PATRÍCIA CARLIN FAGUNDES

Análise da produção das aureocinas A70 e A53 para uso em alimentos e caracterização da Bac 3682

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Prof[a] Dr[a.] Maria Helena Miguez da Rocha Leão
Prof[a] Dr[a.] Maria do Carmo de Freire Bastos

Escola de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro
2008

Análise da produção das aureocinas A70 e A53 para uso em alimentos e caracterização da Bac 3682

PATRÍCIA CARLIN FAGUNDES

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências, executado sob orientação conjunta das Prof^{as} Dr$^{as.}$ Maria Helena Miguez da Rocha Leão e Maria do Carmo de Freire Bastos.

Aprovada por:

_____

Prof^{a} Dr$^{a.}$ Maria Helena Miguez da Rocha Leão (Orientadora Presidente)

_____

Prof^{a} Dr$^{a.}$ Maria do Carmo de Freire Bastos (Orientadora)

_____

Prof^{a} Dr$^{a.}$ Selma Gomes Ferreira Leite

_____

Prof^{a} Dr$^{a.}$ Marinella Silva Laport

_____

Prof^{a} Dr$^{a.}$ Janaína dos Santos Nascimento

Ficha Catalográfica

Fagundes, Patrícia Carlin

Análise da produção das aureocinas A70 e A53 para uso em alimentos e caracterização da Bac 3682 / Patrícia Carlin Fagundes – Rio de Janeiro: UFRJ/ EQ, 2008.

xx, 119f.;il.;

Orientadoras: Maria do Carmo de Freire Bastos

Maria Helena Miguez da Rocha Leão

Dissertação – UFRJ / EQ/ Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.

Referências: 103-119.

1. Aureocina A70. 2. Aureocina A53. 3. Alimentos

I. Bastos, Maria do Carmo de Freire e Leão, Maria Helena Miguez da Rocha

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

III. Análise da produção das aureocinas A70 e A53 para uso em alimentos e caracterização da Bac 3682

À Luciana Figueiredo Nascimento
(*in memorian*),

Colega e querida amiga, pela frutífera convivência em muitos trabalhos acadêmicos; nos bate-papos informais, regados pelos mistos quentes e sucos e que mesmo em sua breve passagem, interrompida no decorrer desse trabalho, ainda assim, foi capaz de trazer inspiração, além de lições de vida.

Mas é claro que o sol vai voltar amanhã
Mais uma vez eu sei
Escuridão já vi pior de endoidecer gente sã
Espera que o sol já vem.

(...)

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar no sonho que se tem,
ou que seus planos nunca vão dar certo,
ou que você nunca vai ser alguém.
Tem gente que machuca os outros.
Tem gente que não sabe amar,
mas eu sei que um dia a gente aprende.
Se você quiser alguém em quem confiar,
confie em si mesmo.
Quem acredita sempre alcança!

Rennato Russo

AGRADECIMENTOS

Um trabalho acadêmico é cercado por aventuras, desventuras, certezas, dúvidas. Mas tudo isso é necessário e é constituinte do processo de produção do conhecimento ao qual se soma um crescimento pessoal, pois as relações com o mundo e com os outros também vão sendo construídas. Esta é, então, a razão pela qual, gostaria de manifestar os seguintes agradecimentos.

À minha orientadora, Maria do Carmo de Freire Bastos que, graças a sua sabedoria e profissionalismo, sempre soube oferecer, na medida certa, meios para meu crescimento intelectual e pessoal, não se limitando, portanto, ao trabalho acadêmico. Sua franqueza e posicionamentos, nos momentos mais difíceis, despertaram-me para melhor entender e enfrentar os desafios e impasses que iam se impondo.

À professora Maria Helena Miguez da Rocha Leão, pela oportunidade de realização deste trabalho, através de suas indicações e observações. Pelo seu profissionalismo como docente e sua contribuição para o desenvolvimento da pesquisa científica.

Às professoras Celuta Sales Alviano e Daniela Sales Alviano, pela ajuda na obtenção das Bac concentradas e utilizadas nos experimentos de vida de prateleira.

Às professoras Maria Aparecida V. P. Britto e Kátia Regina Netto dos Santos, pela cessão e auxílio de identificação, respectivamente, das estirpes de *Staphylococcus* spp.

Aos companheiros de curso da área biomédica, chamados em alguns momentos de “biocoisas”, pela determinação, cujas circunstâncias desafiadoras soubemos superá-las.

À Janaína dos Santos Nascimento, de quem fui constantemente contemplada com incentivos e de quem também sou eterna admiradora.

Aos colegas de Laboratório – Amina Potter (sempre com palavras de incentivo), Andreza Duarte de Souza (amiga batalhadora, cujo destino sempre nos aproxima), Bruna (sempre com palavras de tranqüilidade), Hilana Ceotto (mesmo longe, não faltaram palavras encorajadoras), Karla Fernanda (e sua alegria contagiante), Marcos Lívio Varella Coelho (sempre solícito, bom ouvinte e conselheiro de questões então inquietantes), Maria Danielly e Ilana – sem os quais não se desenvolveria um agradável convívio que tornou minha caminhada menos árdua.

À Mariana Miguez e Tatiana Félix que se mantiveram solícitas em relação aos debates e inquietações que envolveram esta pesquisa.

Ao CNPq, pela bolsa de auxílio técnico a mim concedida.

Ao CNPq, PRONEX e FAPERJ, pelas verbas concedidas ao laboratório de genética molecular.

Ao meu namorado Alexandre, pela paciência, compreensão e carinho, sobretudo, nos muitos momentos em que fiquei ausente para estudar.

À minha querida Gracinha, que desde pequena me acompanha, pelos seus conselhos, conversas e comidinhas maravilhosas que muito me fortaleceram.

