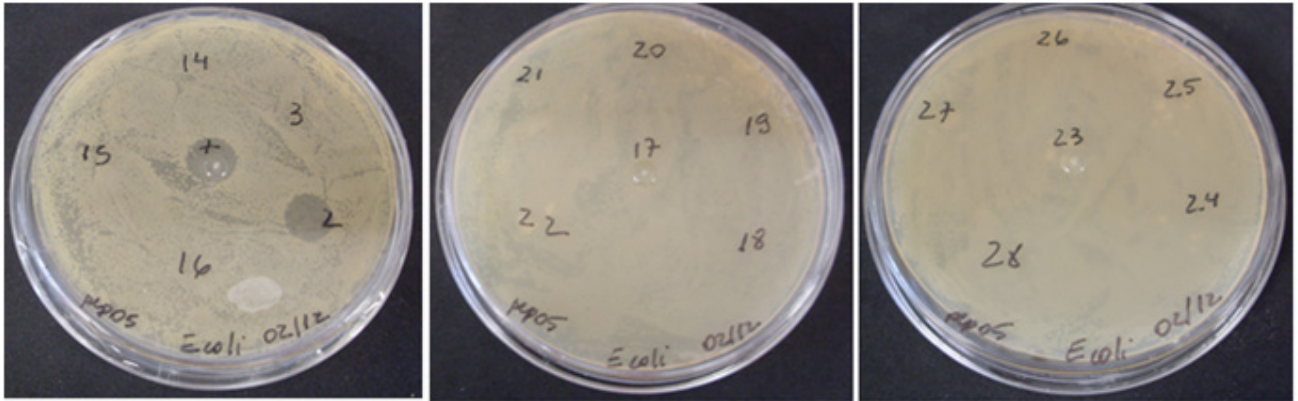


Figura 50. Spot test das frações TIF2, TIF3, TIF14 a 28 e o controle positivo FA (+) contra *E. coli*.

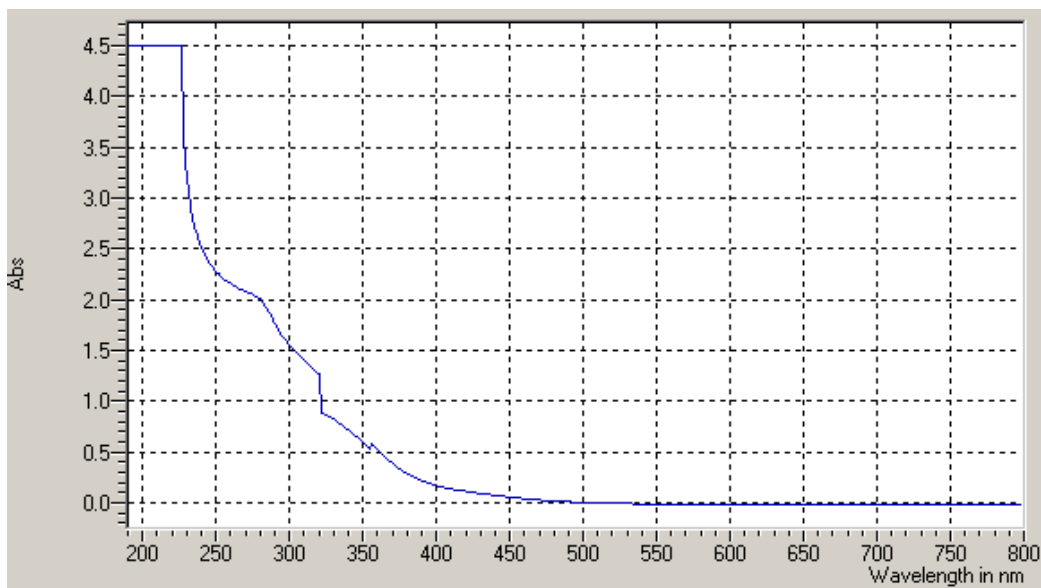


Figura 51. Espectro de absorvância UV de TIF2 (DAD 200 – 800 nm)

De acordo com o perfil cromatográfico (Figura 49) e espectro de absorvância (Figura 51) nota-se que a fração TIF2 necessita de etapas cromatográficas suplementares para purificação de seus compostos bioativos. Assim, TIF2 foi sequencialmente submetida a cromatografia de exclusão molecular e o perfil de separação está exposto na Figura 52.

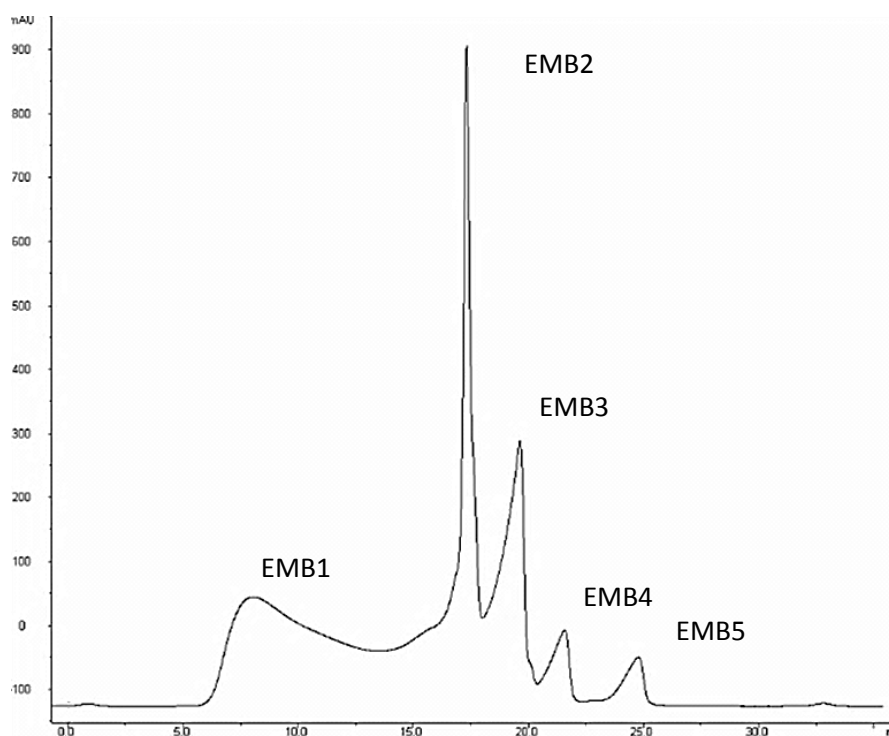


Figura 52. Perfil de separação de TIF2 obtido por cromatografia de exclusão molecular.

Diferentes frações denominadas EMB1, EMB2, EMB3, EMB4 e EMB5, com tempos de retenção 15,1 min, 34,3 min, 36,7 min, 38,6 min e 43,8 min, respectivamente, foram obtidas a partir da cromatografia de exclusão molecular. A EMB2, cuja bioatividade abrangue *E. coli* e *S. aureus*, foi submetida a cromatografia de fase reversa. O perfil cromatográfico está apresentado na Figura 53.

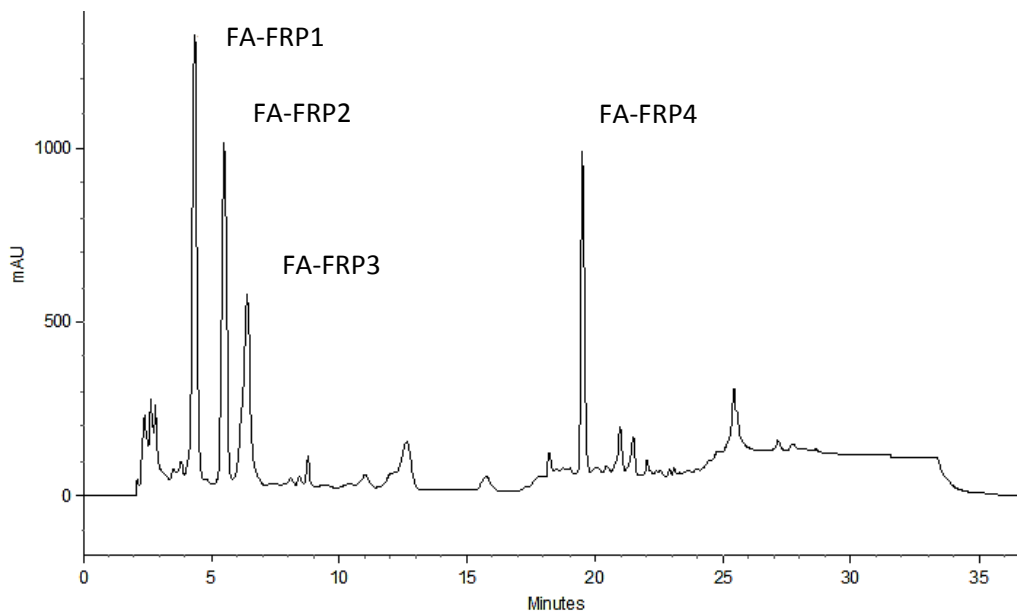


Figura 53. Cromatograma de EMB2 adquirido por cromatografia de fase reversa.

A cromatografia de fase reversa de EMB2 resultou na separação dos compostos em quatro picos, que foram denominados FA-FRP1, FA-FRP2, FA-FRP3 e FA-FRP4, com tempos de retenção de 4,37 min, 5,51 min, 6,31 min e 19,53 min. Os espectros de absorvância UV destes picos, bem como uma comparação entre eles, estão representados nas Figuras 54, 55, 56, 57 e 58.

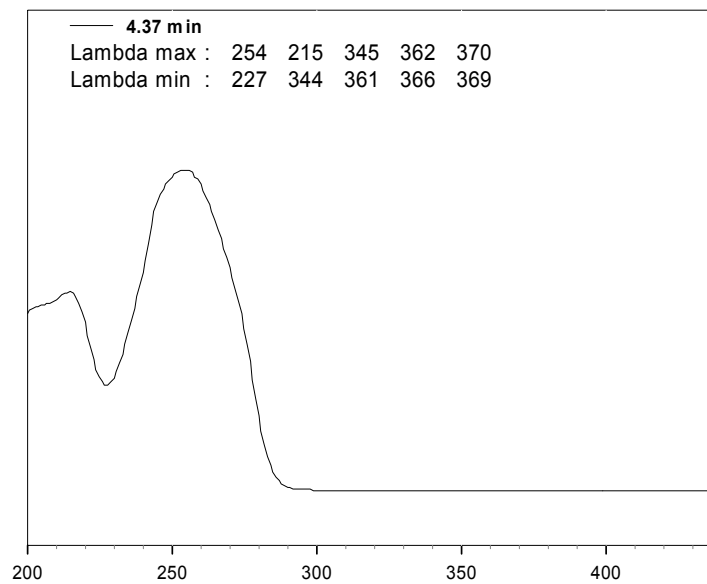


Figura 54. Espectro de absorvância UV do pico FA-FRP1 (DAD 200 – 500 nm).

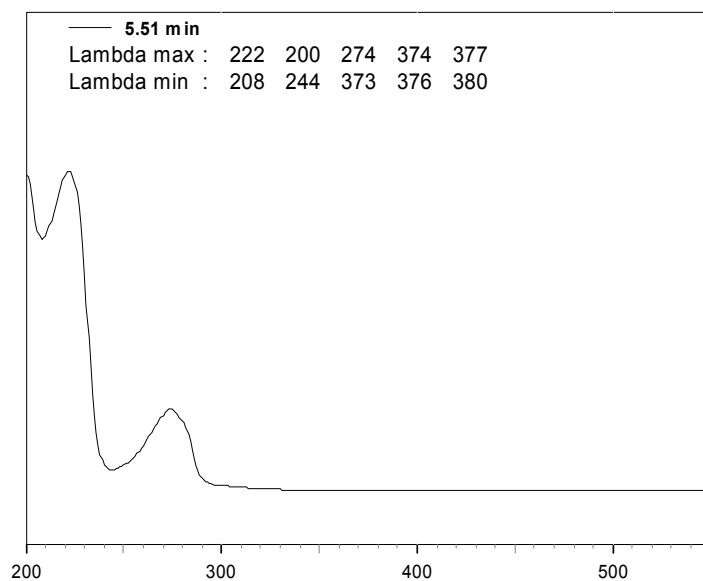


Figura 55. Espectro de absorvância UV do pico FA-FRP2 (DAD 200 – 500 nm).

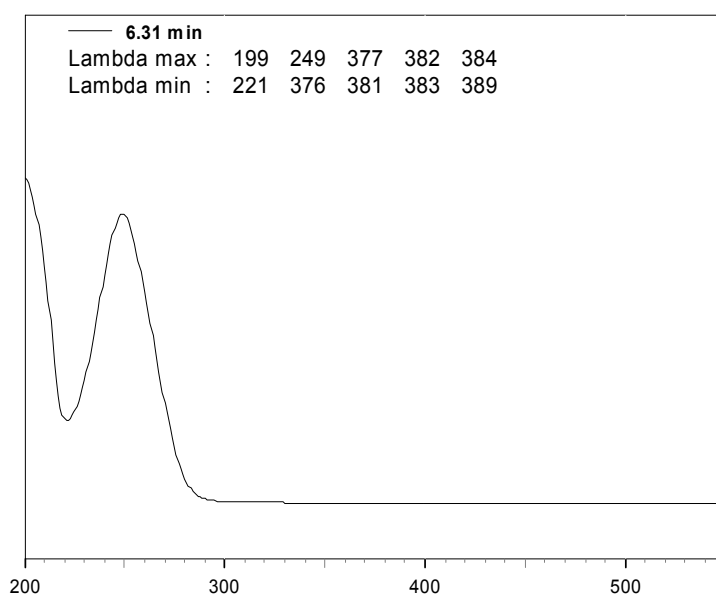


Figura 56. Espectro de absorvância UV do pico FA-FRP3 (DAD 200 – 500 nm).

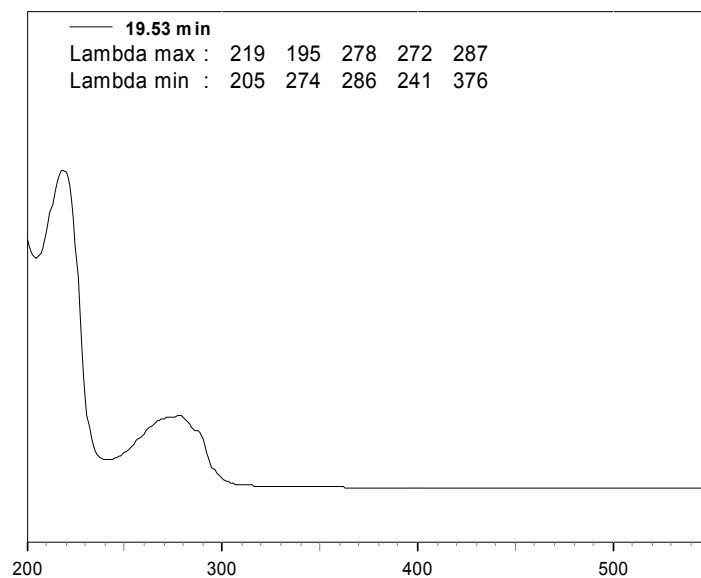


Figura 57. Espectro de absorvância UV do pico FA-FRP4 (DAD 200 – 500 nm).

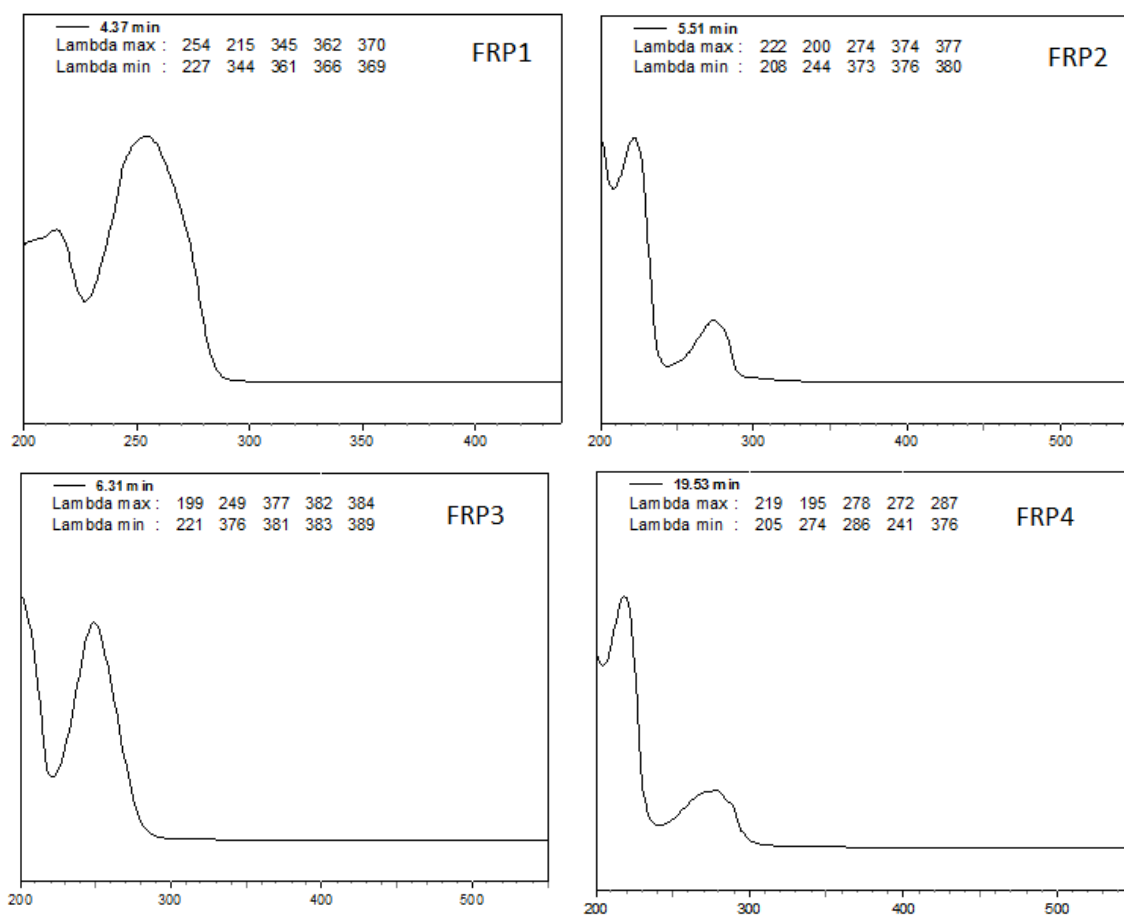


Figura 58. Comparação entre os espectros de absorvância UV dos picos FA-FRP1, FA-FRP2, FA-FRP3 e FA-FRP4.

O ensaio de atividade biológica revelou que os picos FA-FRP3 e FA-FRP4 são ativos contra *S. aureus*. Embora a fração EMB2 tenha demonstrado bioatividade contra *E. coli*, os picos resolvidos pela cromatografia de fase reversa não inibiram o microrganismo Gram-negativo. Este fato deve-se, provavelmente, à baixa concentração de compostos nos picos.

FA-FRP3 e FA-FRP4 foram submetidos à análise por EM MALDI-TOF e os espectros (*full scan* e de fragmentação MS/MS) obtidos estão mostrados nas Figuras 59 a 66.

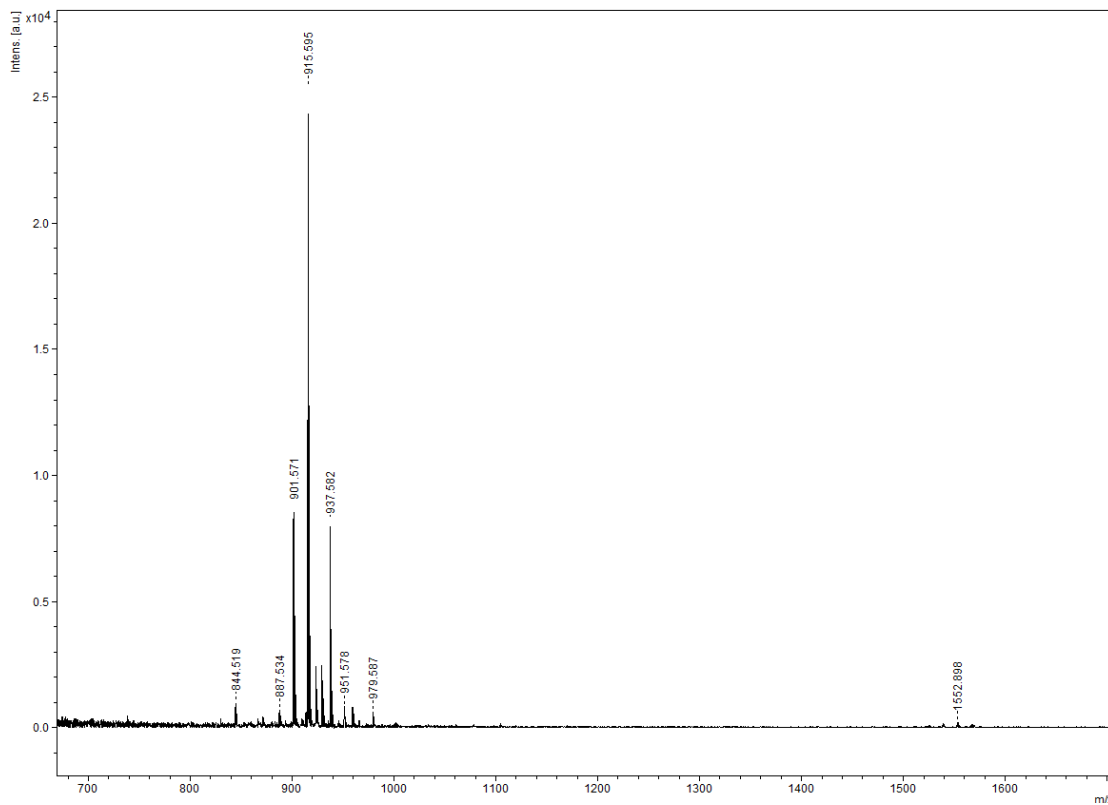


Figura 59. Espectro de massas *full scan* de FRP3 (m/z 700 – 1700).

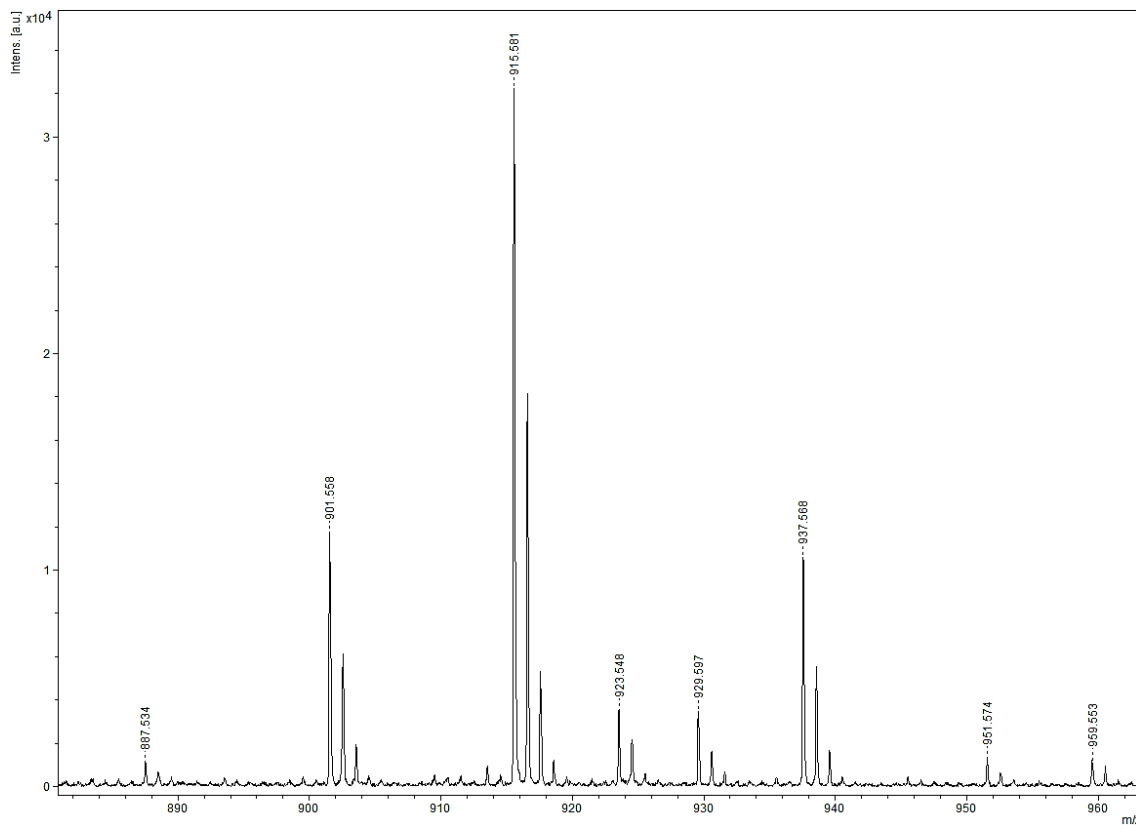


Figura 60. Espectro de massas *full scan* de FRP3 com *zoom* na região entre m/z 880 – 960.

O espectro de massas de FA-FRP3 apresentou um pico significativo em m/z 915,581, e outro pico em m/z 901,559. Os compostos relativos a estes íons foram relatados primeiramente por Kurusu & Ohba (1987) como sendo pertencentes a um grupo de depsipeptídeos que possuem uma cadeia lateral de ácido guanidino-3-hidroxipentadecanóico ligado a um grupo amino; este grupo foi denominado LI-F.

Mais recentemente Deng *et al.* (2011) relataram a produção destes compostos por *P. polymyxa* JSa-9 e realizaram estudos de identificação das moléculas usando análise MS/MS. O mesmo perfil de fragmentação dos peptídeos LI-F04a (m/z 883) e LI-F04b (m/z 897) linearizados (m/z 901,55 e m/z 915,51, respectivamente), demonstrado por Deng *et al.* (2011), foi encontrado no presente estudo (Figuras 61 e 62). O íon m/z 256 corresponde a cadeia lateral de ácido guanidino-3-hidroxipentadecanóico (GHPD), que pode ser visualizado nas Figuras 61 e 62.

Portanto, *P. polymyxa* RNC-D também foi capaz de produzir os compostos LI-F04a e LI-F04b.