A meus pais, que se desdobraram a vida inteira por mim. Souberam sempre, com muito amor, sabedoria e excessiva paciência lidar com as minhas angústias e os momentos de desesperanças, inclusive nas circunstâncias em que eles mesmos buscaram em mim a força necessária para superar suas dificuldades. Quando alguns problemas surgiam, acabamos nos unindo ainda mais, fortalecendo, desse modo, os laços de cumplicidade e de admiração. Agradeço-lhes por serem exemplos, verdadeira referência que tem servido de inspiração para as minhas conquistas. Amo vocês!!!

A Deus, que sempre esteve (e estará) presente em todos os momentos, sendo que as dificuldades, algumas vezes buscadas por mim, apresentam-se como um grande desafio e um verdadeiro exercício de fé para a sua superação.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABC – " ATP-Binding Cassete" (Cassete ligante de ATP)

ATCC – "American Type Culture Collection"

Bac – Bacteriocina (s)

BAL- Bactérias do Ácido Láctico

BHI- "Brain Heart Infusion" (Infusão de Cérebro e Coração)

Da – Dalton (s)

DNA- "Deoxiribonucleic Acid" (Ácido Desoxirribonucléico)

DO – Densidade Óptica

EDTA – "Ethylene Diamine Tetraacetic Acid" (ácido Etileno Diamino Tetraacético)

FDA- "Food and Drug Administration (Agência de Medicamentos e Alimentos)

G – Ácido α-L-gulurônico

GRAS – "Generally Recognized As Safe" (Geralmente Reconhecido Como Seguro)

HPLC – "High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

kb – Quilobase (s), 1.000 pb

kDa – Quilodalton (s), 1.000 Da

M- Ácido β-D-manurônico

MRSA- "Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*" (*Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina)

NCTC – "National Collection of Type Cultures" (Coleção Nacional de Culturas Tipo)

PD- Peptona-Dextrose

pH – Potencial Hidrogeniônico

p/v – Peso por Volume

PYR – "Pyrolidonyl-beta-naphthylamide" (Pirrolidonil-beta-naftilamida)

Q_p – Produtividade em Termos de Produto

Q_x – Produtividade em Termos de Células Formadas

R – Rendimento

rpm – Revoluções por Minuto

SAM- Substância (s) Antimicrobiana (s)

SC- "Supercoiled" (super-hélice)

SCN- *Staphylococcus* coagulase-negativo (s)

SCP – *Staphylococcus* coagulase-positivo (s)

SDS – “Sodium Dodecil Sulfate” (Dodecil Sulfato de Sódio)

TE – Tampão de Tris-EDTA

TAE – Tampão de Tris-Acetato-EDTA

TFA- Àcido Trifluoroacético

TSS – “Toxic Shock Syndrome” (Síndrome do Choque Tóxico)

t_d – Tempo de duplicação (min)

Tris – Tris (hidroxi-metil-amino-metano)

TSB – “Triptic- Soy Broth” (Caldo de Soja Tríptica)

UA - Unidades Arbitrárias

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

U.V. – Ultravioleta

V- Volts

v/v – Volume por Volume

VP- Voges- Proskauer

YPD – Extrato de Levedura Peptona Dextrose

$Y_{p/x}$- Conversão de Bac por células formadas

x*g* – Gravidades

μ - Taxa específica de crescimento (h^{-1})

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura dos lantibióticos nisina e lacticina 3147 11

Figura 2: Modo de ação das Bac produzidas por bactérias Gram-positivas 14

Figura 3: Wipe-out® - lenços comercializados que contêm a Bac nisina 23

Figura 4: Modo geral de ação da nisina 27

Figura 5: Diferentes modos de incorporação de aditivos em alimentos 30

Figura 6: Alga *Macrocystis pyrifera* 35

Figura 7: Estrutura química dos ácidos que formam o ácido algínico. 35

Figura 8: Formação do gel de alginato de cálcio 37

Figura 9: Fibracol Plus® da Johnson & Johnson 38

Figura 10: Produção de Bac pelas estirpes A70 e A53 54

Figura 11: Curva de crescimento da estirpe de *S. aureus* A70 nos meios de cultura BHI e YPD 56

Figura 12: Curva de produção da aureocina A70 nos meios BHI e YPD 57

Figura 13: Histograma do tamanho dos halos de inibição (em mm), contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547, causados pela aureocina A70 não diluída, produzida nos meios BHI e YPD 59

Figura 14: Curva de crescimento da estirpe *S. aureus* A53 nos meios de cultura BHI e YPD 60

Figura 15: Curva de produção da aureocina A53 nos meios BHI e YPD 61

Figura 16: Histograma do tamanho dos halos de inibição (em mm), contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547, causados pela produção da aureocina A53 produzida nos meios BHI e YPD 62

Figura 17: Cinética de ação das aureocinas A70 (**A**) e A53 (**B**) contra a estirpe *L. innocua* ATCC 33090 69

Figura 18: Titulação das aureocinas contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 no início da vida de prateleira 70

Figura 19: Histogramas da vida de prateleira das aureocinas A70 (A) e A53 (B) às temperaturas de -20°C, 4°C e 25°C, durante o período de 72 semanas 72

Figura 20: Mudança nos títulos (desaparecimento dos halos de inibição nas diferentes diluições em relação à primeira verificação) das aureocinas 73

Figura 21: Verificação da inibição ou não da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 pela ação da aureocinas A70 (A) e A53 (B) aprisionadas em matriz de alginato/gelatina 75

Figura 22: Inibição da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 pela ação das aureocinas A70 e A53 adsorvidas ao material plástico 77

Figura 23: Detecção da produção de substâncias antimicrobianas 90

Figura 24: Eletroforese do DNA plasmidial das quatro estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM, em gel de agarose 0,7% (p/v), a 80 V por 8 h em tampão TAE 94