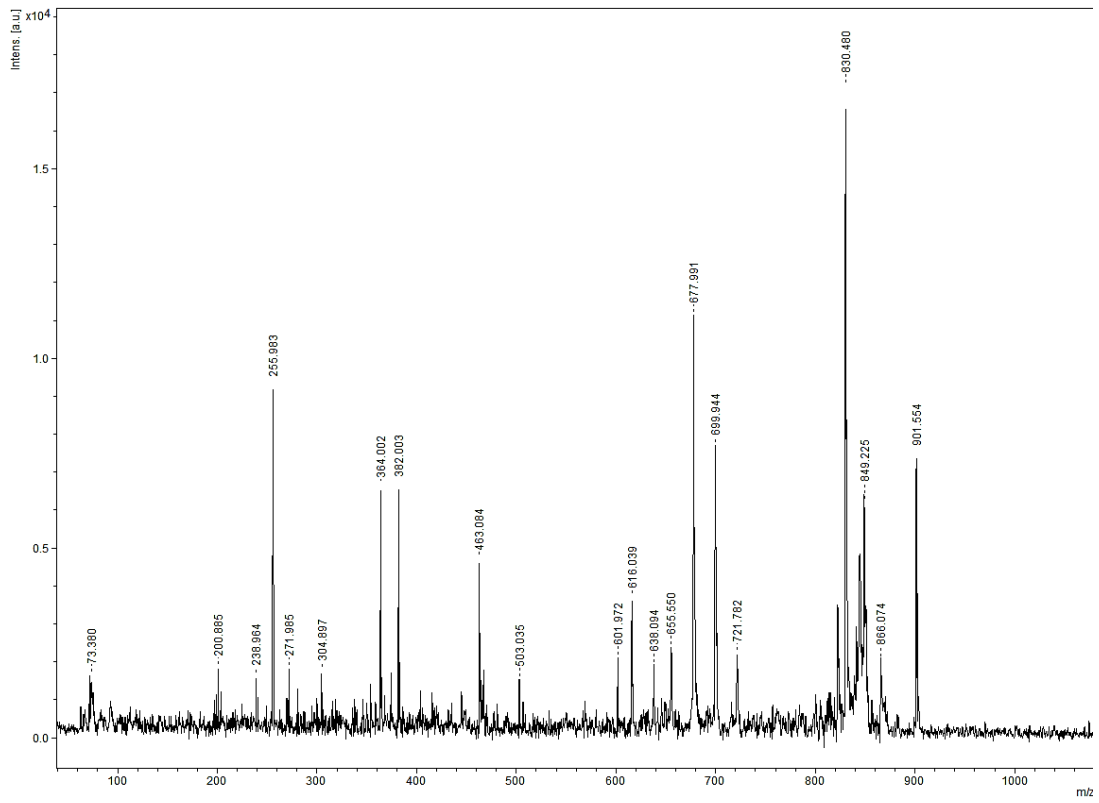


Figura 61. Espectro de fragmentação MS/MS do íon m/z 901,554.

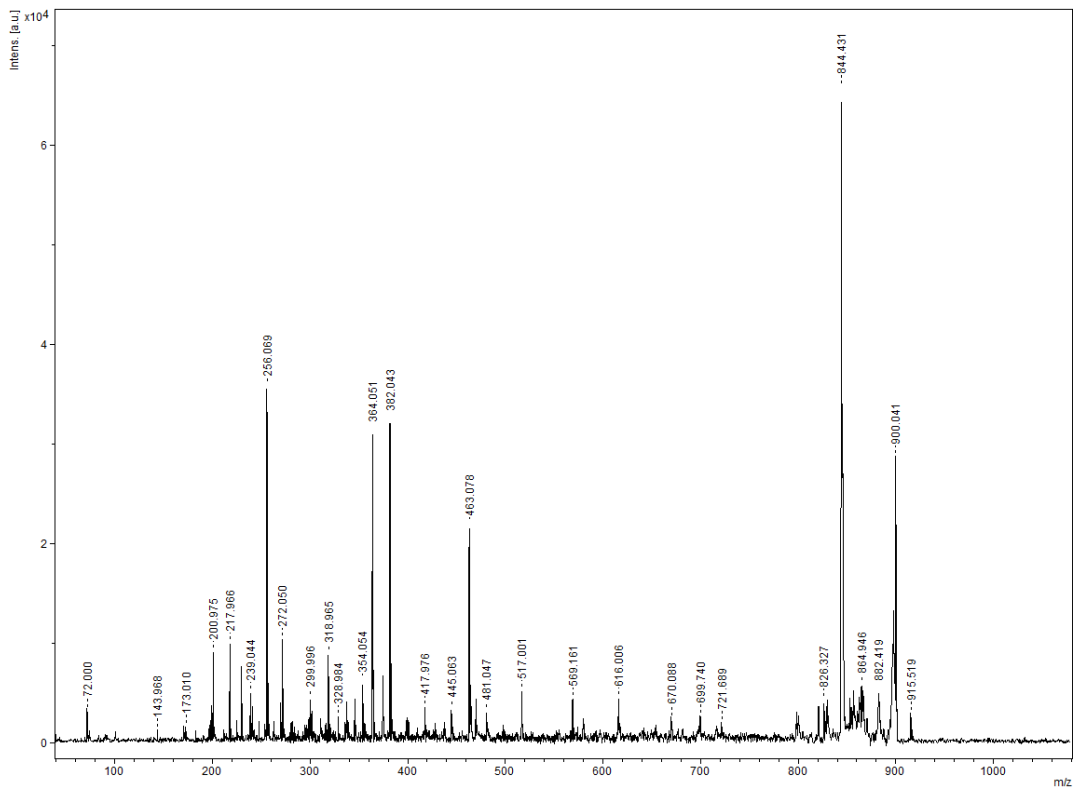


Figura 62. Espectro de fragmentação MS/MS do íon m/z 915,519.

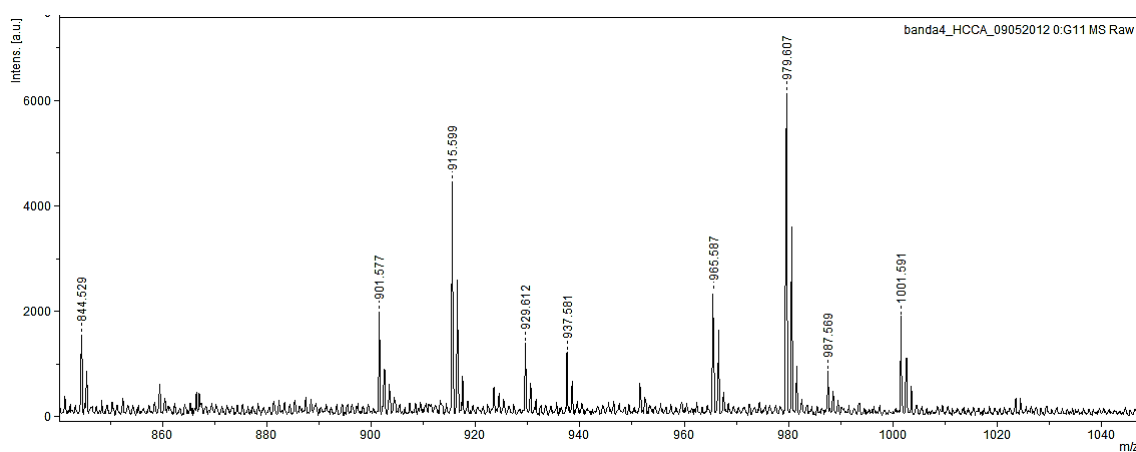


Figura 63. Espectro de massas *full scan* de FA-FRP4 com *zoom* na região entre m/z 840 – 1040.

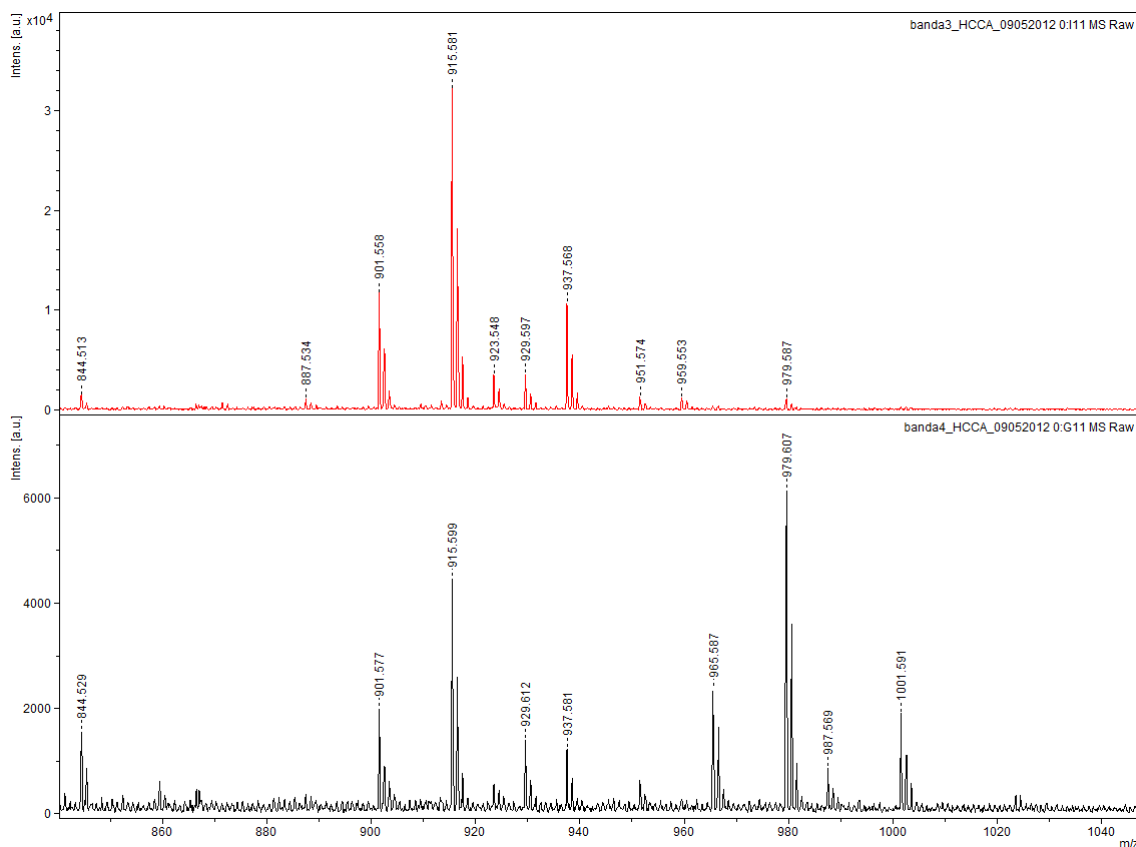


Figura 64. Comparação dos espectros de massas *full scan* de FA-FRP3 (acima) com FA-FRP4 (abaixo).

Dados da análise de EM mostrados nas Figuras 63 e 64 mostraram a presença de alguns íons comuns a FRP3 e FRP4. Os pares de picos significativos em FRP4 incluem m/z 979,607 – 1001,591 (aduto de sódio), m/z 965,587 – 987,569 (aduto de sódio). Com

o objetivo de caracterizar a estrutura primária destes compostos, tais íons foram escolhidos como íons precursores para fragmentação (MS/MS). Os espectros de MS/MS estão indicados nas Figuras 65 e 66.

O íon m/z 256, que corresponde à cadeia lateral de ácido guanidino-3-hidroxipentadecanóico (GHPD), também pode ser visualizado em ambos os espectros. Os íons com m/z 965,587 e m/z 979,607 correspondem aos peptídeos LI-F03a (m/z 947) e LI-F03b (m/z 961) linearizados previamente descritos Kurusu & Ohba (1987); isto foi concluído pois o mesmo perfil de fragmentação foi obtido pelas análises de MS/MS (Figuras 61 e 62). Além disso, o espectro UV da FRP4 (Figuras 57 e 58) é idêntico ao espectro de LI-F03 a/b reportado por Kurusu & Ohba (1987).

A Figura 67 apresenta uma representação esquemática da sequência utilizada para purificação e caracterização dos PAMs LI-F04a/b e LI-F03a/b.

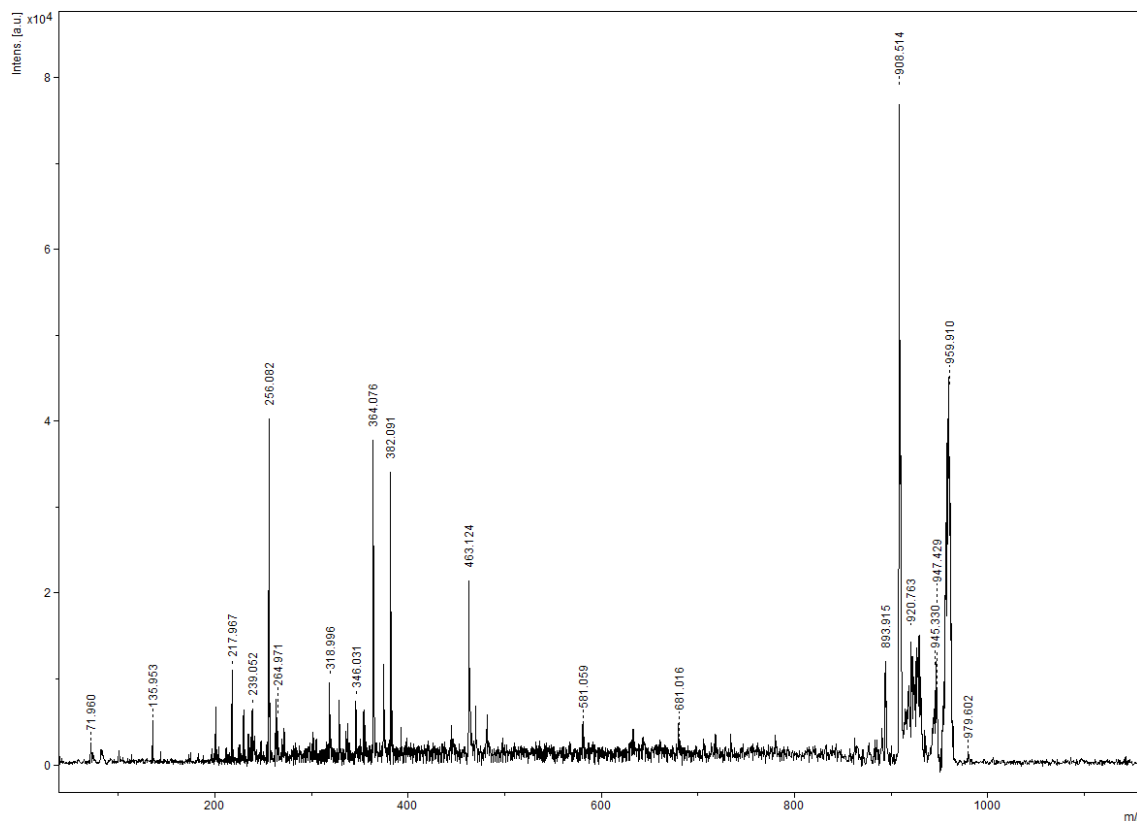


Figura 65. Espectro de fragmentação MS/MS do íon m/z 979,607.

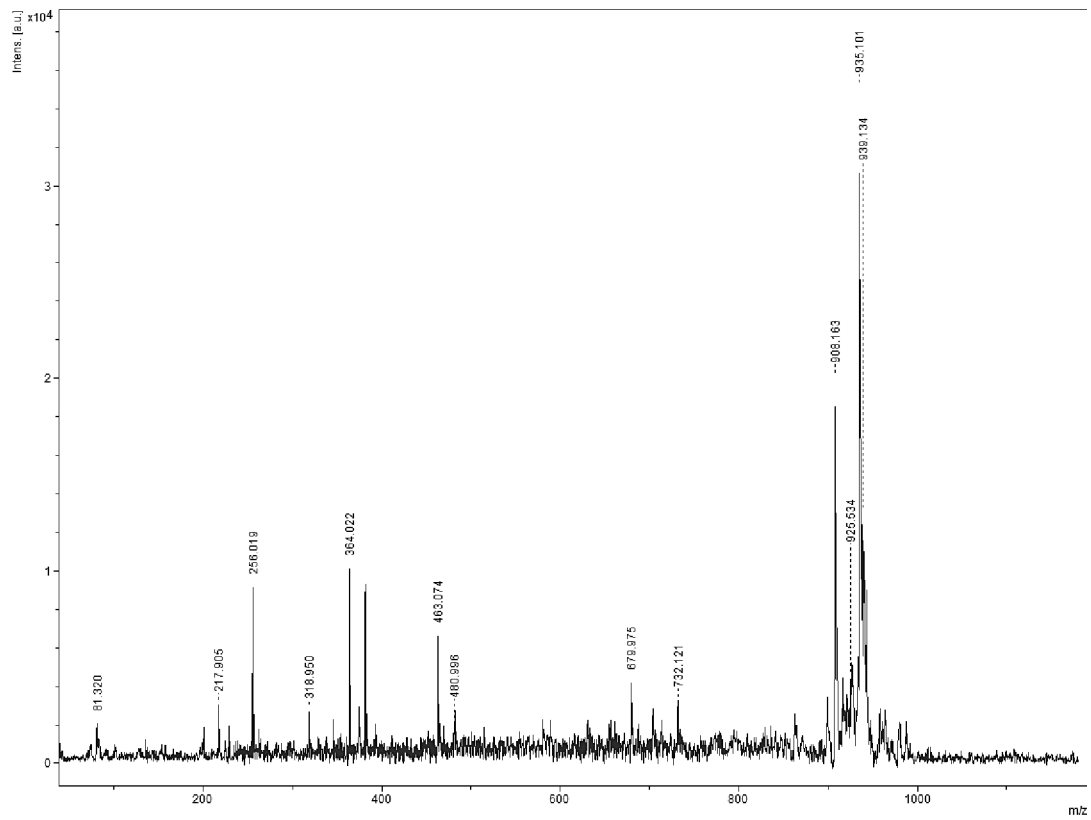


Figura 66. Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 987,569.

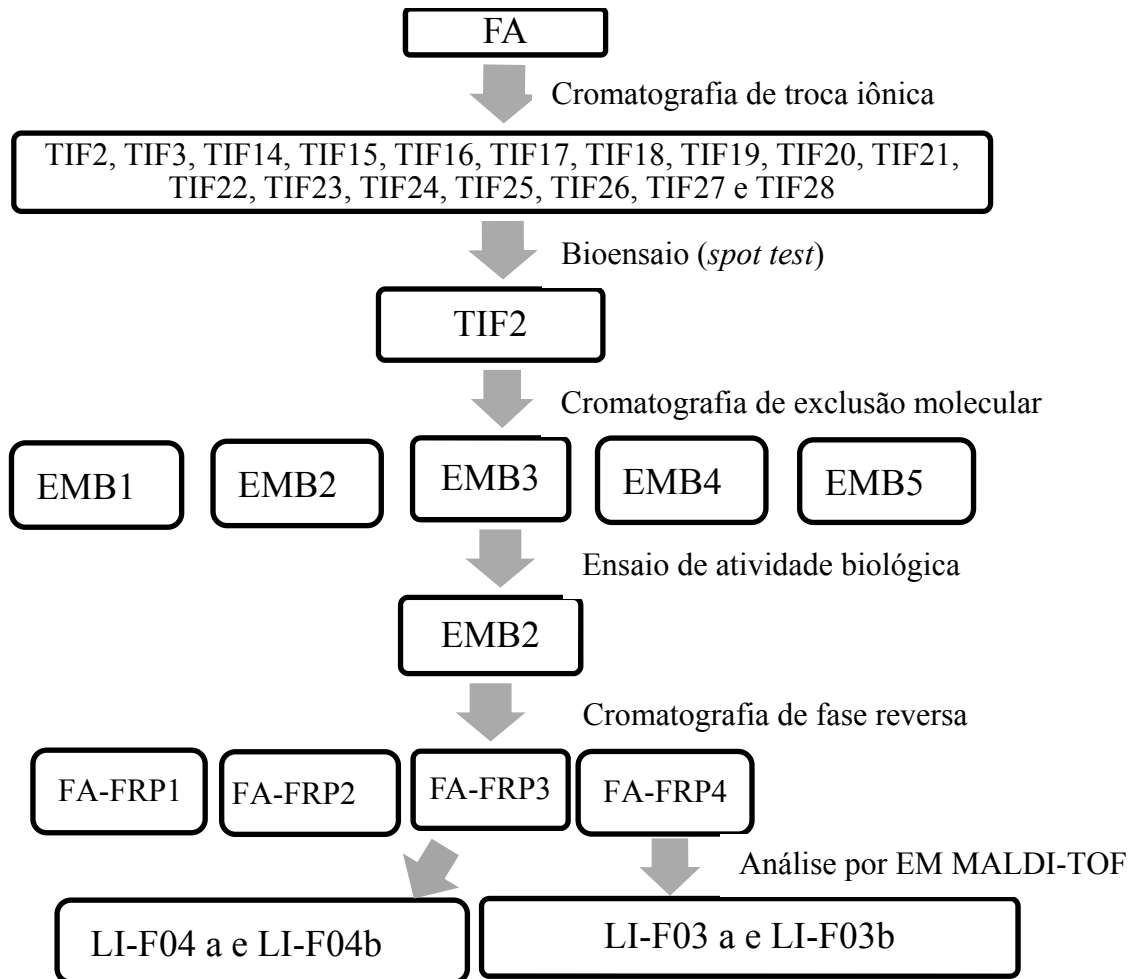


Figura 67. Representação esquemática da sequência utilizada para purificação e caracterização dos PAMs LI-F04a/b e LI-F03a/b.

4. Conclusões do Capítulo 2 - Parte III

As moléculas contidas na FA foram purificadas de modo bioguiado através de etapas cromatográficas sequenciais, que incluíram cromatografia de troca iônica, exclusão molecular e fase reversa.

A fração EMB2, separada por cromatografia de exclusão molecular, demonstrou bioatividade contra *E. coli* e *S. aureus*.

Os picos FA-FRP3 e FA-FRP4, provenientes de EMB2 e resolvidos por cromatografia de fase reversa, são ativos contra *S. aureus*. Embora a fração EMB2 tenha demonstrado bioatividade contra *E. coli*, os picos não inibiram o microrganismo Gram-negativo possivelmente devido à baixa concentração de compostos.

FA-FRP3 e FA-FRP4 foram submetidos à análise por EM MALDI-TOF e MS/MS. O espectro de massas de FRP3 apresentou um pico significativo em m/z 915,581, e outro pico em m/z 901,559. Através do perfil de fragmentação foi possível identificar tais compostos como sendo os peptídeos LI-F04a (m/z 883) e LI-F04b (m/z 897) linearizados.

Os pares de picos significativos em FA-FRP4 incluíram m/z 979,607 – 1001,591 (aduto de sódio), m/z 965,587 – 987,569 (aduto de sódio). Os íons com m/z 965,587 e m/z 979,607 correspondem aos peptídeos LI-F03a (m/z 947) e LI-F03b (m/z 961) linearizados; isto foi concluído pois o mesmo perfil de fragmentação foi obtido pelas análises de MS/MS.

Este grupo de peptídeos, denominado LI-F, foi descrito por Kurusu & Ohba (1987) como sendo pertencentes a um grupo de depsipeptídeos que possuem uma cadeia lateral de ácido guanidino-3-hidroxipentadecanóico ligado a um grupo amino. Portanto, *P. polymyxa* RNC-D também foi capaz de produzir os compostos LI-F03a, LI-F03b, LI-F04a e LI-F04b.

5. Referências

Bastos MCF, Ceotto H, Coelho MLV, Nascimento JS. (2009) Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Cur Pharm Biotechnol*, 10: 38-61.

Beatty PH, Jensen SE (2002). *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Can J Microbiol* 48: 159–69.

Benetazzo NK, Etchegaray A (2011) Produção e aplicações de biossurfactantes e hidrolisados proteicos para descontaminação ambiental. *Anais XVI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas*. 1: 167-73. ISSN 1982-0178.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28: 235–42.

Biemann K (1990) Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). In *Mass Spectrometry*, McCloskey, J.A., Ed., *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, Appendix 5, pp. 886-7.

Boarini GB, Serrano NFG, Sousa CP (2013) Desenvolvimento de estratégia de fracionamento bioguiada de caldo fermentado por actinomiceto endofítico isolado de *Tabebuia roseo-alba*. *Anais do IV Simpósio de Biotecnologia da UFSCar*, 4: 47.

Bocchinfuso G, Palleschi A, Orioni B, Grande G, Formaggio F, Toniolo C, Park Y, Hahmc K-S, Stella L. (2009) Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations. *J Pept Sci*, 15: 550–558.

Bradshaw J (2003) Cationic antimicrobial peptides : issues for potential clinical use. *BioDrugs*, 17: 233–40.

Brown KL, Hancock RE. (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* 18: 24–30.

Cameotra S S, Makkar RS (2004) Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Op Microbiol*, (7): 262-66.

Cantu MD, Wulff NA, Palma MS, Carrilho E (2008) Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim Nova*, 31(3): 669-75

Chatterjee C, Paul M, Xie L, van der Donk WA (2005) Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Ver*, 105: 633-84.

Cassab GI. (1998) Plant cell wall proteins. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 281-309.

Clinical and Laboratory Standards Institute: *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement. M100-S21*. Wayne. 2011

Cooper MA, Shales D. (2011) Fix the antibiotics pipeline. *Nature* 472 (7341): 32.

Cseke *et al.* (2004) Bioseparation techniques and their application. In: *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. Editors: Leland J. Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai C-H. 2nd ed, CRC Press, LLC. ISBN 0-8493-0815-1.

Das P, Mukherjee S, Sen R (2008) Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol*;104(6):1675-84.

Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J (1990) Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 193-202.

Deng Y, Lu Z, Lu F, Wang Y, Bie X. (2011) Study on an antimicrobial protein produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol*, 27:1803–1807.

Deutcher MP (Ed) (1990) *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*, Vol. 182, Academic Press, New York,.

Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. (2009) The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des*, 15: 2377–92.

Dittmann E, Neilan BA, Borner T (2001) Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 467-73.

Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Ver*, 24: 85-106.

Etchegaray A *et al.* (2008) Effect of a highly concentrated lipopeptide extract on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, vol. 190, p.611-622.

Ezra D, Hess WM, Strobel GA. (2004) New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 150(12):4023-31.

Field D, Hill C, Cotter PD, Ross RP. (2010) The dawning of a ‘Golden era’ in lantibiotic bioengineering. *Mol Microbiol*, 78: 1077-87.