Figura 25: Perfil de eluição da Bac 3682 submetida à terceira etapa de HPLC de fase reversa (coluna "Sephasil Peptide C_8"). 99

Figura 26: Espectometria de massa MALDI-TOF/TOF da Bac 3682. 100

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sumário das características das aureocinas A70 e A53. 19
Tabela 2: Sumário das características de Bac produzidas por SCN 21
Tabela 3: Fatores limitantes da eficácia das Bac 25
Tabela 4: Bacteriocinas produzidas utilizando-se a técnica de expressão heteróloga com BAL 33
Tabela 5: Valores da taxa específica de crescimento na fase log (intervalo de 2 a 4 h) e do tempo de duplicação encontrados para as estirpes *S. aureus* A70 e A53 65
Tabela 6: Rendimentos encontrados para a produção das aureocinas A70 e A53 66
Tabela 7: Produtividades encontradas para as estirpes *S. aureus* A70 e A53 67
Tabela 8: Resultados dos testes bioquímicos para a identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal produtoras de SAM 91
Tabela 9: Identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM 92
Tabela 10: Testes de sensibilidade das SAM a enzimas proteolíticas e ao NaOH 0,2 N 93
Tabela 11: Ação das Bac produzidas por *S. aureus* e *S. epidermidis* contra as estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal 95
Tabela 12: Ação das SAM produzidas pelas estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal sobre as estirpes de *S. epidermidis* e de *S. aureus* produtoras de Bac 96
Tabela 13: Síntese dos resultados obtidos com os testes de imunidade cruzada 96
Tabela 14: Espectro de ação da estirpe 3682 97
Tabela 15: Quantificação da Bac 3682 durante as etapas de purificação 98

RESUMO

Este trabalho investigou o potencial de aplicação das aureocinas A70 e A53 na preservação de alimentos, além de detectar novas bacteriocinas (Bac) com o mesmo potencial de aplicação. Na primeira parte deste trabalho, verificou-se que o meio de cultura BHI, ainda que mais oneroso para a indústria, mostrou ser o melhor meio de cultura para a produção das aureocinas A70 e A53. A produção máxima da aureocina A70 no meio BHI (1.600 UA/ml) foi alcançada com 8 h de crescimento da estirpe. Com relação à produção da aureocina A53, o máximo de produção foi de 400 UA/ml, com 6 h de crescimento da estirpe no meio BHI. Os valores determinados para a taxa específica de crescimento (durante a fase log) foram de 1,41 h^{-1} e tempo de duplicação de 30 min, para a estirpe *S. aureus* A70, e de 1,35 h^{-1} e 31 min, para a estirpe *S. aureus* A53, neste meio. O rendimento de conversão de Bac em relação ao consumo de glicose e as produtividades relativas ao produto (Bac) formado foram maiores para ambas as estirpes em meio BHI do que no meio YPD. A cinética de ação da aureocina A70 parece ser bactericida contra a estirpe de *Listeria innocua* ATCC 33090. Entretanto, esta Bac não parece promover uma lise celular acentuada. Contudo, a ação exercida pela aureocina A53 contra a mesma estirpe testada foi bacteriolítica. A meia-vida da aureocina A70, à temperatura de 25°C, foi de oito semanas, enquanto que a 4°C a meia-vida só foi observada na 20ª semana do experimento. Com relação à temperatura de -20°C, a meia-vida da aureocina A70 ocorreu no intervalo entre a 20ª e a 24ª semanas de armazenamento. Com relação à temperatura de 25°C, a meia-vida da aureocina A53 foi observada já na quarta semana, enquanto que a 4°C só foi detectada após 72 semanas. Não foi detectada alteração do título da aureocina A53 a -20°C, durante o experimento. Estes resultados mostram que a aureocina A53 é mais estável com relação à ação dos fatores temperatura de armazenamento e tempo associado do que a aureocina A70. Os experimentos de aprisionamento das aureocinas A70 e A53 em matriz de alginato/gelatina revelaram que uma seção do filme com 1,5 cm^2 gerou a formação de uma zona de inibição de tamanho igual a 3,4 ± 0,2 cm^2, proporcionada pela ação da aureocina A70 contra a estirpe *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, indicando que esta Bac foi liberada da matriz de alginato/gelatina. Por outro lado, este fato não foi observado com relação à ação da aureocina A53 aprisionada a esta matriz. Os experimentos de adsorção das aureocinas a material plástico revelaram que ambas permaneceram adsorvidas à superfície plástica utilizada e ativas.Na segunda parte deste trabalho, 21 estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal foram investigadas quanto à produção de substância antimicrobiana (SAM). Apenas quatro estirpes apresentaram atividade inibitória contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547, sendo

duas identificadas como *S. intermedius*, uma como *S. hyicus* e uma como *S. epidermidis*. Com exceção da substância produzida pela estirpe 3682, as demais SAM possuem natureza protéica, revelando serem Bac típicas. Nenhuma das estirpes parece possuir forma plasmidial, indicando que a Bac seja codificada pelo cromossomo. A SAM produzida pela estirpe 3682 apresentou-se diferente de todas as estafilococcinas utilizadas neste trabalho. Ela também inibiu todas as estirpes do gênero *Listeria* empregadas e a estirpe de *Bacillus coagulans* UH, demonstrando o potencial de aplicação desta Bac contra esses microrganismos de importância em alimentos. Após a purificação, a Bac 3682 teve a sua massa molecular estimada em 2.139 Da.