Finking R, Marahiel MA (2004) Biosynthesis of non-ribosomal peptides. *Annu Ver Microbiol*, 58: 453-88.

Folch J, Lees M, Sloane SGH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1): 497-509.

Fried B, Sherma J (1994) Thin Layer Chromatography: Techniques and Applications, 3rd ed., Dekker, New York.

Gerhardt P, Murray GGE, Wood WA, Krieg NR. (1994) Methods for general and molecular microbiology. In ASM publication. 791 p. Washington, D.C.

Giovannoni S. (1991) The polymerase chain reaction. In Nucleic acid techniques in bacterial systematic ed. Stachebrandt, E. and Goodfellow, M. pp 175-201. N.Y. : John Willy sons.

Giuliani A, Pirri G, Nicoletto S (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. Cent Eur J Biol, 2: 1–33.

Gunatilaka AAL. (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. J Nat Prod, 69: 509-526.

Guo Y, Huang E, Yuan C, Zhang L, Yousef AE. (2012) Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic. Appl Environ Microbiol, 78: 3156–65.

Glick BR. (1994) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can J Microbiol, 41: 109-117.

Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. (2010) A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. J Ind Microbiol Biotechnol, 37(8): 805-13.

Hancock WS (Ed) (1990) High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology, J. Wiley & Sons, New York.

Harris M, Mora-Montes HM, Gow NA, Coote PJ (2009) Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology* 155: 1058–70.

He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE. (2007) Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol*, 73(1): 168-78.

Herculano J, Lima TB, Benetazzo NK, Silva-Stenico ME, Etchegaray A (2011) Biossíntese e propriedades de lipopeptídeos de *Bacillus subtilis* produzidos em meios de cultura alternativos. *Anais da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, p.398.

Holl FB, Chanway CP. (1992) Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can J Microbiol*, 38: 303–308.

Holl FB, Chanway CP, Turkington R, Radley RA. (1988) Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem*, 20: 19–24.

Huang E, Yousef AE (2014, a) Paenibacterin, a novel broad-spectrum lipopeptide antibiotic, neutralises endotoxins and promotes survival in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis. *Int J Antimicrob Agents*.. pii: S0924-8579(14)00102-2.

Huang E, Yousef AE (2014, b) The lipopeptide paenibacterin binds to the bacterial outer membrane and exerts bactericidal activity through cytoplasmatic membrane damage. *Appl Environ Microbiol*, 80(9): 2700-04.

Jacques P. (2011) Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: G. Soberón-Chávez (ed.), *Biosurfactants, Microbiology Monographs*, vol. 20, p. 57-91, Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Jennings W (1987) *Analytical Gas Chromatography*, Academic, New York.

Jorgensen JH, Tunridge JD, Washington JA. (1999) Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods. In *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. pp. 1526-1543. Washington D.C.: American Society for Microbiology.

Kajimura Y, Kaneda M. (1996) Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *J Antibiotics*, 49: 129–135.

Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process*, 78: 53.

Knappe D, Cassone M, Nollmann FI, Otvos L, Hoffmann R (2014) Hydroxyproline substitutions stabilize non-glycosylated drosocin against serum proteases without challenging its antibacterial activity. *Protein Pept Lett*, 21(4): 321-9.

Katz E, Demain AL (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol Rev*, 41:449-74.

van Kraaij C, Breukink E, Rollema HS, Bongers RS, Kusters HA, Kruijff B, Kuipers OP (2000) Engineering a disulfide bond and free thiols in the lantibiotic nisin Z. *Eur J Biochem*, 267: 901-09.

Kurusu K, Ohba K. (1987) New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F07 and F08, produced by *Bacillus polymyxa*: isolation and characterization. *J Antibiotics*, 40: 1506–1514.

Lal S, Tabacchioni S. (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. Indian J Microbiol, 49: 2–10.

Lee KH (2002) Development of short antimicrobial peptides derived from host defense peptide or by combinatorial libraries. Curr Pharm, 8: 795-813

Lennon JJ (1997) Matrix assisted laser desorption ionization time of flight – mass spectrometry. In: <http://www.abrf.org/ABRFNews/1997/June1997/jun97lennon.html>.

Lindsay S (1992). High Performance Liquid Chromatography. 2nd ed. 337p., Springer, New York.

Liu Y-Q, Sun Z-J, Wang C, Li S-J, Liu Y-Z (2004) Purification of a novel antibacterial short peptide in Earthworm *Eisenia foetida*. Acta Biochim Biophys Sinica, 36(4): 297–302.

Mader JS, Hoskin DW. (2006) Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. Expert Opin Investig Drugs, 15: 933–46.

Mandal SM (2012) A novel hydroxyproline rich glycopeptide from pericarp of *Datura stramonium*: proficiently eradicate the biofilm of antifungals resistant *Candida albicans*. Biopolymers, 98(4): 332-37.

Mann M, Meng CK, Fenn JB (1989) Interpreting mass spectra of multiply charged ions. Anal Chem, 61(15): 1702-08.

McAuliffe O, Ross RP, Hill C (2005) Lantibiotics: structure and mode of action. FEMS Microbiol Rev, 25: 285-308.

Mageshwaran V, Walia S, Govindasamy V, Annapurna K (2011). Antibacterial activity of metabolite produced by *Paenibacillus polymyxa* strain HKA-15 against *Xanthomonas campestris* pv phaseoli. Indian J Exp Biol, 49: 229-33.

Meiller TF, Hube B, Schild L, Shirtliff ME, Scheper MA. (2009) A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS ONE*, 4: e5039.

Miller J.M (1988) *Chromatography: Concepts and Contrasts*, J. Wiley & Sons, New York.

Minamino M. *et al.* (2003). Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukemic cells. *Microbiology* 149, 2071 – 2081.

Mookherjee N, Hancock RE (2007) Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci*, 64: 922–33.

Morel CM, Mossialos E (2010) Stoking the antibiotic pipeline. *Br Med J*, 340: 1115-18.

Mossialos E, Morel CM, Edwards S, Berenson J, Gemmill-Toyama M, Brogan D (2009) Policies and Incentives for Promoting Innovation in Antibiotic Research.

Disponível em

http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/120143/E94241.pdf

Nagao J, Asaduzzaman SM, Aso Y, Okuda K, Nakayama J, Sonomoto K (2006) Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *J Biosci Bioeng*, 102(3): 139-49.

Nika H, Hawke DH, Angeletti RH (2014) C-terminal protein characterization by Mass Spectrometry: isolation of C-terminal fragments from cyanogen bromide-cleaved protein. *J Biomol Tech*, 25(1): 1-18.

Nissen-Meyer J, Nes IF (1997) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*, 167: 67-77.

Oedjijono M, Line A, Dragar C. (1993) Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biol Biochem*, 25: 247-250.

Ongena M, Jacques P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*, 16: 115-25.

Osapay G, Prokai L, Kim HS, Medzihradzky MF, Coy DH, Liapakis G, Reisine T, Malacini G, Zhu Q, Wang SHH, Mattern RH, Goodman M (1997) Lanthionine-somatostatine analogs: synthesis, characterization, biological activity and enzymatic studies. *J Med Chem*, 40: 2241-51.

Pacwa-Płociniczak M. *et al.* (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci*, (12): 633-54.

Papagianni M (2003) Ribossomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, functions and applications. *Biotechnol Adv*, 21:465-99.

Papo N, Shai Y. (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci*, 62(7-8): 784-90.

Peschel A, Sahl HG. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 4: 529–36.

Pessoa-Jr A, Kilikian BV (2005) Purificação de produtos de interesse biotecnológico. 988p.

Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. (2010) Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10): e1001067.

Pichard B, Larue JP, Thouvenot D. (1995) Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. *FEMS Microbiol Lett*, 133: 215–218.

Ratti RP, Serrano NFG, Hokka CO, Sousa CP. (2008) Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian Tropical Savannah plants against *Staphylococcus* coagulase positive strain. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 14(2): 294-302.

Ravi AV, Musthafa KS, Jegathammbal G, Kathiresan K, Pandian SK. (2007) Screening and evaluation of probiotics as biocontrol agente against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. Lett Appl Microbiol, 45: 219-223.

Raza W, Yang X, Wu H, Huang Q, Xu Y, Shen Q (2010) Evaluatio of metal ions Zn⁺², Fe⁺² e Mg ⁺² on the production offusaricidin-type antifungal compounds by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. Bioresour Technol, 101(23): 9264-71.

Rodrigues L. *et al.* (2006, a) Biosurfactants: potential applications in medicine. J Antimicrob Chem, 57: 609–18.

Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine. J Antimicrob Chemother, 57: 609-18.

Rosado AS, Seldin L. (1993) Production of a potentially novel antimicrobial substance by *Bacillus polymyxa*. World J Microbiol Biotech, 9: 521–528.

Rufino R D *et al.* (2011) Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Coll Surf B: Biointerf, 84: 1-5.

Schaller, K. D. *et al.* (2004) Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. Applied Biochemi-stry and Biotechnology, vol. 115, p.827-836.

Schenell N, Entian K-D, Schneider U, Gotz F, Zahner H, Kellner R, Jung G (1988) Prepeptide sequence of epidermin, a ribossomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. Nature, 333: 276-77.

Scopes RK. (1987) Protein Purification: Principles and Practice, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.

Shales D (2010). Antibiotics: The Perfect Storm. USA, Springer, ISBN 978-90-481-9057-7.

Shoji J, Kato T, Hinoo H (1977). The structure of polymyxin S. Studies on antibiotics from the genus Bacillus. J Antibiot, 30: 1035–41.

Serrano NFG, Rodrigues L, Hokka CO, Sousa CP, Teixeira JAC, Mussatto SI. (2012) Optimal glucose and inoculum concentrations for production of bioactive molecules by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. Chemical Papers, 66(12): 1111–1117.

Shai Y. (2002, a) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. Biopolymers, 66(4): 236-48.

Shai Y (2002, b) From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. Curr Pharm Des, 8: 715–25.

Shales D (2010). Antibiotics: The Perfect Storm. USA, Springer, ISBN 978-90-481-9057-7.

Shishido M, Masicotte HB, Chanway CP. (1996) Effect of plant growth promoting *Bacillus* strains on pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection. Ann Botany, 77: 433–441.

Shoji J, Hinoo H, Katayama T, Nakagawa Y, Ikenishi Y, Iwatani K, Yoshida T (1992) Structures of new peptide antibiotics, plusbacins A1-A4 and B1-B4. J Antibiot (Tokyo), 45(6): 824-31.

Spinosa HS (2002) Antibióticos: Aminoglicosídeos, Polimixinas, Bacitracina e Vancomicina. In Spinosa, H.S., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 3 ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p 418-419.

Steinstraesser L, Koehler T, Jacobsen F, Daigeler A, Goertz O. (2008) Host defense peptides in wound healing. *Mol Med*, 14: 528–37.

Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Perelygin VV, Mitsevich IP, Levchuck VP (2005) *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. *J Food Prot*, 68: 1450-53.

Svetoch, E.A. *et al.* (2005). Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. In *J. Food Prot.*, 68(1):11-17.

Tabb DL, Smith LL; Brexi LA, Vysocki VH, Lin D, Yates JR (2003) Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. *Anal Chem*, 75(5): 1155-63.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40: 722-56.

TATFAR (2014) Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance: Progress report. Disponível em: http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/TATFAR-Progress_report_2014.pdf.

Tupinambá G, da Silva AJR, Alviano CS, Souto-Padron T, Seldin L, Alviano DS. (2008) Antimicrobial activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against some mycotoxin-producing fungi. *J Appl Microbiol*, 105(4): 1044-53.

Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Ther*, 55: 27–55.

Yuen GY, Godoy G, Steadman JR, Kerr ED, Craig ML. (1991) Epiphytic colonization of dry edible bean by bacteria antagonistic to *Sclerotinia sclerotinum* and potential for biological control of white mould disease. *Biol Control*, 1: 293-301.

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–95.

Zhang XC, Sun ZJ, Zhuo RP, Hou QM, Lin GQ (2002) Purification and characterization of two antibacterial peptides from *Eisenia foetida*. *Prog Biochem Biophys*, 29(6): 955-60.

Capítulo 3

Caracterização por espectroscopia de fotoluminescência do extrato total e frações produzidos por *P. polymyxa* RNC-D

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	174
LISTA DE FIGURAS	175
RESUMO	180
ABSTRACT	181
1. Introdução	182
1.1 Breve história da Fotoluminescência: Fosforescência e Fluorescência.....	182
1.2 Fotoluminescência como Fenômeno Físico.....	186
1.3 Fotoluminescência em Sistemas Biológicos.....	192
2 Experimental	194
2.1 Equipamentos.....	194
2.2 Preparo dos inóculos das cepas bacterianas e fúngica	198
2.3 Preparo das amostras ET, FA e ELP.....	199
2.4 Preparo das lâminas.....	200
3. Resultados e discussão	201
4. Conclusões	233
5. Referências	233

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primeiras etapas na história da luminescência (constituída pelos fenômenos de fluorescência ou fosforescência)..... 182

Tabela 2. Informação proporcionada por sondas com fotoluminescência/fluorescência em diversos campos..... 193

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema mostrando o espectro eletromagnético. No círculo pontilhado em vermelho, destacamos as frequências correspondentes ao espectro eletromagnético visível (<http://commons.wikimedia.org/>)..... 183
- Figura 2.** Esquema mostrando os tipos de interação *radiação-matéria* relacionados com a luminescência, e, especificamente, com a *fotoluminescência*..... 184
- Figura 3.** Corantes chamados pontos quânticos, baseados em quantidades nanométricas de substâncias que apresentam luminescência, podem revelar simultaneamente os pormenores de muitas estruturas celulares. Nesta fotografia, o núcleo aparece em azul, uma proteína específica no interior do núcleo aparece em cor de rosa, as mitocôndrias em amarelo, os microtúbulos em verde e os filamentos de actina em vermelho (extraído de Quantum Dot Corp., Hayward, California)..... 186
- Figura 4.** Esquema mostrando os três processos pelos quais um elétron pode ganhar ou perder energia através da luz no fenômeno de fotoluminescência..... 187
- Figura 5.** Diagrama de bandas de energia de um material semiconductor, indicando as transições eletrônicas possíveis..... 189
- Figura 6.** Esquema mostrando os três passos básicos do fenômeno de fotoluminescência.. 190
- Figura 7.** Esquema simplificado de um experimento de fotoluminescência..... 190
- Figura 8.** Espectro de fotoluminescência, em temperatura ambiente, de um diodo Gunn (DOVER, 1971)..... 191
- Figura 9.** Diversos processos pelos quais uma radiação de energia $E=h\nu$ pode interagir com uma molécula de tal maneira que ela fique num estado excitado de energia (Yu & Cardona, 2005)..... 192
- Figura 10.** Imagem do equipamento experimental utilizado neste trabalho para o estudo da fotoluminescência, pertencente ao Grupo de Semicondutores do Departamento de Física da UFSCar..... 194
- Figura 11.** Montagem experimental utilizada neste trabalho para o estudo da fotoluminescência..... 195
- Figura 12.** (a) geração e desvio da luz de laser de argônio; (b) ingresso desse feixe no primeiro monocromador (caixa à esquerda na foto)..... 195
- Figura 13.** Imagem do primeiro monocromador, utilizado para conseguir o estreitamento da linha de luz utilizada para o estudo do fenômeno da fotoluminescência..... 196
- Figura 14.** (a) Amostra montada no microscópio em lâmina de vidro; (b) feixe de laser incidindo sobre a amostra montada em lâmina de vidro..... 196

Figura 15. (a) Criostato de fluxo contendo a amostra, sob o feixe de laser incidindo sobre a amostra; (b) detalhe da imagem anterior..... 197

Figura 16. Equipamento eletrônico (voltímetro digital) para monitoramento da temperatura; observe que o painel do equipamento está marcando a temperatura de 8K (-265°C)..... 197

Figura 17. Caixa isotérmica com gelo utilizada para transporte e preservação das suspensões microbianas..... 198

Figura 18. Bioensaio contra *E. coli* (*spot test*) das amostras ET, FA e ELP utilizadas para análise de espectroscopia de fluorescência..... 199

Figura 19. Preparação de cada microrganismo adicionando ELP em placa de vidro..... 200

Figura 20. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Staphylococcus aureus* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência para a bactéria pura com máximo ao redor dos 700 nm, o qual desaparece nas outras duas situações experimentais. Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de 540 nm..... 202

Figura 21. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Staphylococcus aureus* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) e (b) bactéria pura; (c) bactéria mais ELP, e (d) bactéria mais ELP após 30 minutos. Em todas as curvas observamos um pico estreito (que diminui de intensidade quando adicionado o ELP) superposto a um pico largo, ambos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm. Para a bactéria pura (b), observamos mais um pico de luminescência de menor intensidade ao redor de $\lambda = 690.5$ nm. Este pico desaparece permanentemente ao adicionar ELP..... 203

Figura 22. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Enterococcus faecalis* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência tanto para a bactéria pura (curva vermelha) quanto para a situação após 30 minutos de adicionado o ELP (curva azul). Este pico, com máximo ao redor de $\lambda \sim 700$ nm, desaparece (curva verde) logo após a adição do ELP à bactéria pura e reaparece dentro do intervalo de 30 minutos (curva azul). Nas duas primeiras situações experimentais (curvas vermelha e verde) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, que desaparece (curva azul) dentro do intervalo de 30 minutos. Também, o espectro após 30 minutos de adicionado o ELP à bactéria (curva azul), mostra picos estreitos (Raman) abaixo de $\lambda = 500$ nm..... 205

Figura 23. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Enterococcus faecalis* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) e (b) bactéria pura; (c) bactéria mais ELP, e (d) e (e) bactéria mais ELP após 30 minutos. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência tanto para a bactéria pura (curva vermelha, $\lambda = 694,3$ nm) quanto para a situação após 30 minutos de adicionado o ELP (curva azul, $\lambda = 694,5$ nm). Este pico, desaparece (curva verde) logo após a adição do ELP à bactéria pura e reaparece dentro do intervalo de 30 minutos (curva azul). Nas duas

primeiras situações experimentais (curvas vermelha e verde) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, que desaparece (curva azul) dentro do intervalo de 30 minutos..... 206

Figura 24. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Enterococcus faecalis* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa (Figura 22a), mostrando o aparecimento de picos de Raman em aproximadamente 470 nm e 482 nm, após 30 minutos de adicionado o ELP à bactéria..... 207

Figura 25. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Candida albicans* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda. Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de 540 nm..... 209

Figura 26. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Candida albicans* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) bactéria pura; (b) bactéria mais ELP, e (c) bactéria mais ELP após 30 minutos. Em todas as curvas observamos um pico estreito (que diminui de intensidade quando adicionado o ELP) superposto a um pico largo, ambos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm..... 210

Figura 27. Detalhe dos espectros de fotoluminescência para a amostra de *Candida albicans* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de um pico estreito (provavelmente *duplo*) superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda..... 211

Figura 28. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Escherichia coli* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo e muito intenso de luminescência ao redor dos 700 nm para a bactéria pura o qual desaparece permanentemente após adicionado o ELP (curvas verde e azul). Nos experimentos onde se adicionou EPL (curvas verde e azul) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O espectro para a bactéria pura (curva vermelha) mostra um pico largo de luminescência para $\lambda = 540$ nm e ainda exibe picos de luminescência de intensidade menor abaixo de 500 nm. A experimento para a bactéria pura (curva vermelha) não exibe o pico estreito de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm..... 213

Figura 29. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Escherichia coli* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) bactéria pura; (b) bactéria mais ELP, e (c) bactéria mais ELP após 30 minutos. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo e muito intenso de luminescência em $\lambda = 700,5$ nm para a bactéria pura (curva vermelha) o qual desaparece permanentemente após adicionado o ELP (curvas verde e azul). Nos experimentos onde se adicionou EPL (curvas verde e azul) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O espectro para a bactéria pura (curva vermelha) mostra um pico largo de luminescência para $\lambda = 540$ nm e ainda exibe picos estreito (Raman) abaixo de 500 nm. Aqui fica evidente que a bactéria pura (curva vermelha) não exibe o pico estreito de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm que aparece após adicionado o ELP..... 214

Figura 30. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência para a bactéria pura com máximo ao redor de $\lambda = 700$ nm, o qual ainda desaparece nas outras duas situações após a adição do ELP à bactéria pura. Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O espectro da bactéria pura (curva vermelha) também mostra picos de luminescência abaixo dos 500 nm. Os espectros obtidos após a adição do ELP à bactéria (curvas verde e azul), mostram picos estreitos (Raman) abaixo de 500 nm..... 216

Figura 31. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) bactéria pura; (b) bactéria mais ELP, e (c) bactéria mais ELP após 30 minutos. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência para a bactéria pura (curva vermelha) com máximo ao redor de $\lambda = 700,8$ nm, o qual ainda desaparece nas outras duas situações após a adição do ELP (curvas verde e azul). Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm sem mudanças aparentes na sua intensidade nos três experimentos. O espectro da bactéria pura (curva vermelha) também mostra picos de luminescência abaixo dos 500 nm. Os espectros obtidos após a adição do ELP à bactéria (curvas verde e azul), mostram picos estreitos (Raman) abaixo de 500 nm..... 217

Figura 32. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa (Figura anterior). Destaca-se aqui o aparecimento de picos estreitos (Raman) tanto logo após a adição do ELP à bactéria pura, quanto após transcorridos 30 minutos, para $\lambda = 463,56$ nm, $\lambda = 465,84$ nm, e $\lambda = 472,52$ nm..... 218

Figura 33. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para dados sem normalizar, mostrando o aparecimento de picos (provavelmente *duplos*) estreitos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm, superpostos a picos largos também de luminescência, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda..... 219

Figura 34. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa (Figura 24), mostrando o aparecimento de picos de luminescência ao redor de $\lambda = 470$ nm e $\lambda = 482$ nm, para a bactéria pura..... 219

Figura 35. Espectros de fotoluminescência comparativos para todos os microrganismos puros mencionados anteriormente para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos de luminescência e de Raman com diferentes características e em diversos comprimentos de onda..... 221

Figura 36. Detalhe dos espectros de fotoluminescência comparativo para todos os microrganismos puros mencionados anteriormente para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos de luminescência em $\lambda = 470,26$ nm e $\lambda = 482,36$ nm..... 222

Figura 37. (a) Espectros de fotoluminescência comparativo para todos os microrganismos puros adicionado de ELP para dados sem normalizar, mostrando o aparecimento de picos de luminescência de diferentes características ao redor de $\lambda = 540$ nm; (b) detalhe do mesmo espectro da figura (a)..... 223

Figura 38. Espectros de fotoluminescência comparativo para todos os microrganismos puros adicionados de ELP após 30 minutos para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos de luminescência e picos de Raman de diferentes características e em diversos comprimentos de onda..... 224

Figura 39. Espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8K$) para amostra de ELP para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos largos de luminescência em torno de $\lambda = 540$ nm com pico (também de luminescência) mais estreito (curva azul), superposto em temperatura ambiente mas que desaparece em baixas temperaturas (curva vermelha)..... 226

Figura 40. Espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8K$) para amostra de ET para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos largos de luminescência com máximo ao redor de $\lambda = 550$ nm..... 227

Figura 41. Espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8K$) para amostra de FA para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa do pico largo de luminescência com máximo ao redor de $\lambda = 550$ nm, e mostrando o aparecimento de picos de Raman estreitos ao redor de $\lambda = 700$ nm..... 228

Figura 42. Detalhes do espectro de fotoluminescência em baixa temperatura ($T = 8K$) para amostra de FA para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa do pico mais alto com máximo ao redor de $\lambda = 699$ nm, e mostrando o aparecimento de dois picos de Raman ao redor de $\lambda = 697$ nm e $\lambda = 699$ nm. Estes picos de Raman não aparecem em temperatura ambiente (RT)..... 229

Figura 43. Comparação dos comportamentos para (a) bactérias puras, (b) após a adição de ELP e (c) após a adição de ELP passados 30 minutos, para *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*. A semelhança entre ambos conjuntos de curvas é muito significativa..... 230

Figura 44. Comparação dos comportamentos para (a) as bactérias puras e (b) após a adição de ELP para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. A semelhança entre ambos conjuntos de curvas é muito significativa..... 231

Figura 45. Comparação dos comportamentos para após 30 minutos da adição de ELP para (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Enterococcus faecalis*. Neste caso, não é observada semelhança entre ambos conjuntos no sentido observado nas Figuras 43 e 44..... 232

Resumo

Neste trabalho de doutorado também foi realizado o estudo da fotoluminescência do extrato lipopeptídico (ELP), do extrato total (ET) e da fração aquosa (FA) tanto em temperatura ambiente (RT) quanto em baixa temperatura (T=8K). Também se estudou, através desta técnica, a ação do ELP sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 1578 e fungo *Candida albicans* ATCC 10231 em duas situações: (a) imediatamente após a mistura do ELP com a suspensão celular, e (b) trinta minutos após a mistura. A emissão fotoluminescente foi colhida por um espectrômetro triplo (três grades de difração) da marca Jobin Yvon, modelo T64000, equipado com microscópio óptico. Para a detecção da radiação emitida pela amostra utilizou-se uma câmera CCD (*charge coupled device*) refrigerada por nitrogênio líquido. As fendas do espectrômetro foram ajustadas para produzir uma resolução espectral da ordem de 10^{-4} nm. A fonte de excitação utilizada foi a linha de 457 nm (violeta) de um laser de argônio. Os comportamentos aqui observados para a fotoluminescência dos microrganismos estudados evidenciam enorme potencial de aplicação dos mesmos biosensores e marcadores moleculares.

Keywords: espectroscopia de fotoluminescência, espectroscopia Raman, extrato total, fração aquosa, extrato lipopeptídico, suspensões bacterianas

Abstract

In this doctoral work we have also carry out the study of the photoluminescence of the lipopeptide extract (ELP), the total extract (ET) and aqueous fraction (FA) both at room temperature (RT) and low temperature ($T = 8\text{K}$). We have also studied by using this technique the action of the ELP on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 1578 and *Candida albicans* ATCC 10231 in two different situations: (a) immediately after mixing ELP with the bacterial and fungus cell suspension, and (b) after thirty minutes. The photoluminescence emission was collected by a triple spectrometer (three diffraction gratings) T64000 model from Jobin Yvon, equipped with an optical microscope. For the detection of the radiation emitted by the sample we used a CCD camera (charge coupled device) cooled by liquid nitrogen. The slits of the spectrometer were adjusted to produce a spectral resolution of the order of 10^{-4} nm. The excitation source used was the line of 457 nm (violet) from an argon laser. The behaviors here observed indicate a strong potential for applications in biosensors as well as molecular markers.