Abstract

This work investigated the potential application of aureocins A70 and A53 in food preservation or as therapeutical agents, and searched new bacteriocins (Bac) with the same potential application. In the first part of this work, it was verified that the culture medium BHI, despite of being more onerous for the industry, proved to be the best culture medium for the production of aureocins A70 and A53. The maximum production of aureocin A70 in BHI medium (1,600 AU/ml) was reached with 8 h of bacterial growth. With regard to the production of aureocin A53, the maximum production achieved was 400 AU/ml, with 6 h of growth of the strain in BHI medium. The values determined for the specific growth rate (in the log phase) were of 1,41 h^{-1} and the time of duplication was 30 min, for the strain *S. aureus* A70, and 1,35 h^{-1} and 31 min, for the strain *S. aureus* A53, in this same medium. The yield of conversion of bacteriocin (Bac) in relation to glucose consumption and the relative productivity to the product (Bac) formed were higher for both strains in the BHI medium than in YPD. The kinetics of action of aureocin A70 seemed to be bactericidal against the strain *Listeria innocua* ATCC 33090. However, this Bac did not seem to promote a striking cellular lysis. However, the action exerted by aureocin A53 against the same tested strain was bacteriolytic. With regard to the shelf-life, the initial titre of aureocin A70 remained unchanged, at the different temperatures, until the fourth week of storage. The half-life of aureocin A70 was observed in the eight week at the temperature of 25°C and in the 20th week of the experiment at 4°C. With regard to the temperature of -20°C, the half-life of aureocin A70 occurred in the interval between the 20th and 24th weeks of storage. It was not observed any change in the initial titre of aureocin A53 in the first 48 weeks of the experiment, at the temperatures of -20°C and 4°C. With regard to the temperature of 25°C, the half-life was observed already in the fourth week of the experiment. The half-life of aureocin A53 at 4°C was only detected after 72 weeks of storage. There was no alteration of the titre of aureocin A53 at -20°C, during the entire experiment. These results show that aureocin A53 is more stable with regard to the action of the factors temperature of storage and time associated than aureocin A70. The experiments of capture of the aureocins A70 and A53 in alginato/gelatin matrix showed that a section of the film with 1.5 cm^2 generated the formation of an inhibition zone of 3.4± 0.2 cm^2, due to the action of aureocin A70 against *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, indicating that this Bac was released from the alginate/gelatin matrix. On the other hand, the same was not observed with regard to aureocin A53 imprisoned to this matrix. The experiments of bacteriocin adsorption on the plastic material used for food conservation showed that both aureocins remained adsorbed to the plastic surface and active.

In the second part of this work, 21 strains of *Staphylococcus* spp. of animal origin were investigated for antimicrobial substance (AMS) production. Only four strains showed inhibitory activity against the indicator strain *C. fimi* NCTC 7547. Half of them was identified as *S. intermedius* and the others were identified as *S. epidermidis* and *S. hyicus*. With exception of the substance produced by strain 3682, the other AMS possess proteinaceous nature, being, therefore, typical Bac. None of the strains seems to possess plasmid DNA, indicating that the Bac is encoded by the chromosome. The AMS produced by strain 3682 proved to be different from all staphylococcins used in this work. It also inhibited all strains of the *Listeria* genus tested and the strain *Bacillus coagulans* UH, revealing the potential application of this Bac against these microrganisms of importance in foods. After purification, the molecular mass of Bac 3682 was estimated as 2,139 Da.

Sumário

Lista de siglas e abreviaturas viii
Lista de figuras x
Lista de tabelas xii
Resumo xiii
Abstract xv

1. Introdução 1
2. Revisão Bibliográfica 3
2.1 O gênero *Staphylococus* 3
2.1.1. *Staphylococcus aureus* 3
2.1.2. *Staphylococcus* coagulase-negativos 6
2.1.3. Aplicações dos *Staphylococcus* spp. na indústria 7
2.2. Bacteriocinas 8
2.2.1. Classificação das Bacteriocinas 10
2.2.2. Bacteriocinas produzidas por *S. aureus* 15
2.2.3 Bacteriocinas produzidas por estirpes de *S. aureus* estudadas em nosso laboratório 16
2.2.3.1 Aureocina A70 17
2.2.3.2 Aureocina A53 18
2.2.4 Bacteriocinas produzidas por outras espécies de *Staphylococcus* 20
2.3 Aplicações biotecnológicas das Bac 22
2.3.1 Aplicação clínica e veterinária 22
2.3.2 Aplicação como biopreservativos de alimentos 23
2.4 Embalagens bioativas 28
2.5 Produção heteróloga de Bac 31
2.6 Agentes utilizados na formação de matriz de filmes 33
2.6.1 Alginato 34
2.6.2 Gelatina 38
3. Objetivos 40
3.1 Objetivo geral 40

3.2 Objetivos específicos 40

Parte 1 – Investigação do potencial de utilização das aureocinas A70 e A53 como biopreservativos de alimentos 42

4. Materiais e Métodos 43

4.1 Estirpes bacterianas utilizadas e condições de cultivo 43

4.1.1 *Staphylococcus* spp. 43

4.1.2 Outras estirpes bacterianas utilizadas como indicadoras 43

4.1.3 Meios de cultura 44

4.1.4 Outros materiais 44

4.2 Avaliação da produção de Bac pelas estirpes *S. aureus* A70 e A53 45

4.3 Curva de crescimento das estirpes *S. aureus* A70 e A53 nos meios BHI, YPD e PD 45

4.4 Curva de produção das aureocinas A70 e A53 nos meios BHI, YPD e PD 45

4.5 Determinação das unidades arbitrárias das Bac (UA/ml) 46

4.6 Metodologias utilizadas nos cálculos das variáveis de resposta 46

4.6.1 Fatores de conversão 46

4.6.1.1 Conversão de substrato (glicose) em Bac 47

4.6.1.2 Conversão de Bac por células formadas 47

4.6.2 Produtividade 47

4.6.2.1 Produtividade em termos de produto 47

4.6.2.2 Produtividade em termos de células formadas 47

4.7 Expressões matemáticas do crescimento 48

4.7.1 Taxa específica de crescimento 48

4.7.2 Tempo de duplicação 48

4.8 Determinação da cinética de ação das aureocinas A70 e A53 49

4.8.1 Obtenção das preparações de Bac 49

4.8.2 Titulação das aureocinas A70 e A53 em microplacas de poliestireno 49

4.8.3 Análise da cinética de ação das aureocinas A70 e A53 49

4.9 Avaliação da vida de prateleira das aureocinas A70 e A53 50

4.9.1 Crescimento das estirpes *S. aureus* A70 e A53 e preparo do sobrenadante contendo as aureocinas 50

4.9.2 Estudo da vida de prateleira das aureocinas A70 e A53 50

4.9.3 Estudo da meia-vida das aureocinas A70 e A53 51

5. Aprisionamento das aureocinas A70 e A53 em matriz de alginato e gelatina 51
5.1 Obtenção das aureocinas A70 e A53 (semipurificadas) a partir de precipitação com sulfato de amônio 51
5.2 Produção de matriz de alginato /gelatina com adição das Bac semipurificadas 51
5.3 Verificação da atividade das aureocinas A70 e A53 aprisionadas em matriz de alginato/gelatina 52
5.4 Verificação da adsorção das aureocinas A70 e A53 a plástico utilizado na conservação de alimentos 52
5.5 Análise estatística 53
6. Resultados, Discussão e Conclusões 54
6.1 Verificação da produção de Bac pelas estirpes *S. aureus* A70 e A53 54
6.2 Curvas de crescimento e produção de Bac pelas estirpes *S. aureus* A70 e A53 em diferentes meios de cultura 54
6.2.1 Curva de crescimento da estirpe A70 e produção da aureocina A70 55
6.2.2 Curva de crescimento da estirpe A53 e produção da aureocina A53 59
6.3 Resultados obtidos através dos cálculos das variáveis de resposta 64
6.3.1 Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação 64
6.3.2 Rendimentos 66
6.3.3 Produtividades 67
6.4 Verificação da cinética de ação das aureocinas A70 e A53 68
6.5 Avaliação da vida de prateleira e meia-vida das aureocinas A70 e A53 70
6.6 Aprisionamento das aureocinas A70 e A53 em matriz de alginato/gelatina 74
6.7 Adsorção das aureocinas A70 e A53 a material plástico utilizado na conservação de alimentos 76
6.8 Conclusões 78
Parte 2 – Detecção da produção de SAM por estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal 80
7. Materiais e Métodos 81
7.1 Estirpes bacterianas utilizadas 81
7.2 Condições de cultivo 81
7.3 Outros materiais 81
7.4 Produção de substâncias antimicrobianas 82
7.5 Identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM a partir de testes bioquímicos convencionais 83

7.5.1 Teste de produção da coagulase 83
7.5.2 Produção da enzima pirrolidonil-arilamidase (PYR) 83
7.5.3 Hidrólise da uréia 84
7.5.4 Fermentação de carboidratos 84
7.5.5 Utilização do sistema comercial API-Staph 85
7.6 Sensibilidade das SAM a enzimas proteolíticas 85
7.7 Sensibilidade das SAM ao NaOH 0,2 N 85
7.8 Testes de imunidade cruzada 86
7.9 Extração de DNA plasmidial das estirpes SAM^+ 86
7.10 Eletroforese de DNA em gel de agarose 87
7.11 Determinação do espectro de ação da Bac 3682 87
7.12 Purificação da Bac 3682 88
7.12.1 Precipitação com sulfato de amônio 88
7.12.2 Cromatografia de troca catiônica 88
7.12.3 HPLC de fase reversa 89
7.12.4 Espectrometria de massa 89
8. Resultados, Discussão e Conclusões 90
8.1 Produção de substâncias antimicrobianas 90
8.2 Identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal 91
8.3 Sensibilidade das SAM a enzimas proteolíticas e ao NaOH 0,2 N 93
8.4 Análise do perfil de DNA plasmidial das estirpes SAM^+ 94
8.5 Ação das Bac produzidas por *S. aureus* e *S. epidermidis* sobre as estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal 95
8.6 Ação das SAM produzidas pelas estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal sobre as estirpes de *S. aureus* e *S. epidermidis* produtoras de Bac 96
8.7 Espectro de ação da Bac 3682 97
8.8 Purificação da Bac 3682 98
8.9 Conclusões 101
Perspectivas Futuras 101
Referências Bibliográficas 103

Introdução

Bacteriocinas (Bac) são proteínas ou peptídios antimicrobianos com capacidade de matar ou inibir o crescimento de, pelo menos, estirpes de uma mesma espécie ou de espécies evolutivamente relacionadas à bactéria produtora. A habilidade das Bac produzidas por bactérias Gram-positivas inibirem vários patógenos presentes em alimentos, como *Listeria 24monocytogenes e Clostridium botulinum*, demonstra a relevância do estudo destas substâncias. *L. monocytogenes* é um importante patógeno de seres humanos e de animais, sendo a listeriose em animais de grande importância econômica, resultando em 60% de casos fatais. Outro importante ponto é a facilidade de contaminação por este microrganismo, que pode ser causada pelas mãos, utensílios contaminados e até pelo ar (STILES, 1996).