Keywords: photoluminescence spectroscopy, Raman spectroscopy, total extract, aqueous fraction, lipopeptide extract, bacterial suspensions

1. Introdução

1.1 Breve história da Fotoluminescência: Fosforescência e Fluorescência

O fenômeno da *luminescência* consiste na emissão de fótons na faixa de energias do espectro do ultravioleta, do visível ou do infravermelho por moléculas que estão em um estado eletronicamente excitado. A palavra *luminescência* vem do latim (*lumen* = luz). É interessante notar que a radiação proveniente de um processo de luminescência é uma luz fria (nao significa aumento de temperatura do sistema em que ela ocorre), enquanto que a luz proveniente da incandescência de um filamento é luz quente. A palavra *luminescenz* foi usada por Eilhardt Wiedemann em 1888 para descrever todos os fenômenos que envolvem a emissão de luz e que não resultam no aumento da temperatura de um sistema. Na Tabela 1 mostramos os fatos históricos mais relevantes em relação a este fenômeno (DOVER, 1971; YU; CARDONA, 2005).

Tabela 1. Primeiras etapas na história da luminescência (constituída pelos fenômenos de fluorescência ou fosforescência).

Ano	Cientista	Observação
1565	N. Monardes	Emissão de luz por uma infusão de madeira chamada <i>Nephriticum Lignum</i> .
1602	V. Cascariolo	Emissão de luz pela <i>pedra de Bolonha</i> (primeira observação de fosforescência).
1640	Licetus	Estudo da <i>pedra de Bolonha</i> . Primeira definição de fluorescência.
1833	D. Brewster	Emissão de luz por soluções de clorofila e cristais de fluorita.
1842	E. Becquerel	Emissão de luz por sulfureto de cálcio com excitação no UV. Primeira vez que se estabelece que a luz emitida é de comprimento de onda maior do que a luz incidente.
1845	J. Herschel	Emissão de luz de soluções de sulfato de quinina (chamado dispersão epipólica).
1852	G. G. Stokes	Emissão de luz por soluções de sulfato de quinina com excitação no UV.
1853	G. G. Stokes	Introdução do termo <i>fluorescência</i> .
1858	E. Becquerel	Construção do primeiro fosforoscópio.
1867	F. Goppelsro	Primeiro análise fluorométrico (determinação de Al (III) pela sua fluorescência).
1871	A. L. V. Baeyer	Síntese de fluoresceína.
1888	E. Wiedemann	Introdução do termo <i>luminescência</i> .

O material mais famoso que brilha no escuro após a exposição à luz é o fósforo de Bologna descoberto por Vincenzo Cascariolin um sapateiro Bolognese em 1602, que tinha como hobby a alquimia.

A etimologia do termo de fluorescência não é simples. É estranho que o termo contenha a palavra *flúor*, que não é conhecida por ser uma substância fluorescente.

O termo fluorescência foi introduzida por Sir George Gabriel Stokes, um físico e professor de matemática na Universidade de Cambridge, em meados do século XIX.

A primeira observação experimental da fluorescência foi realizada por um físico espanhol, Nicolas Monardes, em 1565. Ele descreveu a cor azul (que ele disse ser maravilhosa e única) decorrente da infusão da madeira *Nephriticum Lignum*, mas à época o fenômeno não foi entendido.

Stokes trabalhava decompondo a luz solar através de um prisma. Ao colocar um tubo com uma solução de sulfato de quinina na parte visível do espectro eletromagnético (Figura 1), nada aconteceu: a solução permaneceu clara e transparente. Entretanto, ao mover ela para a parte ultravioleta do espectro, a solução passou a emitir luz azul. Stokes estabeleceu que a luz emitida é sempre de maior comprimento de onda, e, portanto, de menor energia, do que a luz absorvida pela molécula. Isto é conhecido como a *lei de Stokes*.

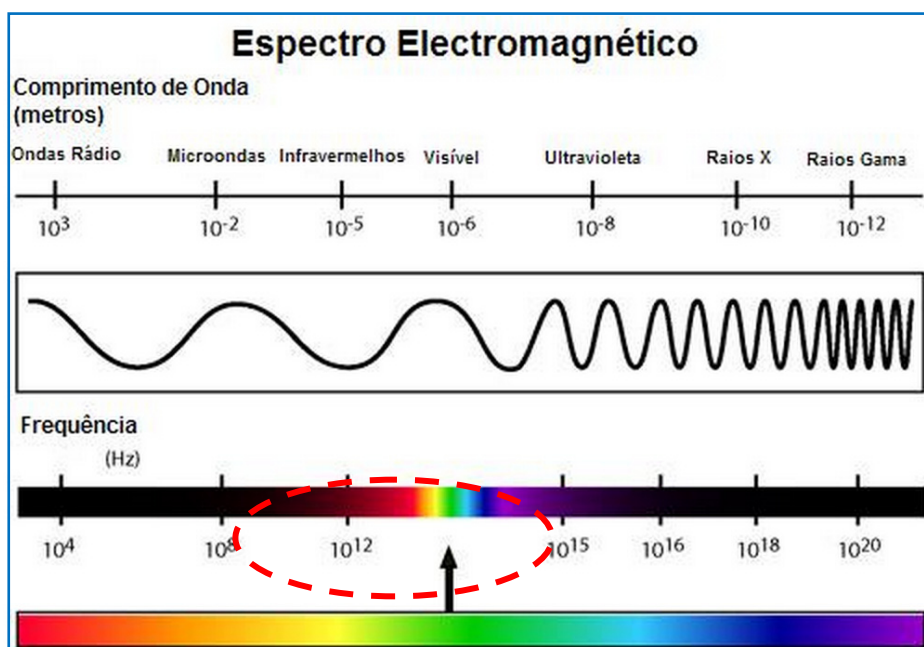


Figura 1. Esquema mostrando o espectro eletromagnético. No círculo pontilhado em vermelho, estão destacadas as frequências correspondentes ao espectro eletromagnético visível (<http://commons.wikimedia.org/>).

Os compostos luminescentes podem ser de tipos muito diferentes, por exemplo:

- Compostos orgânicos: hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, perileno, etc.).
- Fluoresceína, rodaminas, cumarinas, oxazinas, políenos difenilpolíenos, aminoácidos, triptofano, tirosina, fenilalanina, etc.
- Compostos inorgânicos como os íons uranila (UO_2^+), e os lantanídeos (Eu^{3+} , Tb^{3+}).
- Vidros dopados (por exemplo com Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag) e cristais (por exemplo, ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cr}^{3+}$), etc.

Como mostrado na Figura 2, a fluorescência e a fosforescência são casos particulares do fenômeno de luminescência. Como será mais detalhadamente abordado na seção 1.2, o modo de excitação que leva a estes fenômenos se dá através da absorção de um fóton, que coloca as moléculas que o absorvem em um estado eletronicamente excitado. A emissão de fótons que acompanha o posterior processo de des-excitação (ou também chamado de *desativação*) é chamado de *fotoluminescência*.

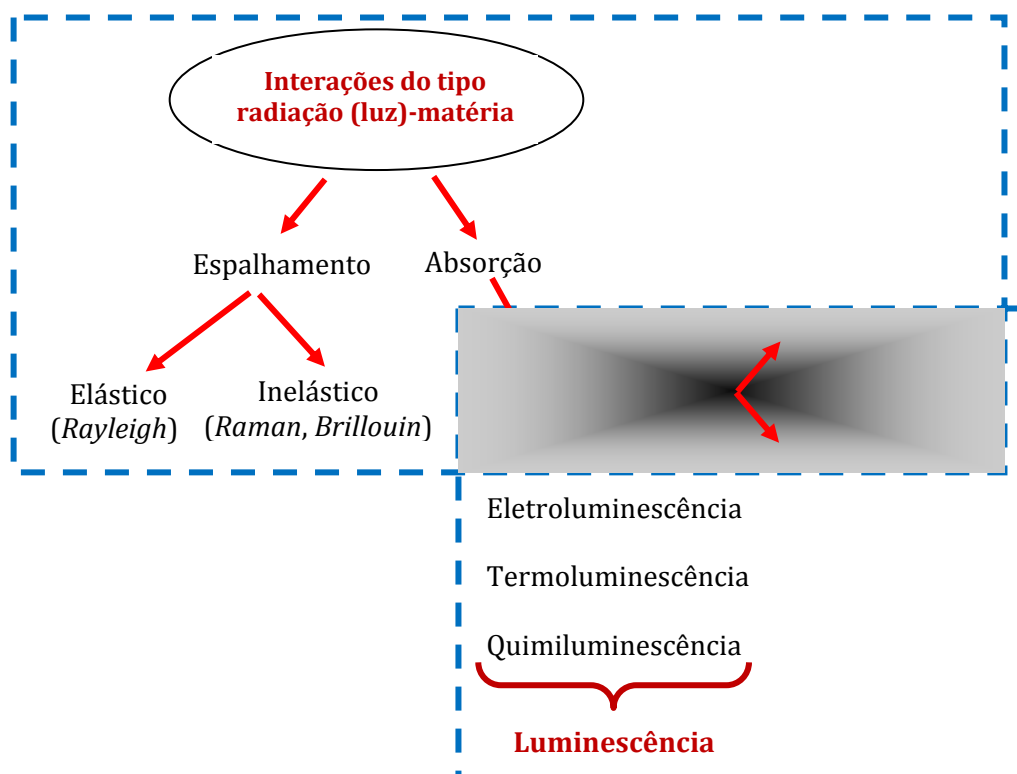


Figura 2. Esquema mostrando os tipos de interação *radiação-matéria* relacionados com a luminescência, e, especificamente, com a *fotoluminescência*.

Uma aplicação muito interessante do fenômeno da luminescência está associado com uma nova tecnologia denominada *quantum dots* (pontos quânticos). Nela, são utilizados cristais microscópicos semicondutores para marcar proteínas e genes específicos, dentre outros materiais biológicos. Os cristais, cada um com diâmetro da ordem de alguns nanômetros (10^{-9} m) irradiam cores brilhantes quando expostos a radiação ultravioleta através do fenômeno de fotoluminescência anteriormente descrito. Pontos diferindo ligeiramente de tamanho brilham com diferentes cores fluorescentes – os pontos maiores brilham de vermelho enquanto que os pontos menores possuem um brilho azul existindo, pelo meio, uma gama enorme de cores (Figura 3).

Tem sido possível criar até 40 000 marcadores diferentes misturando pontos quânticos de diferentes cores e intensidades. Podem ser usados para visualizar moléculas individuais ou, tal como as técnicas de marcação mais antigas, para visualizar todas as moléculas de um determinado tipo.

Os pontos quânticos prometem um avanço, não só na biologia celular mas num conjunto de outras áreas. Um dia, esta tecnologia poderá permitir a análise rápida de milhares de genes e proteínas e adequar, por exemplo, o tratamento clínico ao perfil molecular de cada paciente. Estes pontos brilhantes poderão contribuir para melhoramentos na velocidade, rigor e custos de testes de diagnóstico, desde testes para infecção por HIV até alergias. Além disso, uma vez combinados com medicamentos, os pontos quânticos podem dirigir a dose certa de uma substância química directamente para um determinado tipo de célula. Certamente, dispor de substâncias biológicas tais como peptídeos e proteínas que exibam o fenômeno de luminescência, pode permitir enormes avanços nesta área.

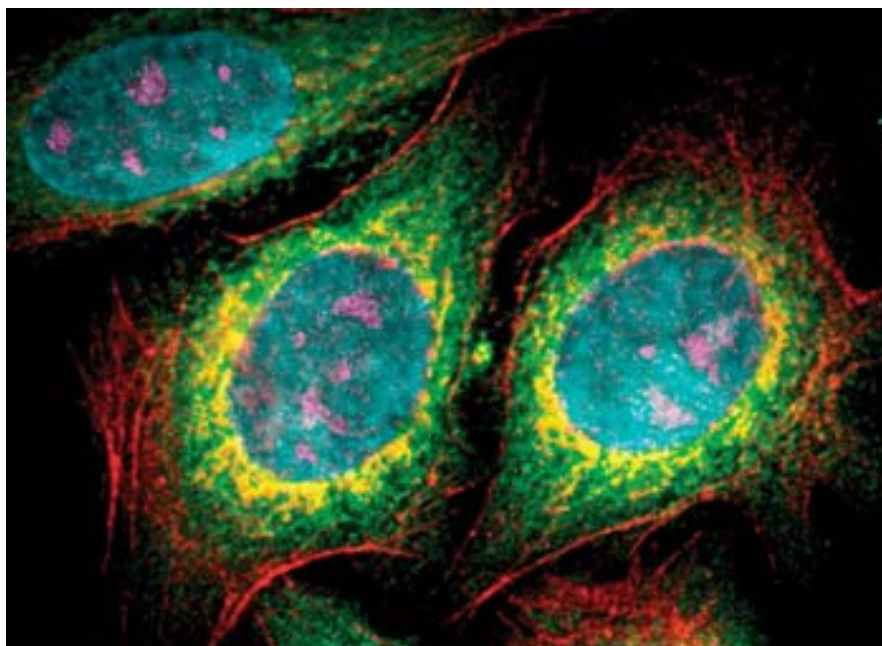


Figura 3. Corantes chamados pontos quânticos, baseados em quantidades nanométricas de substâncias que apresentam luminescência, podem revelar simultaneamente os pormenores de muitas estruturas celulares. Nesta fotografia, o núcleo aparece em azul, uma proteína específica no interior do núcleo aparece em cor de rosa, as mitocôndrias em amarelo, os microtúbulos em verde e os filamentos de actina em vermelho (extraído de Quantum Dot Corp., Hayward, California).

1.2 Fotoluminescência como Fenômeno Físico

Como visto na seção anterior, por luminescência entende-se a emissão de luz de um certo material. Dependendo de qual é o estímulo que provoca essa emissão de luz, teremos diferentes processos e nomes para eles. Por exemplo, a *catodoluminiscencia* consiste na emissão de luz causada quando um feixe de elétrons, ou a *eletroluminescência* que consiste na emissão de luz após uma corrente elétrica passar pelo material. A *fotoluminescência* está relacionada com a emissão de luz através da iluminação do material com uma radiação (luz) específica.

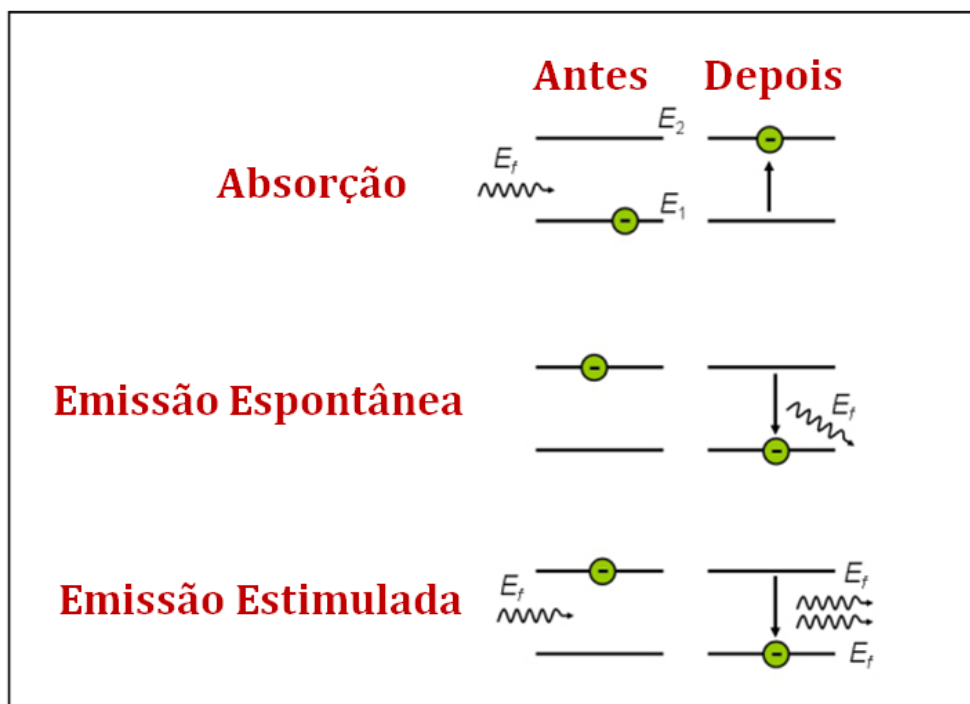


Figura 4. Esquema mostrando os três processos pelos quais um elétron pode ganhar ou perder energia através da luz no fenômeno de fotoluminescência.

A fotoluminescência consiste essencialmente em fazer que o material que queremos estudar absorva energia na forma de luz, e que, em seguida, perca uma fração dessa energia também como luz. É esta luz emitida pelo material que nos dá a informação que procuramos. Em geral, o ganho ou a perda de energia pelo material em um experimento de fotoluminescência é realizado fazendo que seus elétrons ganhem ou percam energia, como mostrado na Figura 4.

No primeiro processo, chamado de absorção, considerando que o material tem um nível de energia E_1 no qual existe um elétron e um nível de energia E_2 , maior que E_1 , que está vazio. Nesta situação, se surgir um fóton (ou *quantum* de luz) que tenha exatamente a mesma energia que separa os dois níveis (isto é, se a energia de fóton for $E_f = E_2 - E_1$) pode acontecer que o elétron em E_1 absorva esse fóton e seja promovido ao nível de energia E_2 . Pela teoria quântica, isso só pode ocorrer se a energia do fóton for exatamente igual à energia que separa os dois níveis de energia. Ou seja, o elétron pode absorver ou toda a energia do fóton ou nenhuma, mas ele não pode absorver apenas uma parte dela.

Agora que o elétron se encontra no nível de energia mais alto, E_2 , duas coisas podem acontecer. A primeira é que o elétron, por si só, retorne ao nível inicial de energia, E_1 , perdendo a energia que o separa do mesmo através da emissão de um novo fóton de energia

$E_f = E_2 - E_1$. Este fóton é emitido com fase e direção aleatórias. Ou seja, ele pode ir em qualquer direção e as suas propriedades não dependem de nada que tenha acontecido antes. Este fenômeno é conhecido como *emissão espontânea*.

Esses dois fenômenos, *absorção* e *emissão espontânea*, estão envolvidos na técnica de fotoluminescência aqui abordada. Para se ter uma visão completa deste processo, é necessário considerar um terceiro fenômeno que, embora não seja particularmente significativo para a fotoluminescência, é o responsável pelo princípio de funcionamento do laser: a *emissão estimulada*.

Mais uma vez, parte-se da situação em que o elétron está no estado de maior energia, E_2 . Desta vez, no entanto, ao adicionar mais um fóton que, novamente, tem exatamente a energia que separa os dois níveis de energia. O fóton interage com o elétron e os dois níveis de energia, causando que o elétron em E_2 volte ao nível E_1 e que seja emitido um novo fóton, como antes, com energia igual àquela que existe entre os dois níveis eletrônicos. Ao contrário do processo anterior, o fóton emitido *estimuladamente*, além de ter a mesma energia que o fóton incidente, ele tem a mesma direção e a mesma fase. Ter a mesma fase significa que os dois fótons têm suas intensidades somadas. Dessa maneira, inicia-se com um fóton e um elétron excitado, e termina-se com dois fótons que viajam juntos. O que foi feito através deste processo é amplificar a intensidade da luz, que é o princípio básico dos lasers.

Ao considerar-se um material semicondutor, a única diferença com o caso anteriormente descrito é que, em lugar de níveis de energia, no material semicondutor ter-se-á *bandas* de energia permitidas. Os elétrons têm uma banda de energia correspondente, que se denomina de *banda de valência* (equivalente ao nível de energia E_1 do exemplo anterior). Eles podem aumentar a sua energia para atingir a chamada *banda de condução* (equivalente ao nível de energia E_2 do exemplo anterior). Isto pode ocorrer desde que se forneça aos elétrons da banda de valência uma energia que seja pelo menos igual àquela do intervalo que separa a banda de valência da banda de condução (chamada de banda *proibida* ou *gap*), como mostrado na Figura 5.

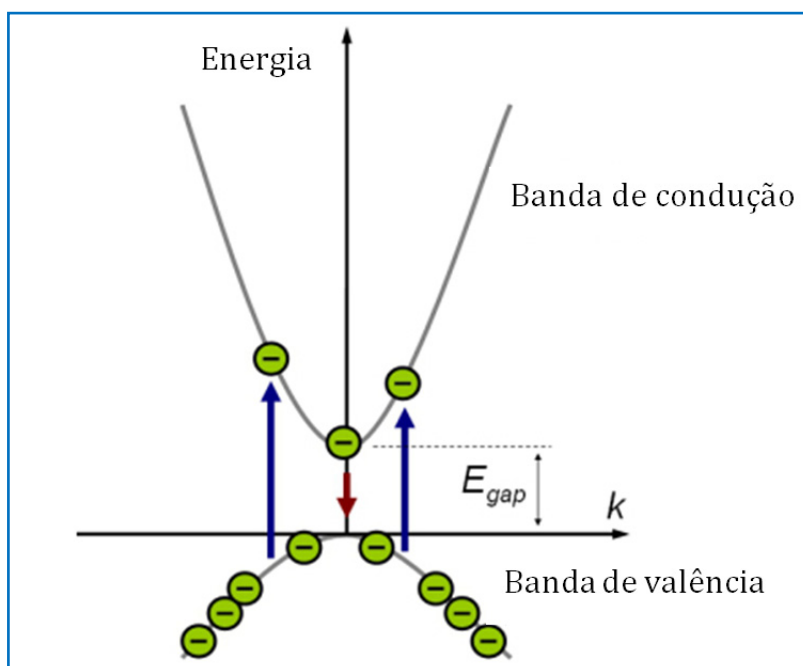


Figura 5. Diagrama de bandas de energia de um material semiconductor, indicando as transições eletrônicas possíveis.

Na Figura 5 são mostradas as energias das bandas de valência e de condução (em função do vetor de onda, k), sendo que a primeira está cheia e a segunda está parcialmente ocupada. Nesta situação, os elétrons da banda de valência podem absorver energia da luz que ilumina o material desde que a energia dos fótons associados com essa luz tenha energia maior que àquela do *gap*. Essas transições estão desenhadas com setas azuis. Cada vez que um elétron absorve um fóton e pula para a banda de condução, ele deixa um buraco na banda de valência. Este buraco é também considerado como um tipo de *partícula*.

Também pode acontecer que os elétrons retornem para a banda de valência, emitindo um fóton que, novamente, tem que ter energia igual à diferença entre as energias inicial e final do elétron (seta vermelha).

O experimento de fotoluminescência pode ser representado através de um diagrama de bandas como aquele da Figura 6. Basicamente, ocorrem três etapas. Em primeiro lugar, o material absorve um fóton de energia E_f da luz incidente e um elétron passa da banda de valência para a banda de condução, deixando um buraco na banda de valência.

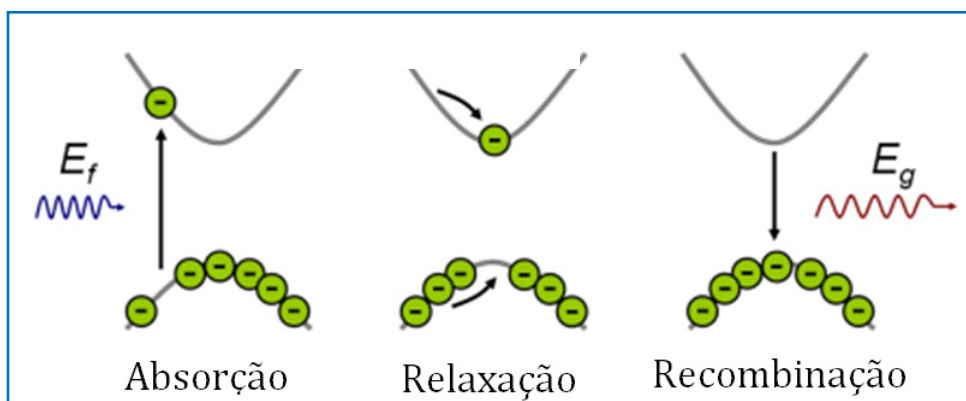


Figura 6. Esquema mostrando os três passos básicos do fenômeno de fotoluminescência.

A seguir, como consequência do princípio de conservação e minimização da energia, o buraco deixado pelo elétron promovido para a banda de condução perde a sua energia subindo até a borda da banda de valência. Quando ambos, elétron e buraco estão relaxados, pode acontecer do elétron retornar à sua banda original (processo denominado de *recombinação elétron-buraco*), emitindo um fóton de energia E_g , que corresponde à energia do *gap* (DOVER, 1971; YU; CARDONA, 2005).

Na Figura 7 mostra-se a montagem experimental típica de um sistema para estudar o fenômeno de fotoluminescência. As fontes de luz tipicamente utilizadas são lasers por se tratar de fontes de luz coerente e monocromática. A Figura 8 mostra uma curva típica de um espectro de luminescência.

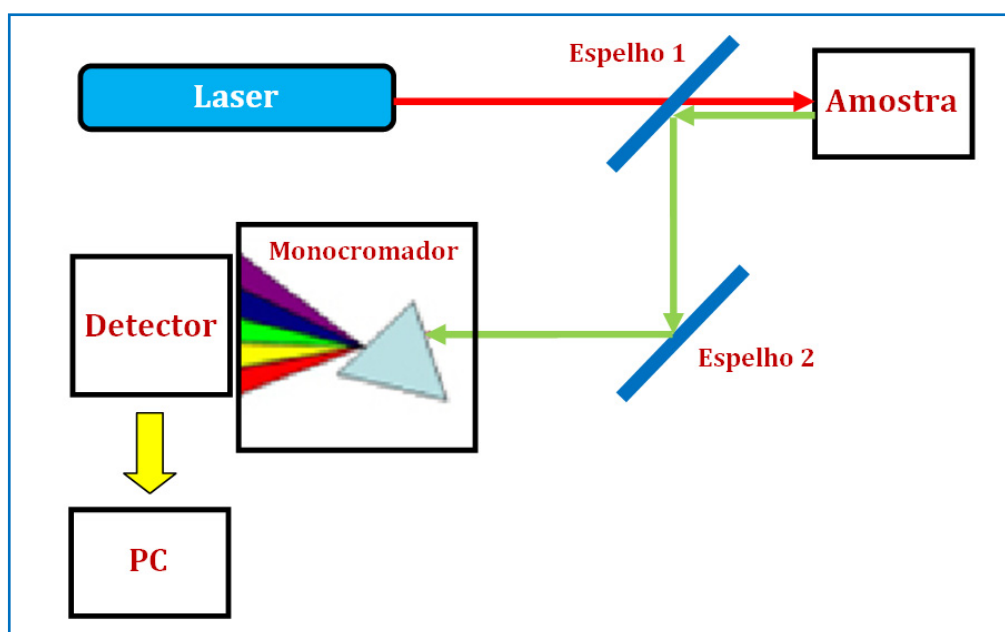


Figura 7. Esquema simplificado de um experimento de fotoluminescência.

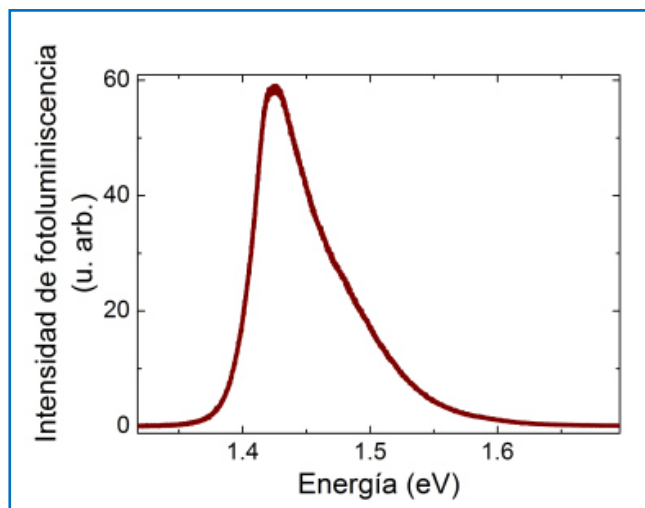


Figura 8. Espectro de fotoluminescência, em temperatura ambiente, de um diodo Gunn (DOVER, 1971).

O gráfico da Figura 8 representa a quantidade de luz que recebe o detector como função de energia de fótons (em unidades de elétron-volt, ou eV). Como se pode ver, o pico do espectro está em aproximadamente 1,42 eV, que é o valor do *gap* do arseneto de gálio (GaAs) (DOVER, 1971; YU; CARDONA, 2005).

Quais as informações sobre o material em estudo que se pode tirar deste tipo de experimento? Um bom exemplo é descrito no parágrafo anterior, onde determinou-se o valor da energia do *gap* do GaAs, informação fundamental na fabricação de dispositivos eletrônicos. Mas também é possível fazer ligas de GaAs com outros elementos tais como o alumínio, o nitrogênio ou índio, todos de ampla aplicação tecnológica. Esses novos materiais terão novos valores do *gap* de energia, que pode ser determinado por esta técnica. Outra aplicação da fotoluminescência é na determinação da pureza e a cristalinidade de um material. Se ele for muito puro e cristalino, ele apresentará um pico claro, definido e estreito na fotoluminescência. No entanto, se o material não for homogêneo, o valor do *gap* variará de um ponto para outro e no final teremos vários picos sobrepostos, ou um pico muito largo. Obviamente, isto vale para ligas em sistemas inorgânicos. Quando se estuda amostras orgânicas ou biológicas, dificilmente picos estreitos são obtidos através desta técnica, por se tratar de sistemas mais complexos.

Uma outra aplicação da fotoluminescência pode ser obtida pela comparação da sua intensidade em temperatura ambiente e em baixa temperatura. Essa comparação permite estimar quão “bom” é o material como emissor de luz. Isto é chamado de *eficiência quântica* ou *radiativa*.

Em função disso, e dada a forte influência do microentorno na emissão de radiação de fluorescência no processo de fotoluminescência, moléculas fluorescentes são muitas vezes utilizadas como *sondas* para investigar sistemas físico-químicos, bioquímicos e biológicos. Em contraste com outros tipos de sondas, tais como marcadores radioativos e sondas de EPR² que dão informações sobre a mobilidade molecular, as sondas com fotoluminescência/fluorescência proporcionam informação em vários campos. A Tabela 2 mostra uma relação das diferentes informações proporcionadas por este tipo de sondas.

Tabela 2. Informação proporcionada por sondas com fotoluminescência/fluorescência em diversos campos.

Campo	Informação
Polímeros	Dinâmica de cadeias poliméricas; micro viscosidade; volume livre; miscibilidade; separação de fases; difusão de moléculas através de redes poliméricas; monitoramento de polimerização; degradação.
Superfícies sólidas	Natureza da superfície coloidal de sílicas, zeólitas; sílica gel; argilas; vidros porosos; alumina; rigidez; polaridade e modificação de superfícies.
Membranas Biológicas	Fluência; parâmetros de ordem; interações proteína-lipídeos; difusão translacional; acessibilidade a um determinado sítio; mudanças estruturais; potencial de membrana; complexação; efeito de aditivos; localização de proteínas; organização lateral e dinâmica.
Proteínas	Sítios de ligação; desnaturação; acessibilidade; dinâmica; distâncias; transição conformacional.
Ácidos Nucleicos	Flexibilidade; dinâmica de torção; estrutura de hélice; deformação devido a agentes intercalantes; carcinogênese.
Células vivas	Características das membranas, lipídeos, proteínas, DNA, RNA; antígenos superficiais; dinâmica de membranas; dinâmico; permeabilidade de membranas; potencial de membranas; pH intracelular; cálcio citoplasmático; sódio; cloro; atividade enzimática; interações célula-célula e célula-vírus; fusão; endocitose; atividade citotóxica.

² EPR: *electron paramagnetic resonance* ou ressonância paramagnética eletrônica.

2. Experimental

2.1 Equipamentos

A emissão fotoluminescente foi colhida por um espectrômetro triplo (três grades de difração) da marca Jobin Yvon, modelo T64000, equipado com microscópio. Para detecção utilizamos uma câmera CCD (*charge coupled device*) refrigerada por nitrogênio líquido. As fendas do espectrômetro foram ajustadas para produzir uma resolução espectral da ordem de 10^{-4} nm. Como fonte de excitação foi utilizada a linha de 457 nm (violeta) de um laser de argônio.

A Figura 10 mostra imagem do sistema experimental completo. A montagem experimental utilizada neste trabalho para o estudo da fotoluminescência é mostrada no esquema da Figura 11, que é similar àquela mostrada na Figura 7.

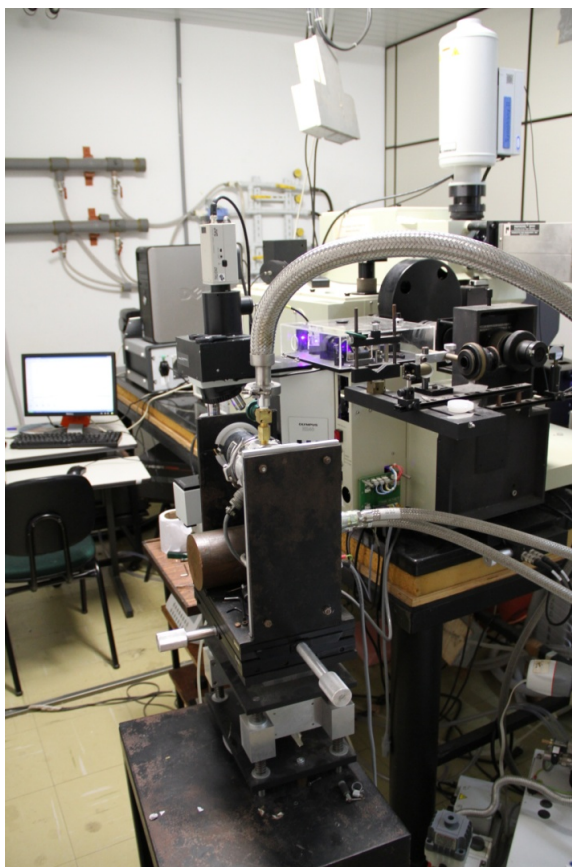


Figura 10. Imagem do equipamento experimental utilizado neste trabalho para o estudo da fotoluminescência, pertencente ao Grupo de Semicondutores do Departamento de Física da UFSCar.

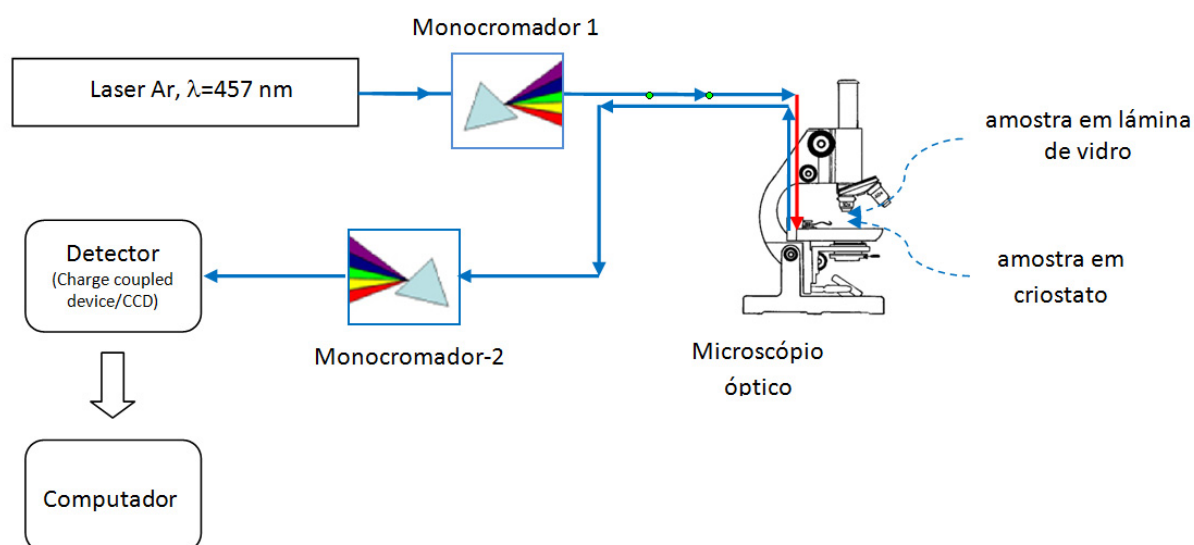


Figura 11. Montagem experimental utilizada neste trabalho para o estudo da fotoluminescência.

O feixe de luz é gerado pelo laser de argônio puro e é guiado através de espelhos até atingir a amostra (Figura 12). O monocromador 1 (Figura 13) é utilizado para conseguir o estreitamento da linha de luz que vai atingir a amostra. O monocromador 2, bem mais sofisticado do que o monocromador 1, atua como um espectrômetro triplo que analisa a radiação fotoluminescente emitida pela amostra e envia essa informação para o computador.

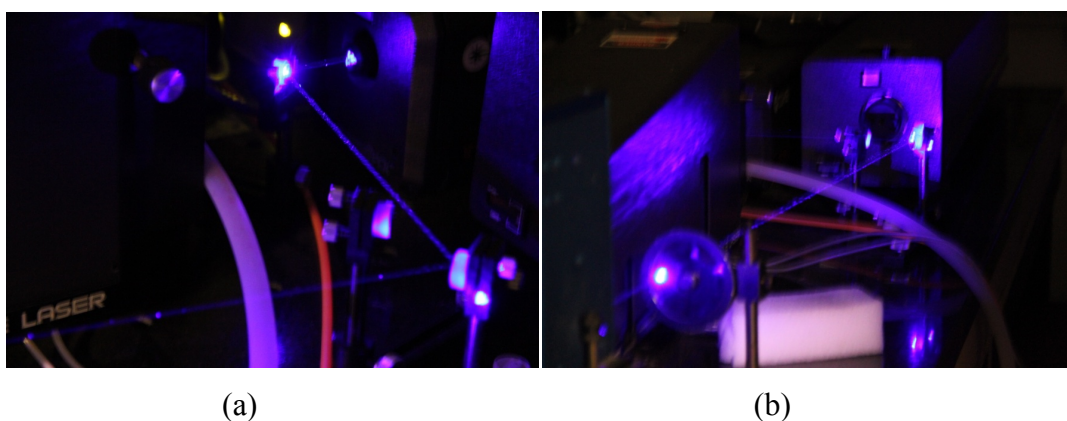


Figura 12. (a) geração e desvio da luz de laser de argônio; (b) ingresso desse feixe no primeiro monocromador (caixa à esquerda na foto).

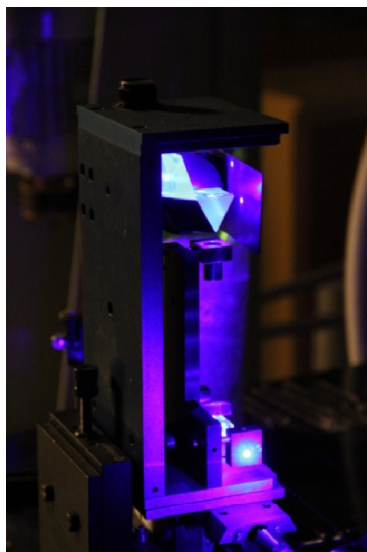


Figura 13. Imagem do primeiro monocromador, utilizado para conseguir o estreitamento da linha de luz utilizada para o estudo do fenômeno da fotoluminescência.

Este sistema permite analisar amostras em temperatura ambiente depositadas numa lâmina de vidro (Figura 14) ou, alternativamente, montada dentro de um criostato de fluxo (Figura 15) para o estudo da fotoluminescência em baixas temperaturas. No caso do presente trabalho, foram realizadas medidas de fotoluminescência em temperatura ambiente (RT) e em $T = 8\text{K}$. Neste último caso, a amostra é submetida a alto vácuo (da ordem de 10^{-7} mm de Hg) através do uso de bombas de vácuo mecânica e turbo respectivamente. Após o vácuo necessário ser atingido, a amostra é resfriada através de fluxo de gás hélio que, no presente caso, atinge a temperatura de 8K, que é monitorada eletronicamente por um voltímetro digital (Figura 16).

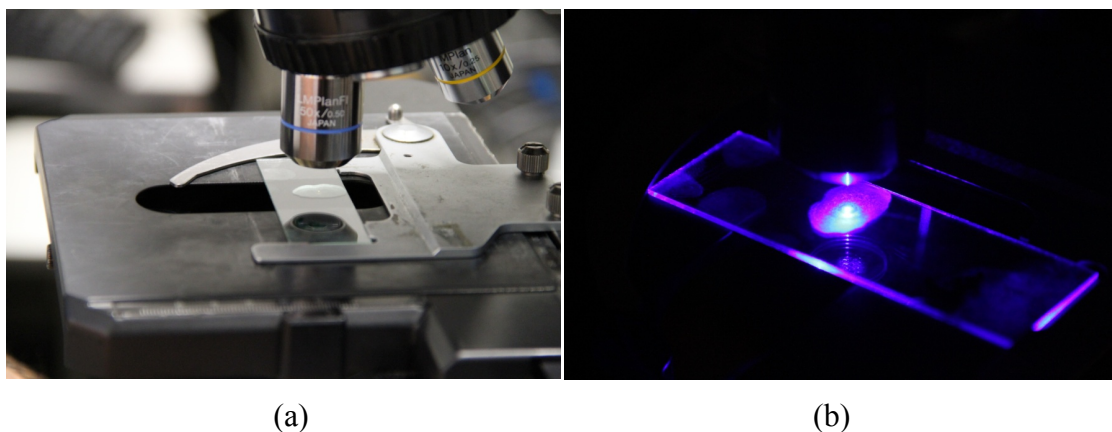


Figura 14. (a) Amostra montada no microscópio em lâmina de vidro; (b) feixe de laser incidindo sobre a amostra montada em lâmina de vidro.

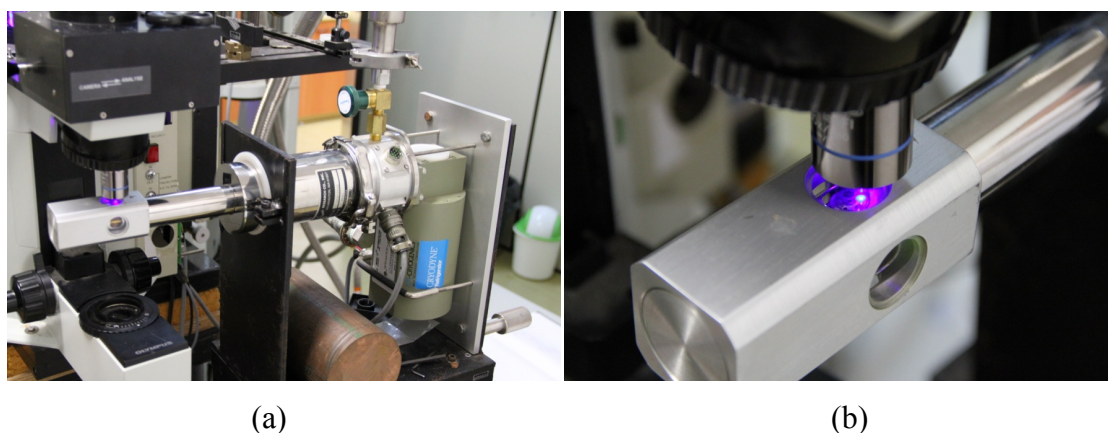


Figura 15. (a) Criostato de fluxo contendo a amostra, sob o feixe de laser incidindo sobre a amostra; (b) detalhe da imagem anterior.



Figura 16. Equipamento eletrônico (voltímetro digital) para monitoramento da temperatura; observe que o painel do equipamento está marcando a temperatura de 8K (-265°C).

O procedimento adotado nesta etapa do trabalho foi o seguinte:

- (a) Estudo da fotoluminescência das amostras do extrato lipopeptídico (ELP), do extrato total (ET) e da fração aquosa (FA) em temperatura ambiente (RT), através da montagem das amostras em lâmina de vidro.
- (b) Estudo da fotoluminescência das amostras do extrato lipoprotéico (ELP), do extrato total (ET) e da fração aquosa (FA) em baixa temperatura ($T=8\text{K}$) através da montagem das amostras em criostato de fluxo.
- (c) Estudo da fotoluminescência das amostras resultantes da mistura de ELP com células das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 1578 e do fungo *Candida albicans* ATCC 10231 em duas situações: (1) imediatamente após a mistura do ELP com a suspensão celular microbiana, e (1) trinta minutos após a mistura.

2.2 Preparo dos inóculos das cepas bacterianas e fúngica

As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 1578 e fúngica *Candida albicans* ATCC 10231 utilizadas pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar.

Para a reativação das cepas criopreservadas, um volume de 10 µl de cultivo estoque de cada microrganismo foi plaqueado nos meios de cultivo seletivos ágar sal manitol (*S. aureus*), ágar Enterococos (*E. faecalis*), eosina azul de metileno (*E. coli*), ágar S-S (*S. sonnei*) e ágar Sabouraud (*C. albicans*). As placas foram incubadas a 37°C/24 h. Após o período de incubação, colônias típicas dos microrganismos foram repicadas em placas de ágar TSA (*tryptcase soy agar*), e incubadas sob as mesmas condições. Colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo solução salina 0,85%, e a densidade óptica (λ 600 nm) da suspensão celular foi ajustada até atingir a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml (para bactérias) e $1,0 \times 10^5$ UFC/ml (para o fungo), conforme as normas CLSI (2011).

As suspensões microbianas foram mantidas em caixa isotérmica com gelo (Figura 17) para transporte até o Laboratório de Semicondutores, Departamento de Física, UFSCar.

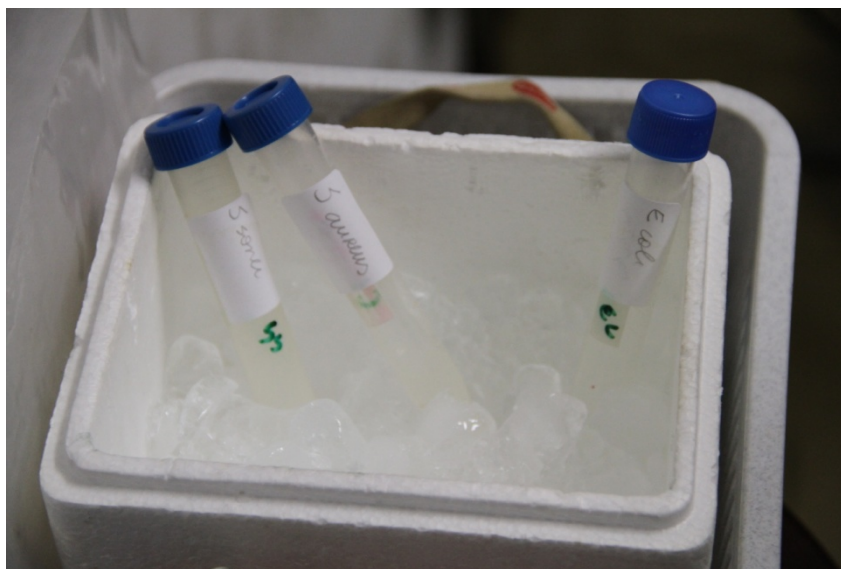


Figura 17. Caixa isotérmica com gelo utilizada para transporte e preservação das suspensões microbianas.

2.3 Preparo das amostras ET, FA e ELP

O ET foi obtido a partir do caldo de fermentação de *P. polymyxa* RNC-D, conforme condições descritas no item 2.2 do Capítulo 1. Um volume de 10 ml foi liofilizado em *speed vac* e utilizado nas medidas em temperatura ambiente e baixa temperatura. O ELP e a FA foram preparados conforme condições descritas no item 2.3, Parte I do Capítulo 2. ELP e FA liofilizados foram solubilizados em água destilada esterilizada (10 mg/ml) A solução aquosa estoque de ELP foi preparada numa concentração de 10 mg/ml. A atividade biológica de ET, FA e ELP das amostras utilizadas para análise de espectroscopia de fluorescência foi verificada através de teste de difusão em ágar (*spot test*) contra *E. coli* (Figura 18).

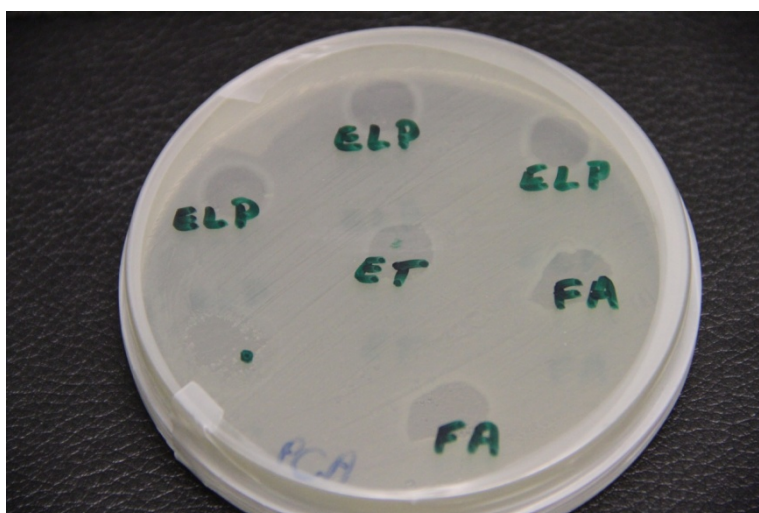


Figura 18. Bioensaio contra *E. coli* (*spot test*) das amostras ET, FA e ELP utilizadas para análise de espectroscopia de fluorescência.

2.4 Preparo das lâminas

Volumes de 50 μ l das suspensões microbianas foram colocados na superfície de lâminas de vidro para a análise das células. Posteriormente, 20 μ l de solução de ELP foi adicionado e homogeneizado às células. A análise espectroscópica foi então realizada logo após a adição de ELP e após 30 minutos.

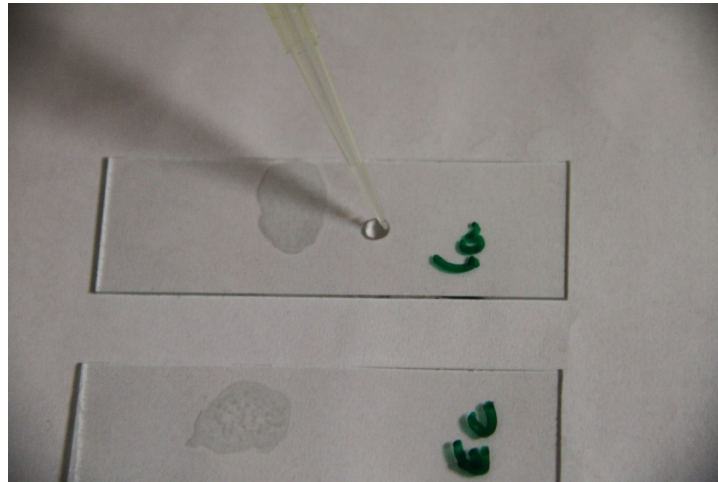


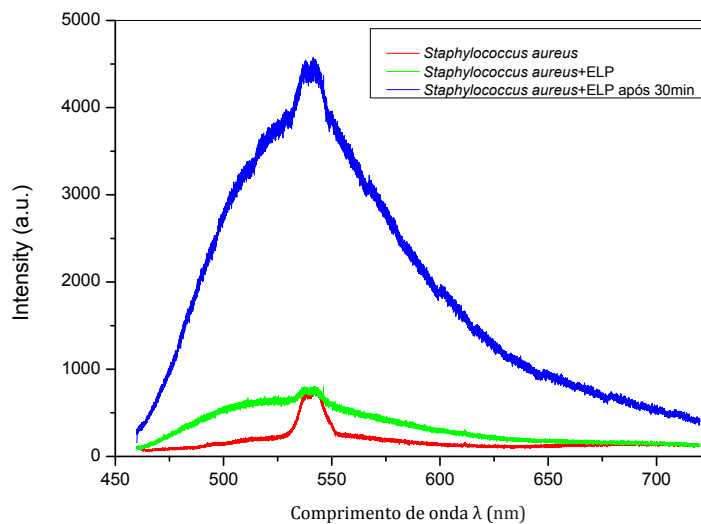
Figura 19. Preparação de cada microrganismo adicionando ELP em placa de vidro.