As aureocinas A70 e A53 são Bac produzidas pelas estirpes de *Staphylococcus aureus* A70 e A53, respectivamente, e que possuem um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, inclusive contra *L. monocytogenes.*

Hoje em dia, consumidores estão cada vez mais preocupados com os aditivos que são utilizados na conservação de alimentos. Os benefícios de alimentos naturais, processados com a menor quantidade de preservativos químicos, estão se tornando cada vez mais atrativos (SETTANNI & CORSETTI, 2008). Na Europa, por exemplo, existe uma crescente necessidade de eliminação do uso de aditivos e de ingredientes artificiais em alimentos, tornando-os menos processados, prontos para consumo e com apelo de alimentos funcionais. A demanda por estes tipos de alimentos poderia ser alcançada, mesmo que em parte, através do emprego das Bac como biopreservativos de alimentos (GÁLVEZ *et al*., 2007).

Alimentos podem ser suplementados com preparações *ex situ* de Bac, na sua forma purificada ou semipurificada, ou pela inoculação da estirpe produtora de Bac, sob condições que favoreçam a sua produção (STILES, 1996). As Bac que são produzidas *ex situ* podem também ser aplicadas imobilizadas a uma matriz. As matrizes atuam como reservatórios e/ou como difusores de moléculas de Bac aprisionadas, sendo aplicadas em alimentos, promovendo a sua proteção. A matriz, por outro lado, pode conferir proteção à Bac, uma vez que a interação com componentes do alimento pode vir a promover a inativação da Bac. Uma variedade de métodos de imobilização vem sendo propostos, como: adsorção das Bac a materiais plásticos, incorporação a matrizes de diversos tipos, como gelatina, alginato, celulose, polietileno, entre outros. Um recente avanço neste campo foi a utilização de Bac imobilizadas para o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas. Com isso, a utilização de filmes contendo

Bac pode vir a aumentar a qualidade e segurança, além de prolongar a vida de prateleira de produtos alimentícios (GÁLVEZ *et al*., 2007) .

Com o aumento do número de estirpes bacterianas resistentes à ação de antimicrobianos, especialmente contra vários patógenos humanos e animais, a procura por novas substâncias e estratégias para o controle e combate de infecções deste tipo vem sendo acentuada. Uma estratégia alternativa para o combate de infecções, como as descritas anteriormente, seria o possível emprego das Bac. A maioria das estafilococcinas, Bac produzidas por estirpes de *Staphylococcus* spp., inibe muitas espécies bacterianas, incluindo vários patógenos, e, portanto, possui potencial de aplicação, tanto como aditivos químicos, quanto na prevenção e no tratamento de infecções bacterianas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O gênero *Staphylococcus*

Em 1884, Rosenbach descreveu pela primeira vez os membros do gênero *Staphylococcus*: cocos Gram-positivos em forma de cachos irregulares, imóveis, não formadores de esporos, catalase-positivos, anaeróbios facultativos, possuindo um genoma com baixo conteúdo G+C, entre 30 e 39% (ROSENBACH, 1884, *apud* KLOOS, SCHLEIFER & GÖTZ, 1991; BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Estes microrganismos pertencem à família Staphylococcaceae (GARRITY & HOLT, 2001) e, segundo Euzéby (2007), o gênero é composto por 41 espécies e 24 subespécies.

Os estafilococos estão amplamente distribuídos na natureza, embora sejam freqüentemente isolados de pele e de membranas mucosas de humanos e de animais. São encontrados algumas vezes na boca, nas glândulas mamárias, no sangue, nos tratos respiratório superior, intestinal e geniturinário (KLOOS, SCHLEIFER & GÖTZ, 1991). São também isolados de uma variedade de alimentos como carnes, queijos e leite (IRLINGER, 2008).

Os estafilococos são divididos em dois grupos, os coagulase-positivos (SCP) e os coagulase-negativos (SCN), baseando-se na presença ou na ausência da enzima coagulase, que converte o fibrinogênio do plasma sangüíneo em fibrina. Dentre as espécies de SCP, podemos destacar *S. aureus*, *S. intermedius* e algumas estirpes de *S. hyicus*, e, entre os SCN, as espécies *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. capitis*, entre outras (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004; BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Pertencente ao grupo dos SCP, os *Staphylococcus aureus* foram a primeira espécie a ser identificada, sendo sempre associados a uma série de infecções, como feridas cutâneas, pneumonias, meningites e septicemia (KLOOS & LAMBE, 1991; MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004). Ainda é uma espécie de extrema importância médica, podendo causar abscessos, infecções do sistema nervoso central, endocardites e diversas síndromes, como a da pele escaldada e a síndrome do choque tóxico (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

As infecções causadas por *S. aureus* podem ser divididas em dois grupos: as adquiridas na comunidade e as adquiridas em ambiente hospitalar. Infecções adquiridas na comunidade incluem doenças mediadas por toxinas, como a síndrome do choque tóxico, infecções de pele, celulites, endocardites, infecções do trato urinário, entre outras. No que diz respeito a infecções nosocomiais ocasionadas por este microrganismo, estas infecções podem estar associadas, por exemplo, com a utilização de ventiladores, em casos de pacientes com pneumonia, com a utilização de dispositivos intravenosos, em casos de bacteriemia, e com infecções relacionadas ao emprego de enxertos vasculares (PEACOCK, 2007; BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

S. aureus é o maior agente causador de artrite séptica primária e osteomielite em todas as idades. Complicações, como sepse, necrose tecidual e dor crônica, podem levar o indivíduo à paralisia e à morte se a infecção por este microrganismo não for diagnosticada e combatida rapidamente (PEACOCK, 2007).

Outro tipo de infecção associada aos *S. aureus* são as infecções pulmonares. Estas se estabelecem através da inalação do microrganismo a partir do local de colonização, via tubo endotraqueal em pacientes com necessidade de utilização de ventiladores, ou através da sua disseminação devido a casos de bacteriemia. Seu diagnóstico é complicado, uma vez que este microrganismo é um colonizador normal do trato respiratório superior. A necrose do tecido pulmonar pode ser observada pela rápida proliferação do microrganismo, afetando principalmente crianças saudáveis e adultos jovens (GILLET & ISSARTEL, 2002 *apud* PEACOCK, 2007).

A produção de enterotoxinas por *S. aureus* está comumente associada com casos de intoxicação alimentar. As enterotoxinas estafilocócicas são caracterizadas como sendo proteínas simples, ricas em lisina, tirosina, ácidos aspártico e glutâmico, apresentando duas moléculas de cisteína formando ponte de dissulfeto. Possuem peso molecular variando entre 26 kDa e 29 kDa e, quando em seu estado ativo, apresentam resistência à ação de enzimas proteolíticas como tripsina, papaína e pepsina. A enterotoxina A é a mais freqüente e atua como um superantígeno, envolvendo a estimulação sistêmica de um grande número de células T (SHILIEVERT *et al.*, 2000; YOUNIS *et al.*, 2003).

A síndrome da pele escaldada é outra doença comumente associada a infecções por *S. aureus* e se refere a várias bolhas na pele, induzidas pelas toxinas esfoliativas. Esta doença afeta, em geral, neoatos e crianças pequenas, apesar de que adultos com doenças debilitantes também podem ser susceptíveis. A gravidade desta doença varia de poucas bolhas a uma grave descamação, afetando toda a superfície do corpo (PEACOCK, 2007).

Certas estirpes de *S. aureus* têm sido associadas à síndrome do choque tóxico (TSS- "toxic shock syndrome"), sendo esta doença o resultado de uma infecção caracterizada por febre alta, erupções cutâneas, vômito, diarréia e, ocasionalmente, a morte. A TSS tem sido associada ao uso de tampões por mulheres em período menstrual, pois o sangue e o muco da vagina tornam-se colonizados por *S. aureus* hemolíticos da pele e a presença do tampão cria um ambiente propício para o crescimento deste microrganismo (DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT , 2000; PEACOCK, 2007).

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, como a meticilina e outras penicilinas, promoveu a emergência de estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) no ambiente hospitalar, fato este que vêm dificultando o tratamento e o controle das infecções provocadas por este microrganismo. Estirpes de MRSA contêm o gene *mecA* que codifica uma proteína ligante à penicilina (PBP2a), com baixa afinidade pela droga. Este gene faz parte de um elemento genético móvel presente no cromossomo (cassete cromossômico) destas estirpes e confere resistência a vários antibióticos β-lactâmicos (KATAYAMA, ITO & HIRAMATSU, 2000; PEACOCK, 2007). Esta situação continuou a evoluir com a descrição de MRSA adquiridos pela comunidade, colonizando indivíduos ou envolvidos em casos de infecção, sendo estas estirpes resistentes a vários antibióticos não pertencentes ao grupo dos β-lactâmicos (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Além disso, estirpes de MRSA resistentes à vancomicina passaram a ser isoladas a partir de 1997, uma vez que esta resistência parece ter evoluído de estirpes de MRSA em pacientes que receberam tratamento prolongado com vancomicina (PEACOCK, 2007). Este fato vem tornando o tratamento de infecções por este patógeno cada vez mais difícil.

No campo da veterinária, *S. aureus* juntamente com *Streptococcus* spp. ainda são a causa mais freqüente de mastite bovina, que é uma infecção supurativa nos úberes de vacas, sendo caracterizada pela grande quantidade de pus produzido e pela eventual destruição tecidual do local (JOUSIMIES-SOMER, PYÖRÄLÄ & KANERVO, 1996). Alteração da qualidade do leite, rejeição do leite pela indústria, custos adicionais com a administração de antibióticos são alguns dos possíveis prejuízos enfrentados por fazendeiros (COELHO *et al*., 2007).

Em razão da problemática envolvendo a resistência a antimicrobianos, tanto no âmbito clínico como no campo da veterinária, o estudo e o desenvolvimento de novos métodos de controle e de tratamento de infecções causadas por este patógeno se fazem necessários.

2.1.2 *Staphylococcus* coagulase-negativos

Até os anos 70, acreditava-se que os SCN eram microrganismos não patogênicos, sendo vistos apenas como contaminantes de amostras clínicas. Porém, a sua importância clínica tornou-se crescente, uma vez que os SCN vieram a ser identificados como patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos, pacientes transplantados, recém-nascidos prematuros e devido ao uso de dispositivos médicos, como cateteres e próteses (ARCHER, 2000; PEACOCK, 2007). *S. epidemidis* é uma espécie de SCN que possui a sua patogênese relacionada principalmente à produção de polissacarídeos extracelulares, responsáveis pela produção de biofilme em superfície de biomateriais. É um patógeno que é relacionado também com casos de bacteriemia, infecções oculares e do trato urinário (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

S. haemolyticus é outra espécie de SCN com importância na área médica, uma vez que é o segundo SCN mais encontrado em infecções em humanos, estando relacionado a casos de septicemia, peritonite, infecções do trato urinário, entre outros (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

A maioria dos casos de infecções do trato urinário em mulheres jovens e sexualmente ativas é ocasionada por *S. saprophyticus*, outra espécie de SCN bastante estudada e que é o agente de 42% de todos os casos de infecções do trato urinário em mulheres com idades entre 16 e 35 anos (GATERMANN & CROSSLEY, 1997, MAURIELLO *et al.*, 2004; BANNERMAN & PEACOCK, 2007; IRLINGER, 2008).

No campo da veterinária, os SCN vêm sendo considerados patógenos de menos importância do que os *S. aureus*, em casos de mastite bovina (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Entretanto, espécies de SCN, como *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. hyicus* e *S. epidermidis*, vêm sendo freqüentemente isoladas de amostras de leite originado de vacas com mastite. No período de lactação, as infecções ocasionadas por estirpes de SCN estão associadas ao aumento do número células somáticas encontradas no leite, interferindo assim na sua qualidade (PYÖRÄLÄ & TAPONEN, *in press*).