3. Resultados e discussão

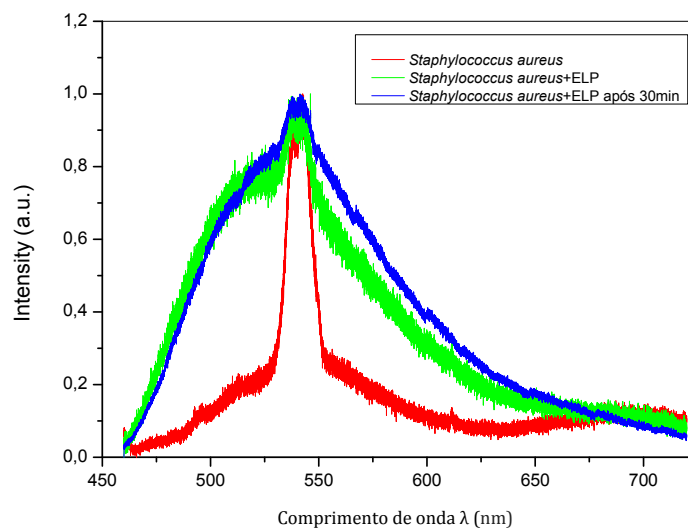
Os espectros de fotoluminescência para a bactéria *Staphylococcus aureus*, para a bactéria adicionada de ELP, e para a bactéria adicionada de ELP após 30 minutos são mostrados na Figura 20. Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm.

Alternativamente, para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pelas setas na Figura 21), são mostrados os espectros de fotoluminescência para amostra desta bactéria para as mesmas situações experimentais mencionadas no item anterior. Em todas as curvas observamos um pico estreito (que diminui de intensidade quando adicionado o ELP) superposto a um pico largo, ambos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm. Para a bactéria pura, observamos mais um pico de luminescência de menor intensidade ao redor de $\lambda = 690.5$ nm. Este pico desaparece permanentemente ao adicionar ELP.

(a) *Staphylococcus aureus*



(a)



(b)

Figura 20. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Staphylococcus aureus* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência para a bactéria pura com máximo ao redor dos 700 nm, o qual desaparece nas outras duas situações experimentais. Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de 540 nm.

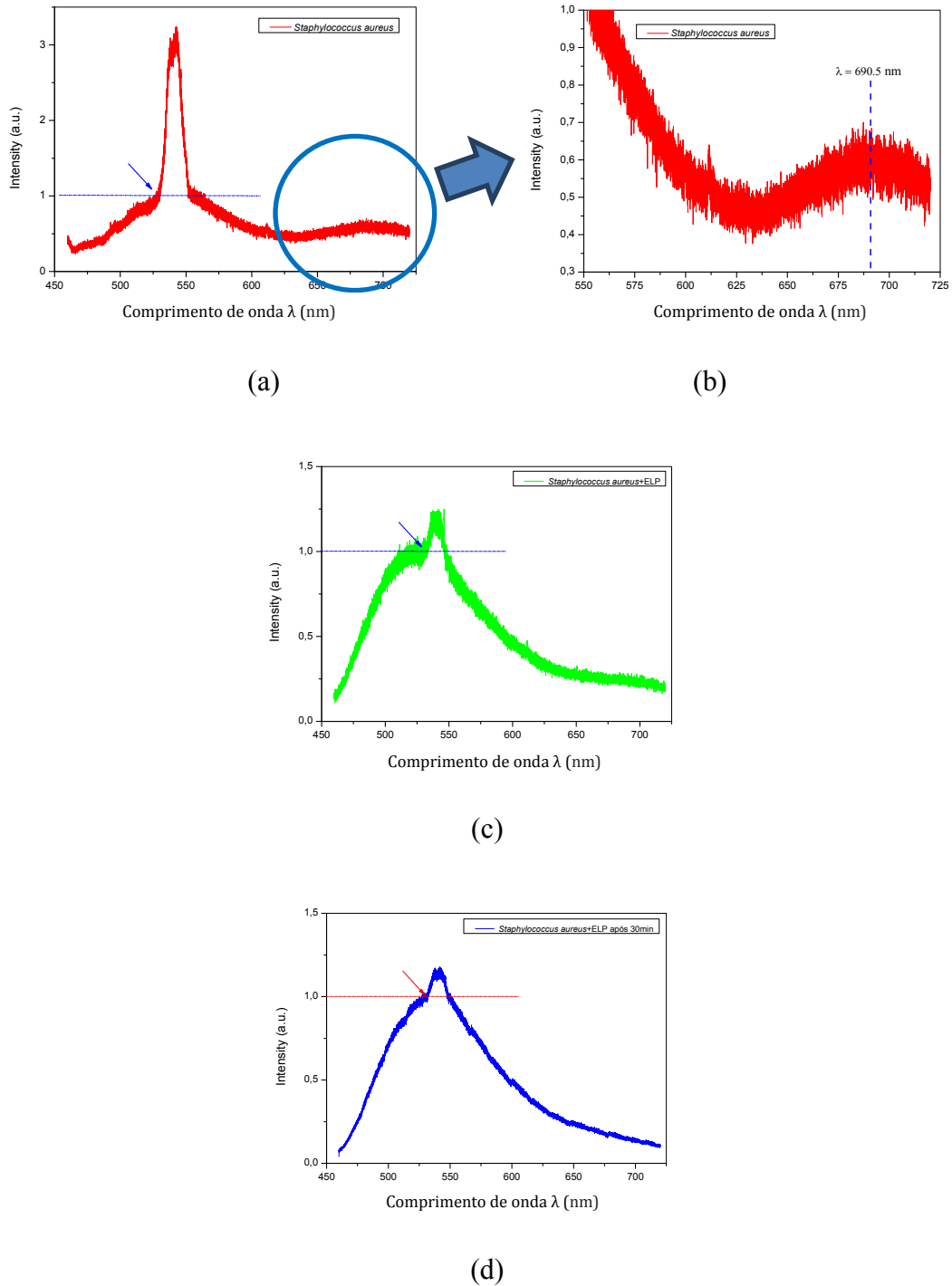
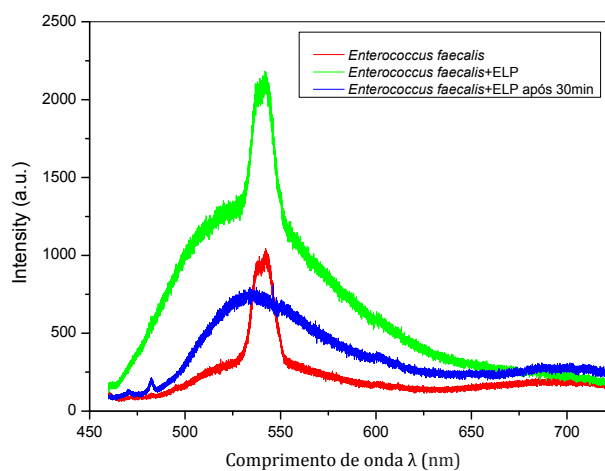


Figura 21. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Staphylococcus aureus* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) e (b) bactéria pura; (c) bactéria mais ELP, e (d) bactéria mais ELP após 30 minutos. Em todas as curvas observamos um pico estreito (que diminui de intensidade quando adicionado o ELP) superposto a um pico largo, ambos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm. Para a bactéria pura (b), observamos mais um pico de luminescência de menor intensidade ao redor de $\lambda = 690.5$ nm. Este pico desaparece permanentemente ao adicionar ELP.

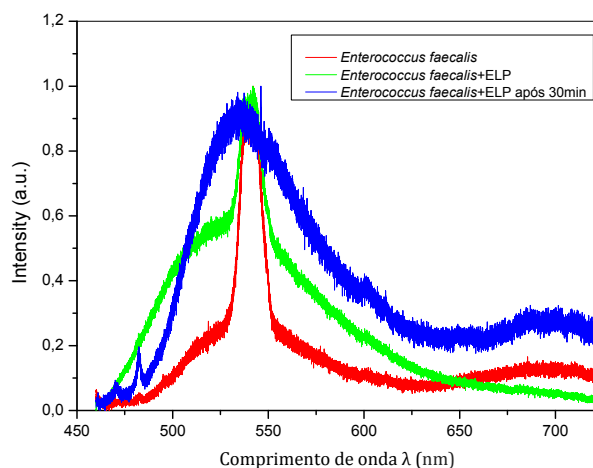
Os espectros de fotoluminescência para a bactéria *Enterococcus faecalis*, para a bactéria adicionada de ELP, e para a bactéria adicionada de ELP após 30 minutos (Figura 22), mostram o aparecimento de pico largo de luminescência tanto para a bactéria pura (curva vermelha) quanto para a situação após 30 minutos de adicionado o ELP (curva azul). Nas duas primeiras situações experimentais (curvas vermelha e verde) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, que desaparece (curva azul) dentro do intervalo de 30 minutos.

As curvas dos espectros de fotoluminescência normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pelas setas, Figura 23), mostram o aparecimento de pico largo de luminescência tanto para a bactéria pura (curva vermelha, $\lambda = 694,3$ nm) quanto para a situação após 30 minutos de adicionado o ELP (curva azul, $\lambda = 694,5$ nm). Este pico, desaparece (curva verde) logo após a adição do ELP à bactéria pura e reaparece dentro do intervalo de 30 minutos (curva azul). No detalhe do espectro de fotoluminescência para esta bactéria (Figura 24) se mostra o aparecimento de picos de Raman em aproximadamente $\lambda = 470$ nm e $\lambda = 482$ nm, após 30 minutos de adicionado o ELP à bactéria.

(b) *Enterococcus faecalis*



(a)



(b)

Figura 22. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Enterococcus faecalis* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência tanto para a bactéria pura (curva vermelha) quanto para a situação após 30 minutos de adicionado o ELP (curva azul). Este pico, com máximo ao redor de $\lambda \sim 700$ nm, desaparece (curva verde) logo após a adição do ELP à bactéria pura e reaparece dentro do intervalo de 30 minutos (curva azul). Nas duas primeiras situações experimentais (curvas vermelha e verde) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, que desaparece (curva azul) dentro do intervalo de 30 minutos. Também, o espectro após 30 minutos de adicionado o ELP à bactéria (curva azul), mostra picos estreitos (Raman) abaixo de $\lambda = 500$ nm.

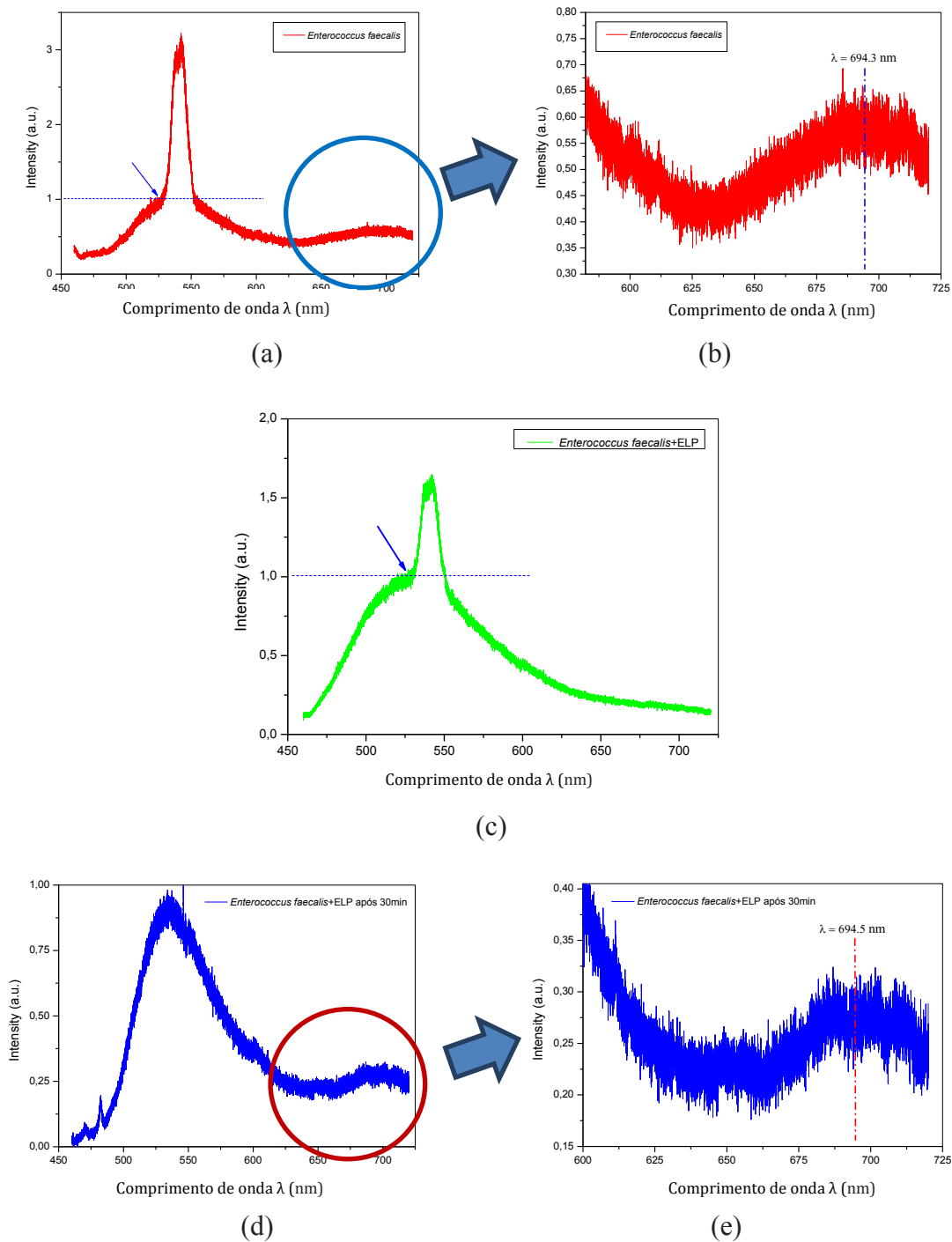
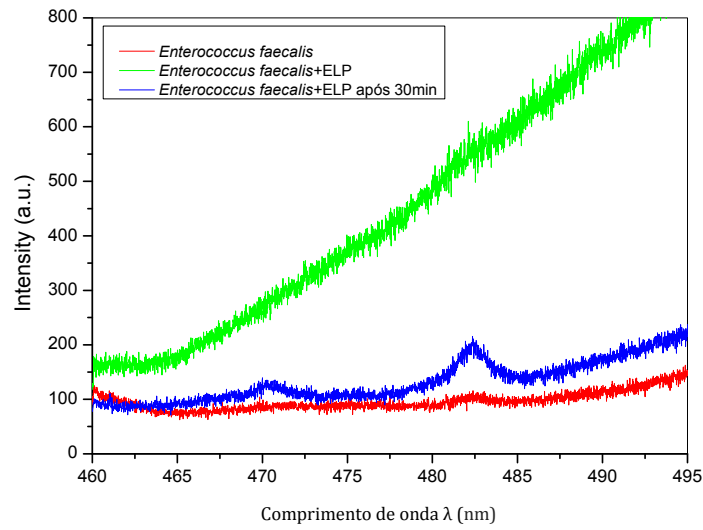
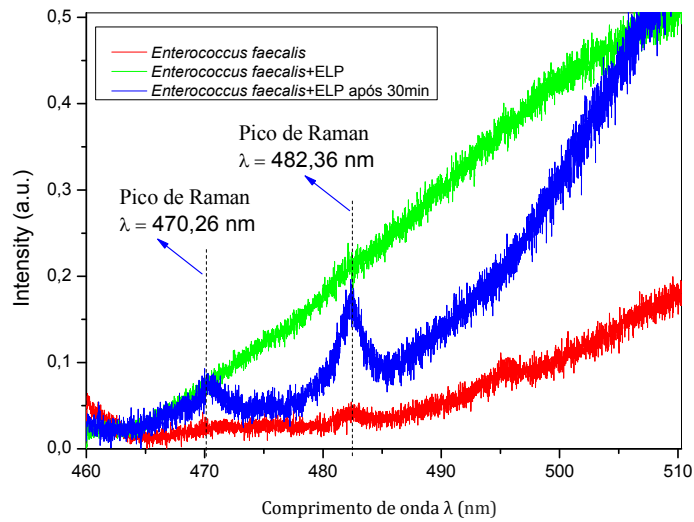


Figura 23. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Enterococcus faecalis* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) e (b) bactéria pura; (c) bactéria mais ELP, e (d) e (e) bactéria mais ELP após 30 minutos. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência tanto para a bactéria pura (curva vermelha, $\lambda = 694,3$ nm) quanto para a situação após 30 minutos de adicionado o ELP (curva azul, $\lambda = 694,5$ nm). Este pico, desaparece (curva verde) logo após a adição do ELP à bactéria pura e reaparece dentro do intervalo de 30 minutos (curva azul). Nas duas primeiras situações experimentais (curvas vermelha e verde) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, que desaparece (curva azul) dentro do intervalo de 30 minutos.



(a)



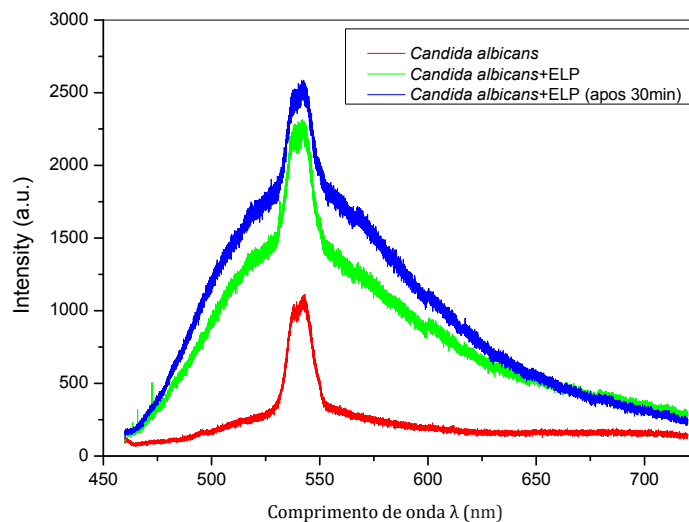
(b)

Figura 24. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Enterococcus faecalis* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa (Figura 22a), mostrando o aparecimento de picos de Raman em aproximadamente 470 nm e 482 nm, após 30 minutos de adicionado o ELP à bactéria.

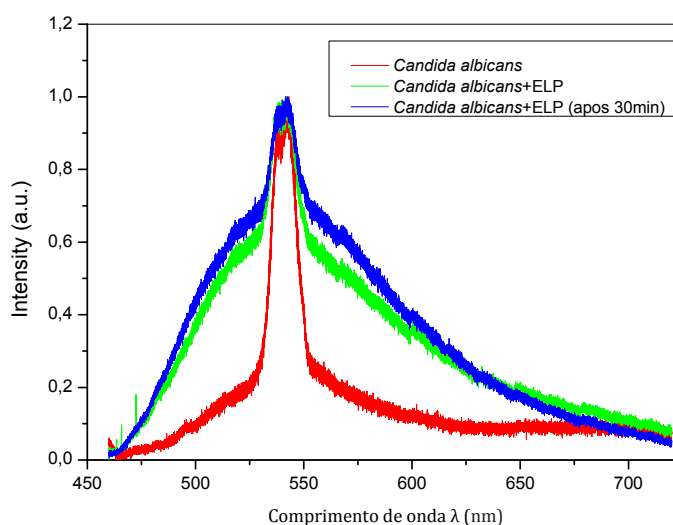
Através dos espectros de fotoluminescência mostrados na Figura 25 para a amostra de *Candida albicans* observamos que todas as curvas exibem um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm.

A presença de um pico estreito (que diminui de intensidade após adição do ELP), o qual está superposto ao pico largo de luminescência anteriormente mencionado, fica evidenciada nas curvas dos espectros de fotoluminescência normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pelas setas, Figura 26). Os detalhes dos espectros de fotoluminescência (Figura 27) para este microrganismo mostram o aparecimento de um pico estreito (provavelmente *duplo*) superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, nas três situações experimentais diferentes.

(c) *Candida albicans*

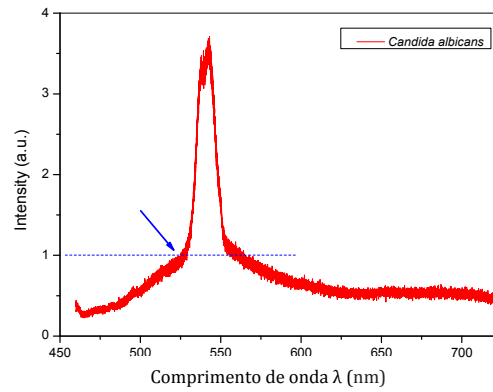


(a)

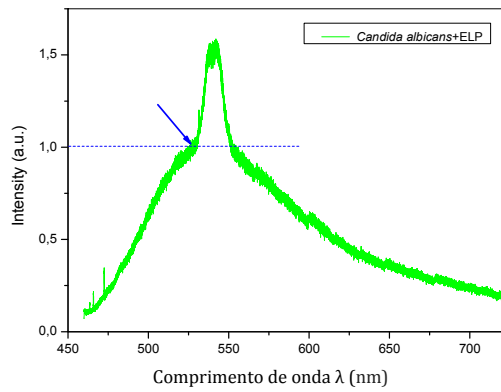


(b)

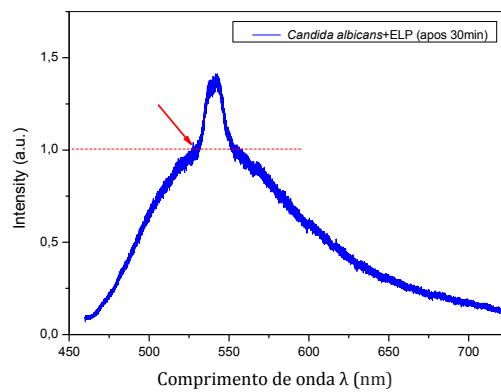
Figura 25. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Candida albicans* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda. Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de 540 nm.



(a)

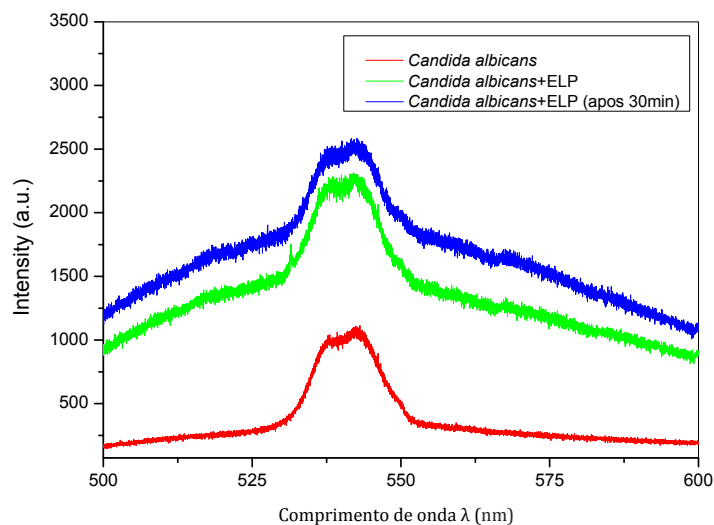


(b)

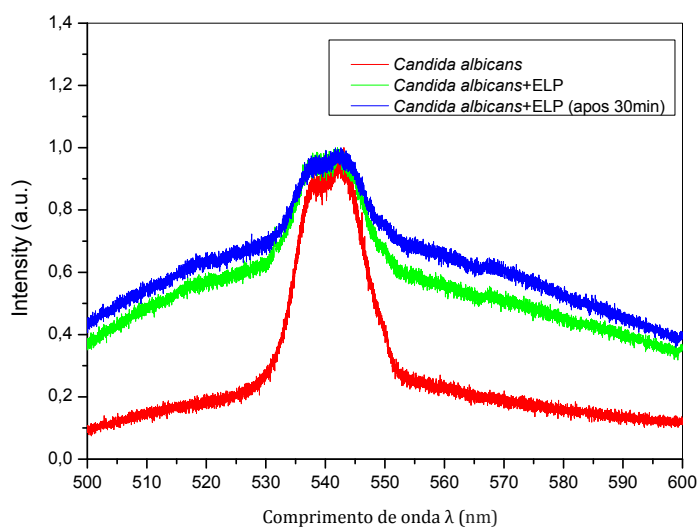


(c)

Figura 26. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Candida albicans* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) bactéria pura; (b) bactéria mais ELP, e (c) bactéria mais ELP após 30 minutos. Em todas as curvas observamos um pico estreito (que diminui de intensidade quando adicionado o ELP) superposto a um pico largo, ambos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm.



(a)



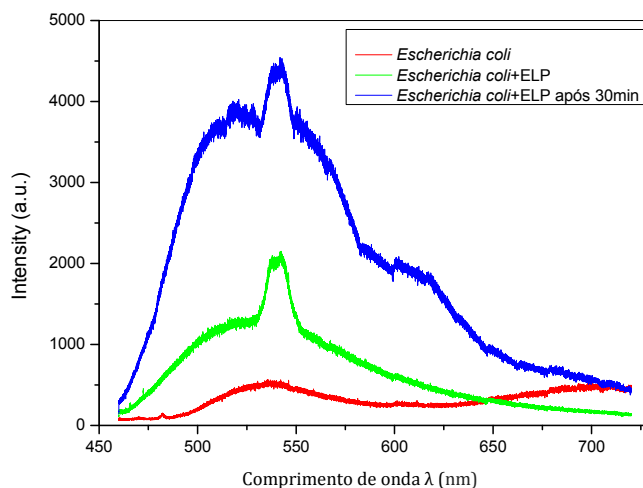
(b)

Figura 27. Detalhe dos espectros de fotoluminescência para a amostra de *Candida albicans* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de um pico estreito (provavelmente *duplo*) superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda.

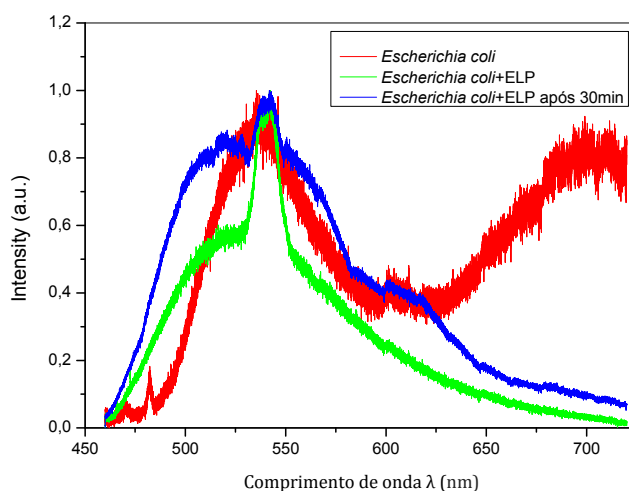
Os espectros de fotoluminescência para a amostra de *Escherichia coli* são mostrados na Figura 28. Nos experimentos onde se adicionou EPL (curvas verde e azul) observa-se um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O experimento para a bactéria pura (curva vermelha) não exhibe o pico estreito de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm.

Os detalhes dos espectros de fotoluminescência para a amostra desta bactéria para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pelas setas, Figura 29) mostram o aparecimento de um pico largo e muito intenso de luminescência em $\lambda = 700,5$ nm para a bactéria pura (curva vermelha) o qual desaparece permanentemente após adicionado o ELP (curvas verde e azul). Nos experimentos onde se adicionou EPL (curvas verde e azul) notou-se um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O espectro para a bactéria pura (curva vermelha) mostra um pico largo de luminescência para $\lambda = 540$ nm e ainda exhibe picos estreitos (Raman) abaixo de 500 nm. Aqui fica evidente que a bactéria pura (curva vermelha) não exhibe o pico estreito de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm que aparece após adicionado o ELP.

(d) *Escherichia coli*

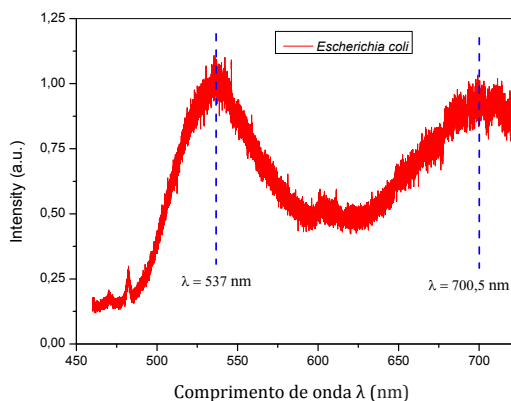


(a)

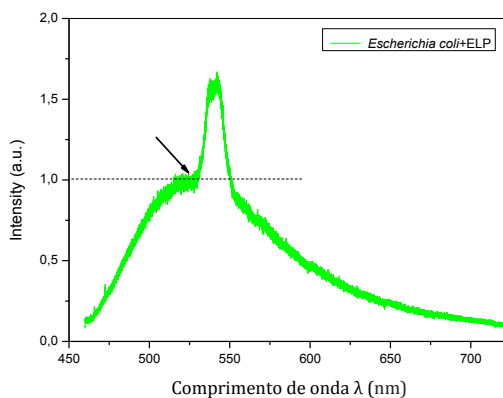


(b)

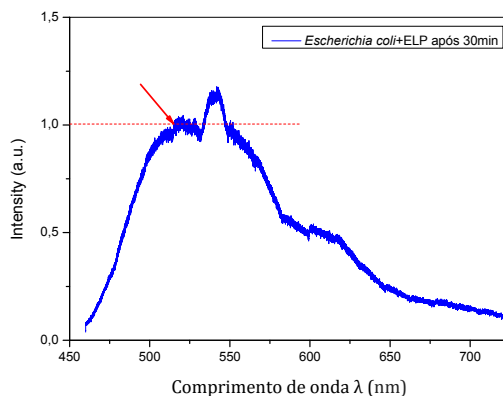
Figura 28. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Escherichia coli* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo e muito intenso de luminescência ao redor dos 700 nm para a bactéria pura o qual desaparece permanentemente após adicionado o ELP (curvas verde e azul). Nos experimentos onde se adicionou EPL (curvas verde e azul) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O espectro para a bactéria pura (curva vermelha) mostra um pico largo de luminescência para $\lambda = 540$ nm e ainda exibe picos de luminescência de intensidade menor abaixo de 500 nm. A experimento para a bactéria pura (curva vermelha) não exibe o pico estreito de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm.



(a)



(b)



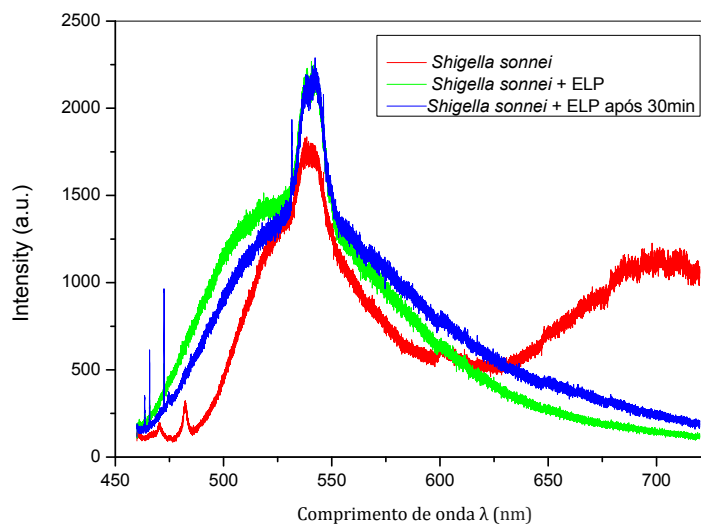
(c)

Figura 29. Espectros de fotoluminescência para a amostra de *Escherichia coli* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) bactéria pura; (b) bactéria mais ELP, e (c) bactéria mais ELP após 30 minutos. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo e muito intenso de luminescência em $\lambda = 700,5$ nm para a bactéria pura (curva vermelha) o qual desaparece permanentemente após adicionado o ELP (curvas verde e azul). Nos experimentos onde se adicionou ELP (curvas verde e azul) observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O espectro para a bactéria pura (curva vermelha) mostra um pico largo de luminescência para $\lambda = 540$ nm e ainda exibe picos estreitos (Raman) abaixo de 500 nm. Aqui fica evidente que a bactéria pura (curva vermelha) não exibe o pico estreito de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm que aparece após adicionado o ELP.

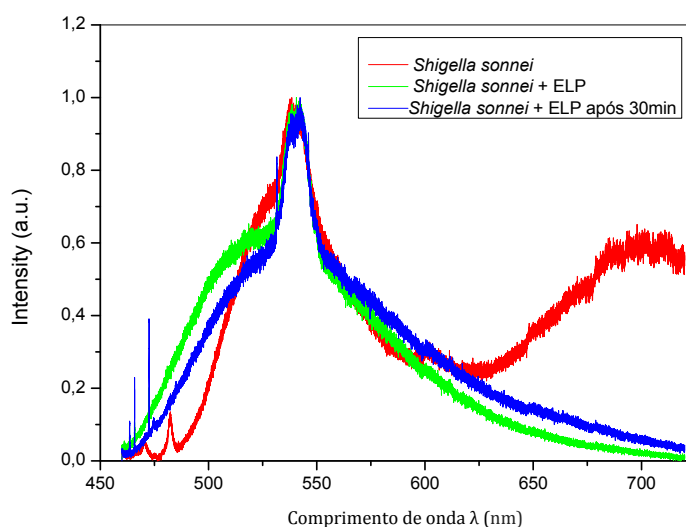
Os resultados das avaliações com *Shigella sonnei* podem ser visualizados nas Figuras 30-34. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* (Figura 30) mostram o aparecimento de picos de luminescência e de Raman de diferentes características. Os espectros de fotoluminescência para esta bactéria mostradas através de curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pelas setas da Figura 31) mostram o aparecimento de um pico largo de luminescência para a bactéria pura (curva vermelha) com máximo ao redor de $\lambda = 700,8$ nm. Este pico desaparece nas outras duas situações após a adição do ELP (curvas verde e azul).

Em todas as curvas foi observado um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm sem mudanças aparentes na sua intensidade nos três experimentos. Os detalhes do espectro de fotoluminescência para uma amostra desta bactéria (Figura 32) mostram o aparecimento de picos estreitos (Raman) tanto logo após a adição do ELP à bactéria pura, quanto após transcorridos 30 minutos, para $\lambda = 463,56$ nm, $\lambda = 465,84$ nm, e $\lambda = 472,52$ nm. Também, esta bactéria apresenta espectro de luminescência que exhibe picos provavelmente *duplos* (Figura 33) estreitos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm, superpostos a picos largos também de luminescência, nas três situações experimentais diferentes. Finalmente, o espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* (Figura 34) mostra o aparecimento de picos de luminescência ao redor de $\lambda = 470$ nm e $\lambda = 482$ nm.

(e) *Shigella sonnei*

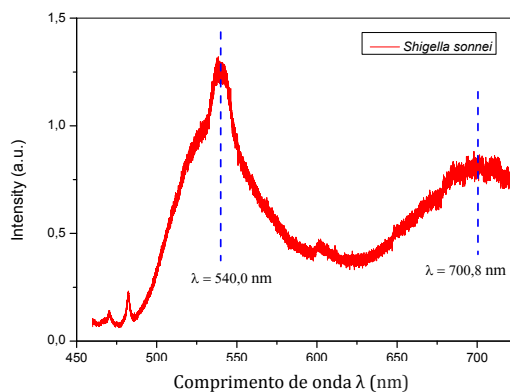


(a)

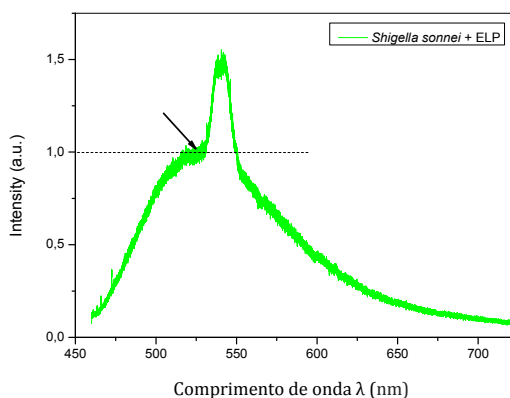


(b)

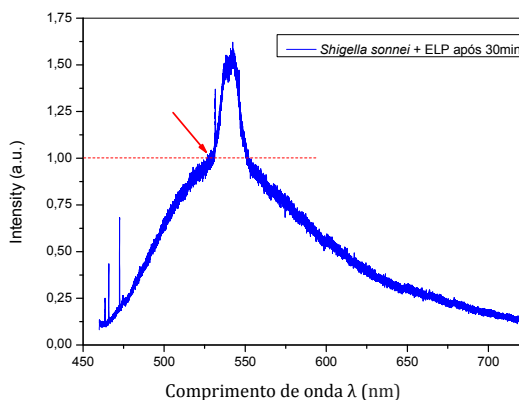
Figura 30. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência para a bactéria pura com máximo ao redor de $\lambda = 700$ nm, o qual ainda desaparece nas outras duas situações após a adição do ELP à bactéria pura. Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm. O espectro da bactéria pura (curva vermelha) também mostra picos de luminescência abaixo dos 500 nm. Os espectros obtidos após a adição do ELP à bactéria (curvas verde e azul), mostram picos estreitos (Raman) abaixo de 500 nm.



(a)

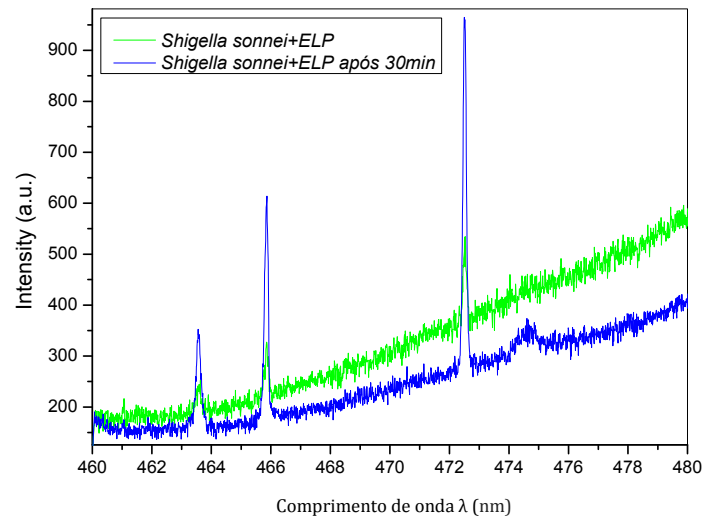


(b)

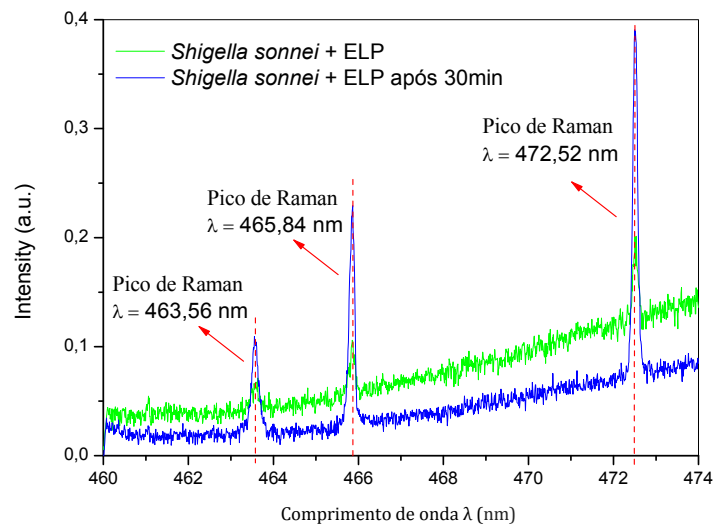


(c)

Figura 31. Espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para curvas normalizadas em relação ao ponto inicial na base do pico estreito (indicado pela seta) para: (a) bactéria pura; (b) bactéria mais ELP, e (c) bactéria mais ELP após 30 minutos. Destaca-se aqui o aparecimento de pico largo de luminescência para a bactéria pura (curva vermelha) com máximo ao redor de $\lambda = 700,8$ nm, o qual ainda desaparece nas outras duas situações após a adição do ELP (curvas verde e azul). Em todas as curvas observamos um pico estreito superposto a um pico largo, ambos de luminescência, ao redor de $\lambda = 540$ nm sem mudanças aparentes na sua intensidade nos três experimentos. O espectro da bactéria pura (curva vermelha) também mostra picos de luminescência abaixo dos 500 nm. Os espectros obtidos após a adição do ELP à bactéria (curvas verde e azul), mostram picos estreitos (Raman) abaixo de 500 nm.



(a)



(b)

Figura 32. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa (Figura anterior). Destaca-se aqui o aparecimento de picos estreitos (Raman) tanto logo após a adição do ELP à bactéria pura, quanto após transcorridos 30 minutos, para $\lambda = 463,56$ nm, $\lambda = 465,84$ nm, e $\lambda = 472,52$ nm.

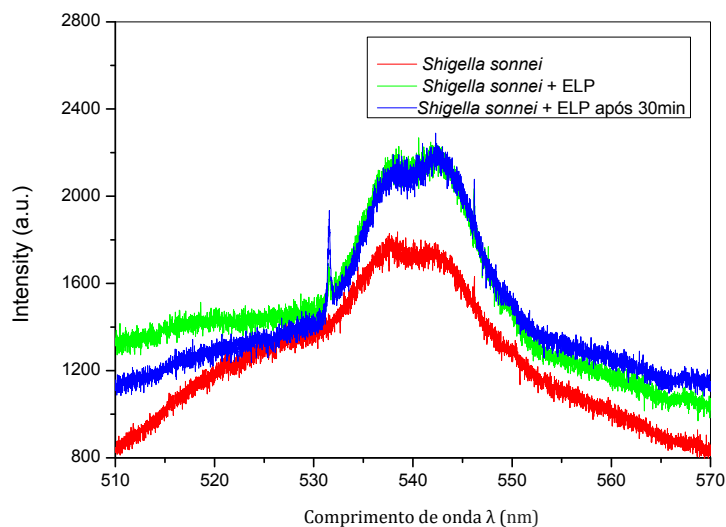


Figura 33. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para dados sem normalizar, mostrando o aparecimento de picos (provavelmente *duplos*) estreitos de luminescência ao redor de $\lambda = 540$ nm, superpostos a picos largos também de luminescência, nas três situações experimentais diferentes indicadas na legenda.

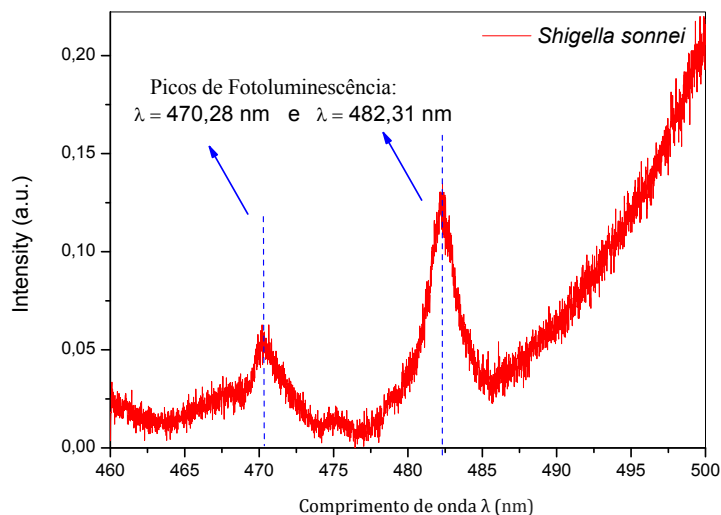
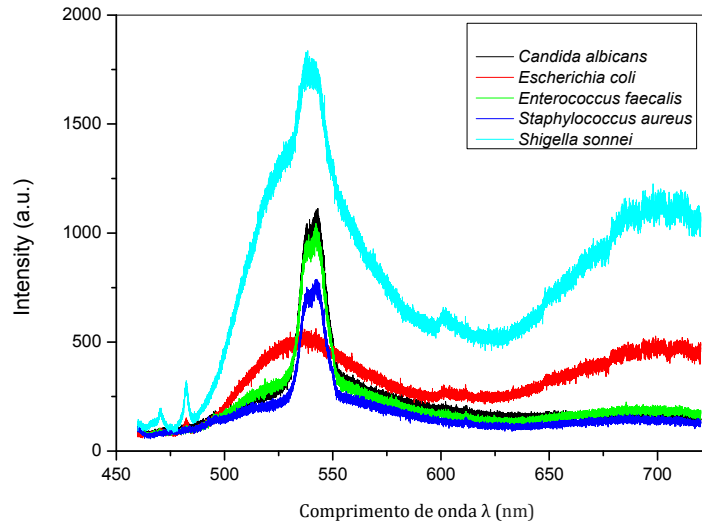


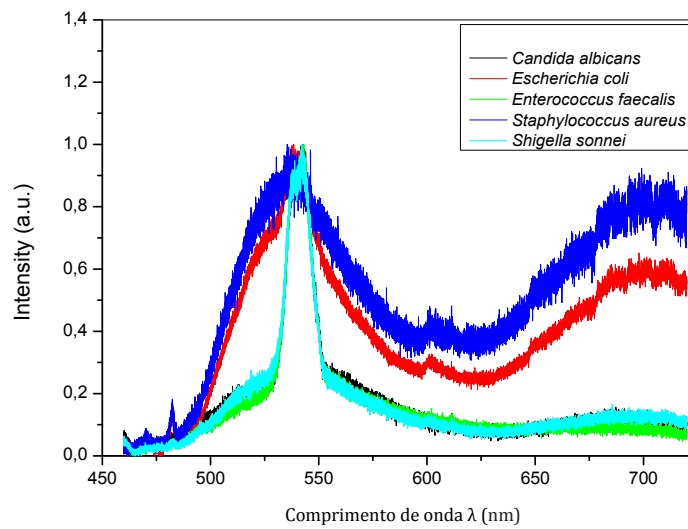
Figura 34. Detalhe do espectro de fotoluminescência para a amostra de *Shigella sonnei* para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa (Figura 24), mostrando o aparecimento de picos de luminescência ao redor de $\lambda = 470$ nm e $\lambda = 482$ nm, para a bactéria pura.

Uma comparação entre o comportamento da fotoluminescência para todos os micrororganismos é apresentado nas Figuras 35-38 para as tres situações experimentais aqui estudadas (Comparação de todos os micrororganismos puros, comparação de todos os micrororganismos puros + ELP, e comparação de todos os micrororganismos + ELP após 30min).

Comparação de todos os microrganismos puros

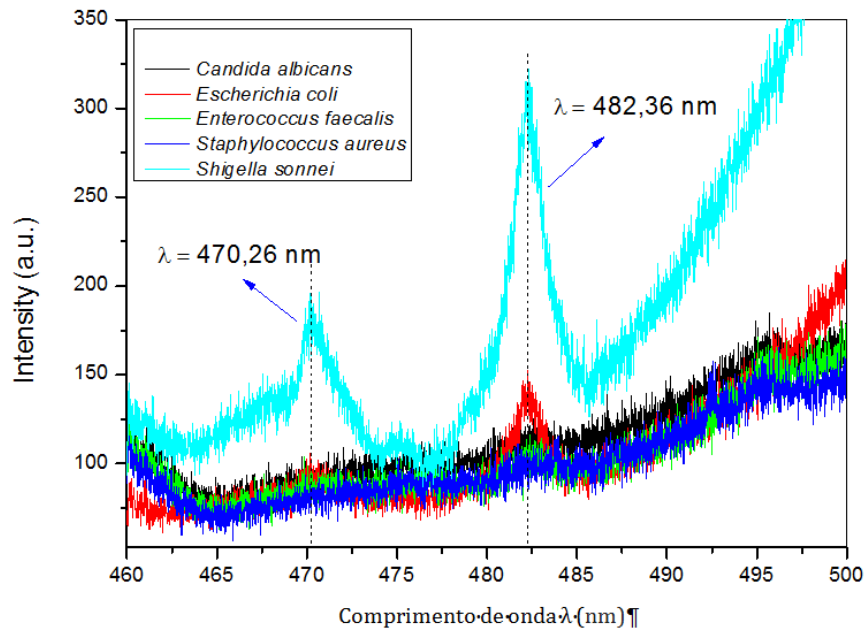


(a)

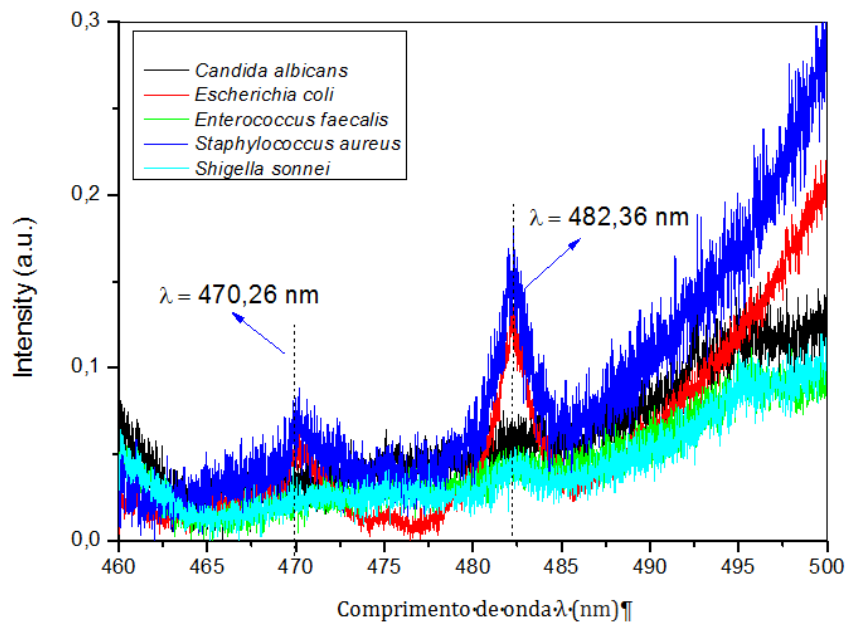


(b)

Figura 35. Espectros de fotoluminescência comparativos para todos os microrganismos puros mencionados anteriormente para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos de luminescência e de Raman com diferentes características e em diversos comprimentos de onda.



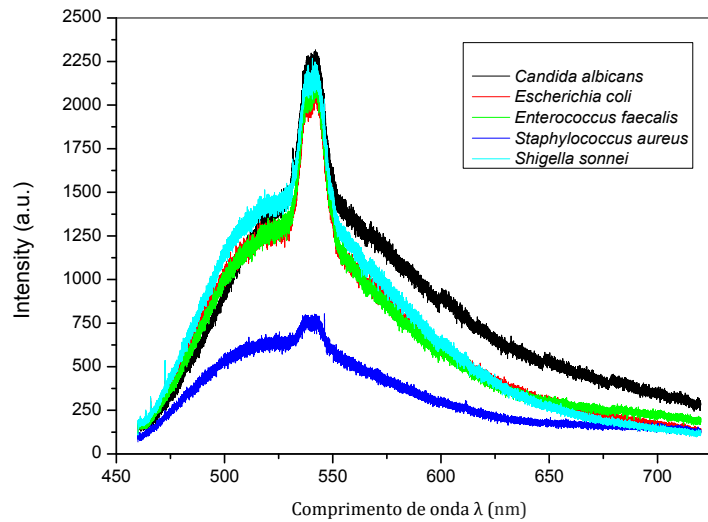
(a)



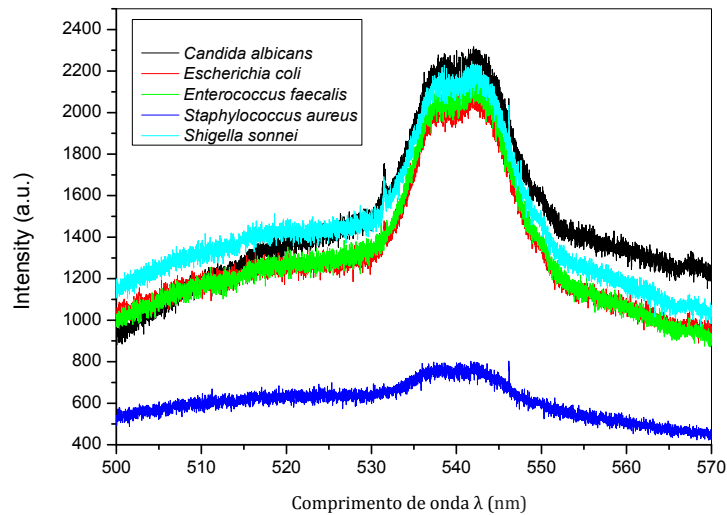
(b)

Figura 36. Detalhe dos espectros de fotoluminescência comparativo para todos os microrganismos puros mencionados anteriormente para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos de luminescência em $\lambda = 470,26$ nm e $\lambda = 482,36$ nm.

Todos os microrganismos puros + ELP



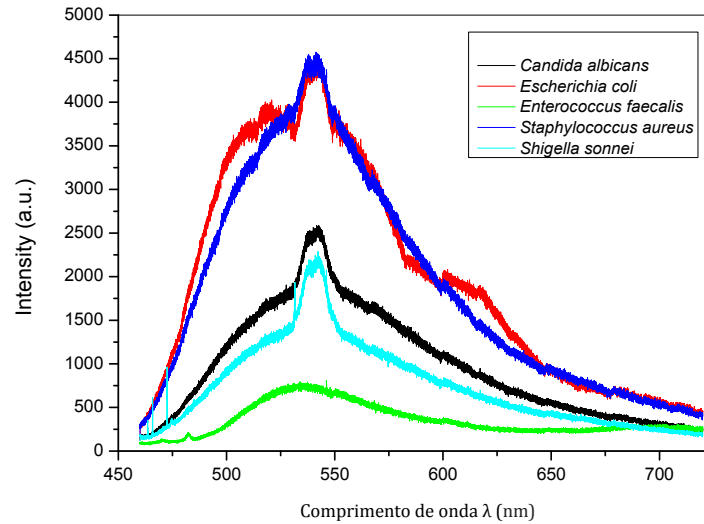
(a)



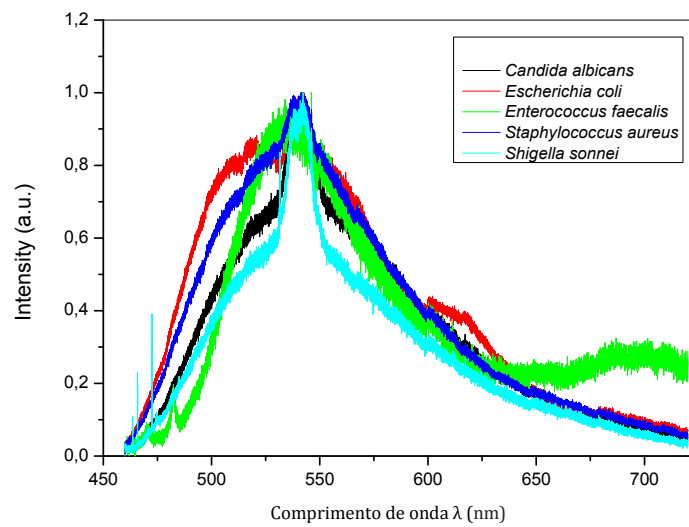
(b)

Figura 37. (a) Espectros de fotoluminescência comparativo para todos os microrganismos puros adicionado de ELP para dados sem normalizar, mostrando o aparecimento de picos de luminescência de diferentes características ao redor de $\lambda = 540$ nm; (b) detalhe do mesmo espectro da figura (a).

Todos os microrganismos + ELP após 30min



(a)

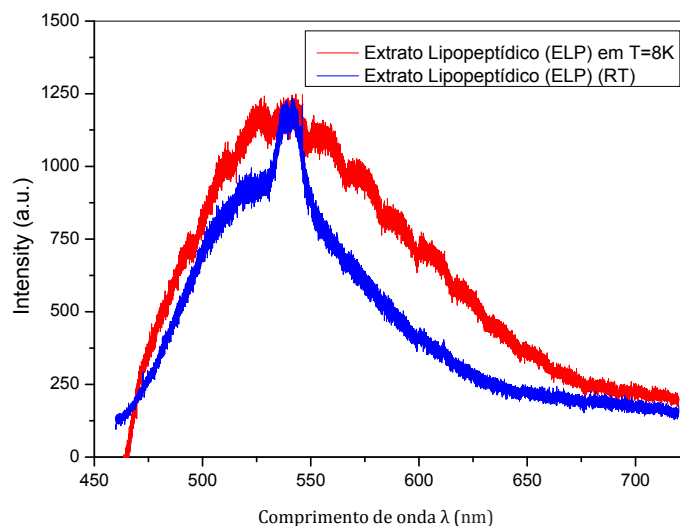


(b)

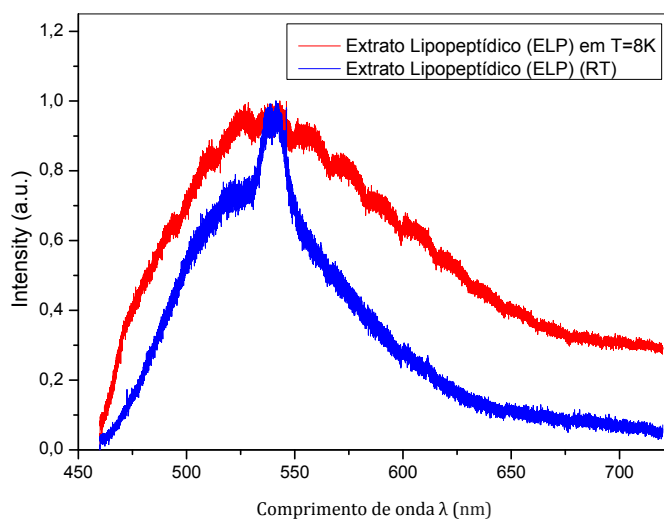
Figura 38. Espectros de fotoluminescência comparativo para todos os microrganismos puros adicionados de ELP após 30 minutos para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos de luminescência e picos de Raman de diferentes características e em diversos comprimentos de onda.

Nas Figuras 39-42 mostramos o comportamento da fotoluminescência para extrato lipopeptídico (ELP), o extrato total (ET) e a fração aquosa (FA) em temperatura ambiente (RT) e em baixa temperatura, em $T = 8\text{K}$. O espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8\text{K}$) para amostra de ELP (Figura 39) mostra o aparecimento de picos largos de luminescência em torno de $\lambda = 540\text{ nm}$ com pico (também de luminescência) mais estreito (curva azul), superposto em temperatura ambiente mas que desaparece em baixas temperaturas (curva vermelha). O espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8\text{K}$) para amostra de ET (Figura 40) mostra o aparecimento de picos largos de luminescência com máximo ao redor de $\lambda = 550\text{ nm}$ que não apresentam mudanças significativas quando se varia a temperatura de medida. O espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8\text{K}$) para amostra de FA (Figura 41) mostra o aparecimento de picos de Raman estreitos ao redor de $\lambda = 700\text{ nm}$. A Figura 42 mostra detalhes desse espectro de fotoluminescência exibindo o aparecimento de dois picos de Raman ao redor de $\lambda = 697\text{ nm}$ e $\lambda = 699\text{ nm}$. Estes picos de Raman não aparecem em temperatura ambiente (RT).

(d) Extrato Lipopeptídico (ELP)



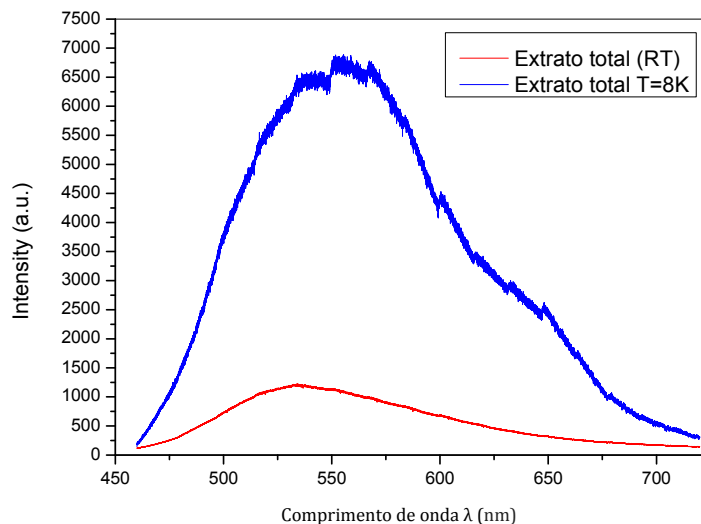
(a)



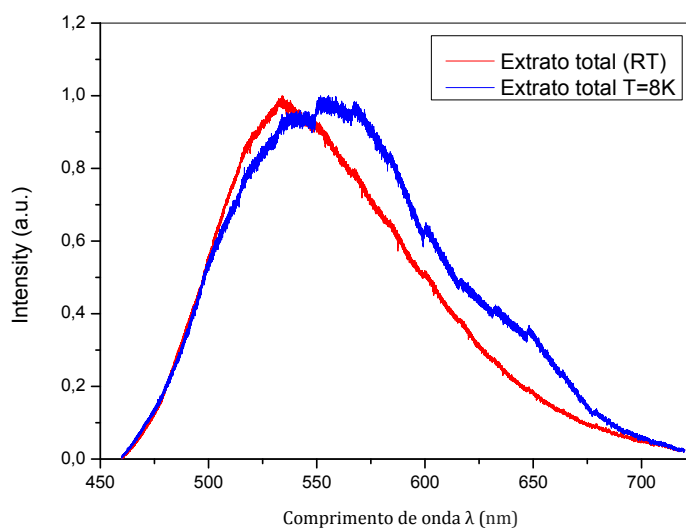
(b)

Figura 39. Espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8\text{K}$) para amostra de ELP para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos largos de luminescência em torno de $\lambda = 540\text{ nm}$ com pico (também de luminescência) mais estreito (curva azul), superposto em temperatura ambiente mas que desaparece em baixas temperaturas (curva vermelha).

(e) Extrato total (ET)



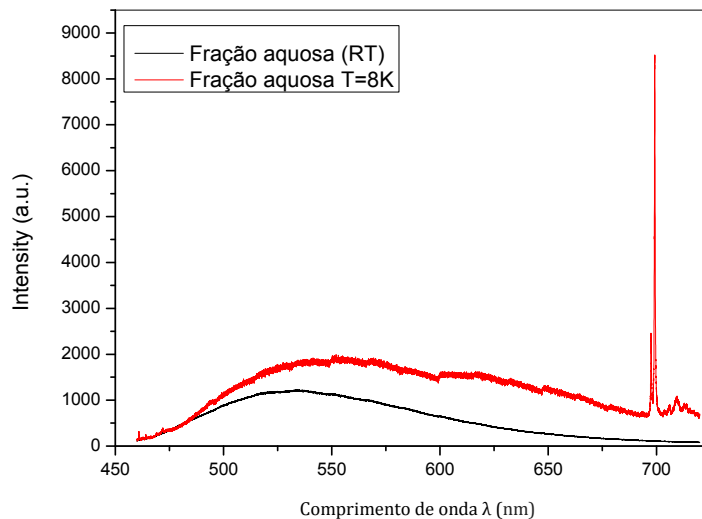
(a)



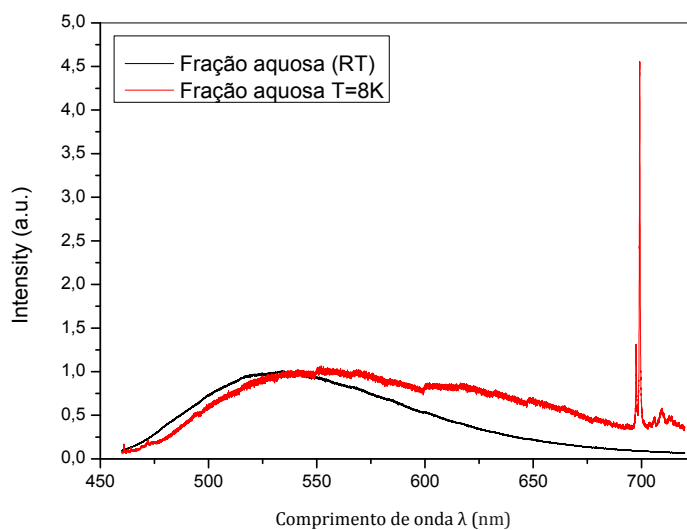
(b)

Figura 40. Espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8\text{K}$) para amostra de ET para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, mostrando o aparecimento de picos largos de luminescência com máximo ao redor de $\lambda = 550\text{ nm}$.

(f) Fração aquosa (FA)

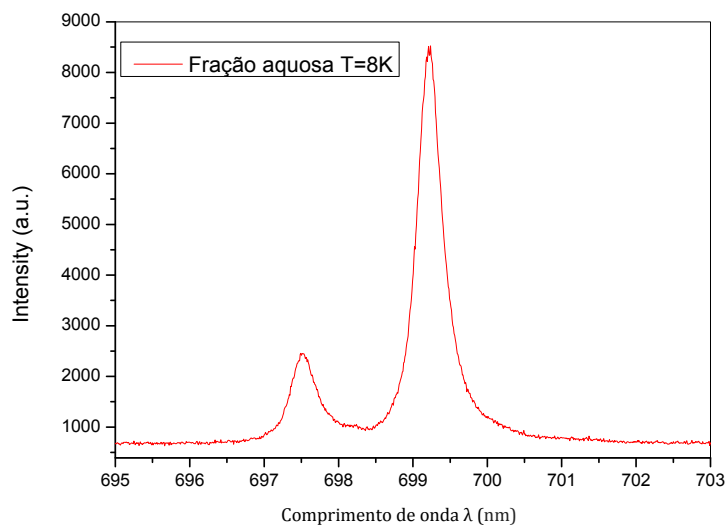


(a)

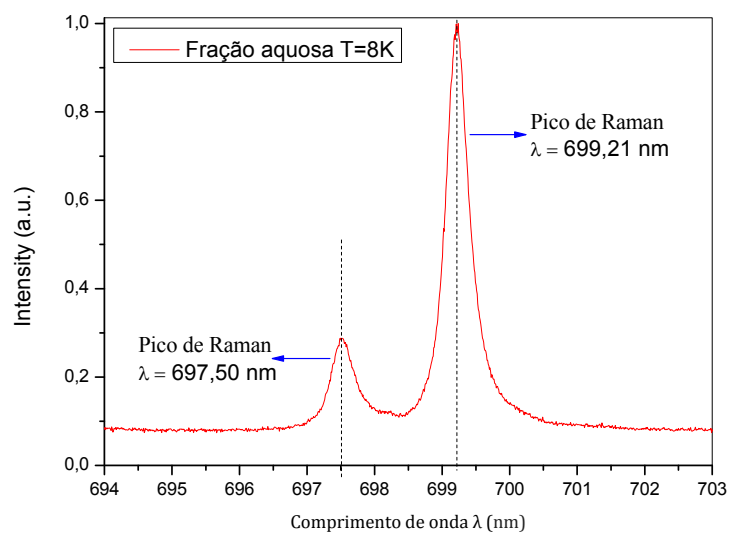


(b)

Figura 41. Espectro de fotoluminescência comparativo entre os comportamentos em temperatura ambiente (RT) e baixa temperatura ($T = 8\text{K}$) para amostra de FA para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa do pico largo de luminescência com máximo ao redor de $\lambda = 550\text{ nm}$, e mostrando o aparecimento de picos de Raman estreitos ao redor de $\lambda = 700\text{ nm}$.



(a)



(b)

Figura 42. Detalhes do espectro de fotoluminescência em baixa temperatura ($T = 8\text{K}$) para amostra de FA para (a) dados sem normalizar, e (b) dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa do pico mais alto com máximo ao redor de $\lambda = 699\text{ nm}$, e mostrando o aparecimento de dois picos de Raman ao redor de $\lambda = 697\text{ nm}$ e $\lambda = 699\text{ nm}$. Estes picos de Raman não aparecem em temperatura ambiente (RT).

A Figura 43 mostra a comparação dos comportamentos das bactérias puras, após a adição de ELP e após a adição de ELP passados 30 minutos, para *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*. A semelhança entre ambos conjuntos de curvas é muito significativa.

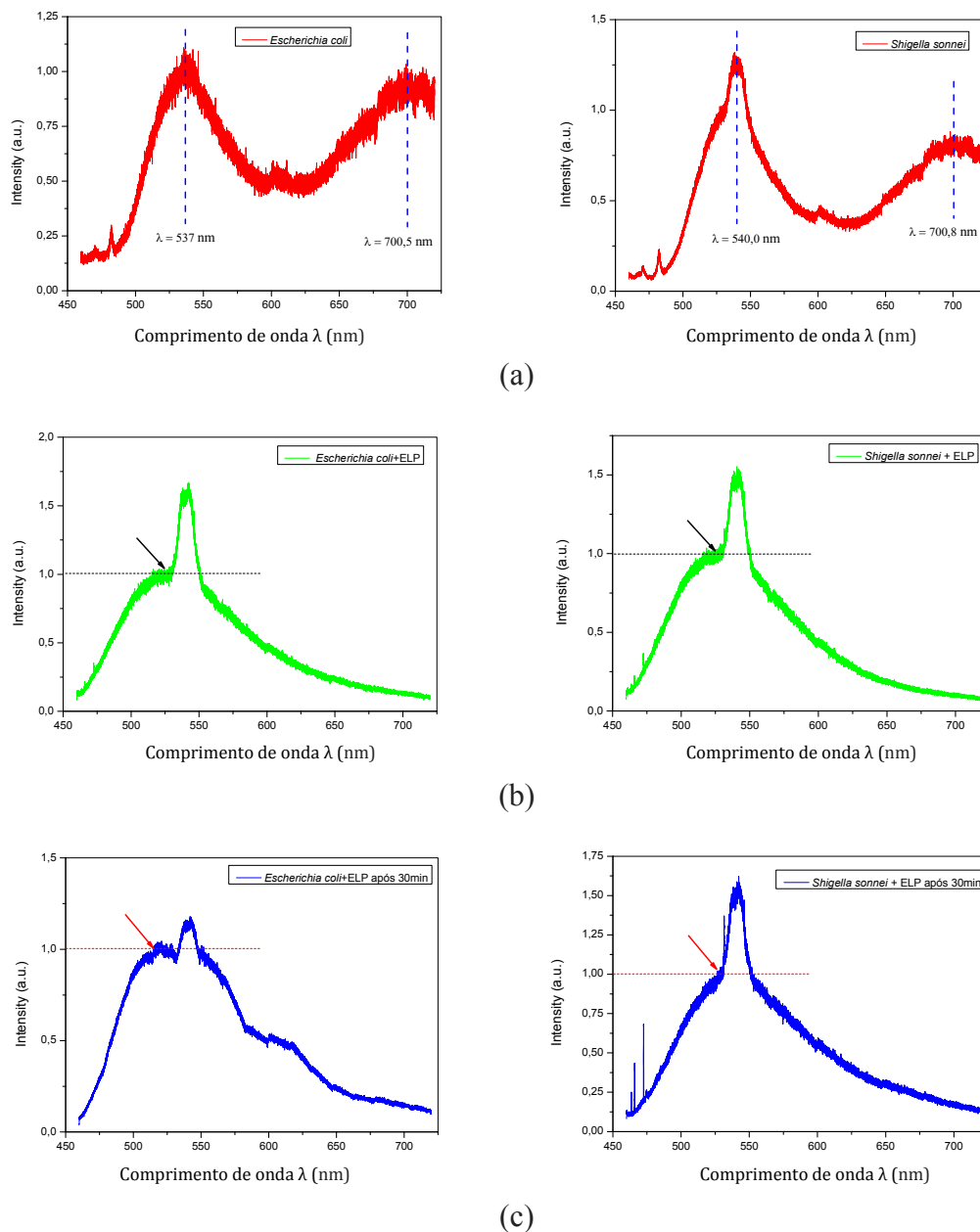


Figura 43. Comparação dos comportamentos para (a) bactérias puras, (b) após a adição de ELP e (c) após a adição de ELP passados 30 minutos, para *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*. A semelhança entre ambos conjuntos de curvas é muito significativa.

De maneira semelhante, a Figura 44 mostra a comparação dos comportamentos das bactérias puras e após a adição de ELP para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Novamente, a semelhança entre ambos conjuntos de curvas é muito significativa. O mesmo não é observado após transcorridos 30 min (Figura 45).

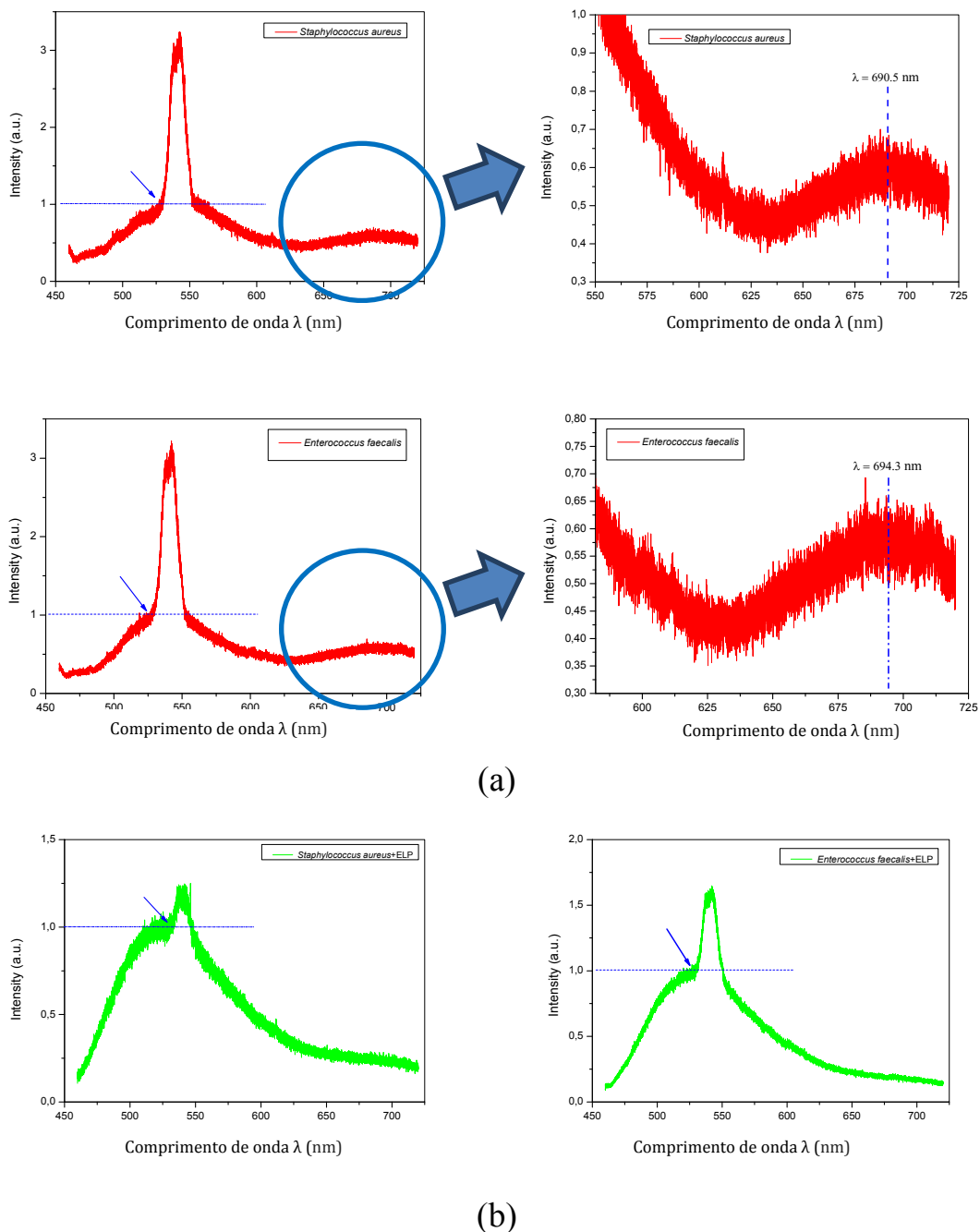
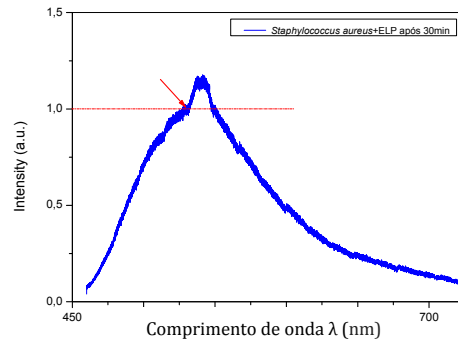
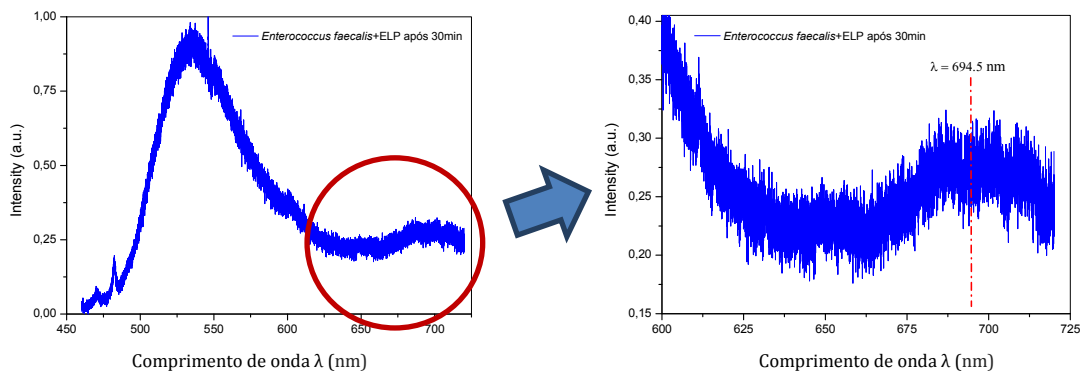


Figura 44. Comparação dos comportamentos para (a) as bactérias puras e (b) após a adição de ELP para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. A semelhança entre ambos conjuntos de curvas é muito significativa.



(a)



(b)

Figura 45. Comparação dos comportamentos para após 30 minutos da adição de ELP para (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Enterococcus faecalis*. Neste caso, não é observada semelhança entre ambos conjuntos no sentido observado nas Figuras 43 e 44.

4. Conclusões

A técnica de fotoluminescência apresenta-se como ferramenta hábil e promissora para o estudo de sistemas biológicos, podendo contribuir tanto para a ciência básica quanto para aplicações de alta relevância.

Os dados de fotoluminescência obtidos para *E. coli* + *S. sonnei*, e *S. aureus* + *E. faecalis* indicam um comportamento característico que está associado a cada conjunto microbiano estudado, ou seja, uma resposta fotoluminescente típica para bactérias Gram-positivas e outra para Gram-negativas. Isto provavelmente está relacionado à composição da membrana e parede celular, bem como pelo modo de ação dos compostos ativos presentes no extrato total e frações derivadas.

Do ponto de vista biotecnológico, os comportamentos aqui observados para a fotoluminescência dos microrganismos estudados evidenciam enorme potencial de aplicação para construção de biosensores e marcadores moleculares utilizando os compostos antimicrobianos produzidos por *P. polymyxa* RNC-D.

5. Referências

DOVER P.J.I. **Optical Processes in Semiconductors**. 2. ed. Verlag: Springer, 1971, 164 p.

YU P.Y.; CARDONA M. **Fundamentals of Semiconductors: Physics and Material Properties**. 7. ed. Verlag: Springer, 2005, 227 p.