Vários relatos vêm demonstrando a importância dos SCN em casos de intoxicação alimentar, ocasionados pela ingestão de alimentos contaminados. Algumas espécies de SCN, como *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis* e *S. hyicus*, podem estar relacionadas com casos de intoxicação alimentar. A enterotoxina E é a enterotoxina mais isolada a partir de espécies como *S. xylosus* e *S. equorum* isoladas de alimentos, porém,

alguns SCN também podem produzir outras toxinas como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (ZELL *et al*., 2008).

2.1.3 Aplicações dos *Staphylococcus* spp. na indústria

Muitas espécies de *Staphylococcus* vêm sendo utilizadas na indústria de alimentos como culturas iniciadoras de processos fermentativos de alimentos cárneos e de queijos (NIETO-LOZANO *et al*., 2002; IRLINGER, 2008), promovendo um aumento da vida de prateleira e aumentando a aceitabilidade do produto final. Um exemplo da aplicação destes microrganismos é demonstrado pela utilização de lipases produzidas por *Staphylococcus simulans* na formação de importantes moléculas aromáticas como o etil-valerato e o hexil-acetato, que promovem as fragrâncias de maçã verde e pêra, respectivamente. Estas moléculas vêm sendo alvo de estudos recentes que visam à utilização de um sistema livre de solventes (não tóxico) e que promova o aumento da síntese destes compostos, além de reduzir os custos de produção para os fabricantes. Estas fragrâncias são usadas mundialmente pelas indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos (KARRA-CHÂABOUNI *et al*., 2006).

Estirpes de *Lactococcus lactis* estão sendo utilizadas para expressar o gene *lip* (codificador da produção de lipase) de *S. hyicus,* com a finalidade de levar a lipase, por via oral, ao trato gastrintestinal de porcos com problemas de insuficiência pancreática. Este tratamento possui potencial de aplicação em humanos, uma vez que o custo e a segurança do mesmo parecem ser bastante promissores (DROUAULT *et al*., 2002).

S. carnosus e *S. simulans* são duas espécies de SCN que são utilizadas legalmente na Itália como culturas iniciadoras no preparo de lingüiças fermentadas, uma vez que podem prevenir a rancificação através da decomposição de peróxido, promover a produção de aromas e sabores, além de estabilizar a coloração deste tipo de alimento (CASABURI *et al*., 2006; LEROY, VERLUYTEN & De VUYST, 2006). Outra espécie de SCN que contribui para o aroma de lingüiças são os *S. saprophyticus,* que, além disso, ajudam a prevenir reações desagradáveis produzidas pela oxidação lipídica ocorrida durante o período de maturação deste tipo de alimento (MAURIELLO *et al*., 2004; IRLINGER, 2008).

Mauriello *et al*. (2004) avaliaram e determinaram as propriedades tecnológicas de estirpes de *Staphylococcus* para utilização como culturas iniciadoras em lingüiças processadas, através da avaliação das atividades de enzimas como proteases, lipases, nitrato-redutase, além de avaliarem a atividade antioxidante. A atividade da enzima nitrato-redutase promove a

estabilidade na coloração avermelhada deste tipo de alimento, enquanto que as atividades proteolítica e lipolítica contribuem para a textura e o sabor através da formação de compostos de baixo peso molecular, incluindo peptídios, ácidos aminados, entre outros compostos. A ação das enzimas catalase e superóxido-dismutase previne a oxidação de lipídios e dificulta o processo de rancificação. Neste mesmo estudo, estirpes de *S. xylosus* exibiram as melhores propriedades tecnológicas que possibilitariam o seu emprego como culturas iniciadoras em alimentos cárneos fermentados.

Estudos recentes sugerem que outras espécies de SCN, como *S. succinus* subsp. *case*i (PLACE *et al*., 2002) e *S. equorum* subsp. *lineus* (PLACE *et al*., 2003), podem ser utilizadas como ingredientes em culturas iniciadoras em queijos maturados "smear ripened cheese" e em típicos queijos suíços. Esta última espécie de *Staphylococcus* faz parte da microflora encontrada na salmoura durante o processo de maturação destes tipos de queijo. A sua utilização como cultura iniciadora, juntamente com a levedura *Debaryomyces hansenii,* promoveu uma maior proteção da superfície dos queijos testados, durante o processo de maturação, através do aumento do pH ocorrido já nos primeiros três dias. Ainda se fazem necessários estudos para se saber se ambos, leveduras e estafilococos, são componentes essenciais para a aplicação direta na superfície destes queijos, visando uma maior proteção contra possíveis contaminantes, ou se apenas a presença na salmoura é suficiente para tal resultado. Este fato poderia tornar as culturas iniciadoras menos complexas, além de mais baratas e fáceis de serem manipuladas (BOCKELMANN, 2002).

Pesquisas para a identificação de novas substâncias com propriedades antimicrobianas, que possam ser empregadas na prevenção e no tratamento de infecções bacterianas, estão sendo realizadas de maneira significativa. Da mesma maneira, muitos trabalhos direcionados para a descoberta de novas tecnologias de conservação de alimentos vêm sendo publicados (DIEP & NES, 2002).

2.2 Bacteriocinas

O estudo da inibição observada entre bactérias, além de outros princípios da microbiologia, tem suas origens relacionadas ao químico Louis Pasteur que, em 1877, em uma incansável busca visando controlar o crescimento do *Bacillus anthrax*, relatou a atividade inibitória, tanto *in vitro* como *in vivo*, entre bactérias isoladas de urina (provavelmente *Escherichia coli*) (TAGG, DAJANI & WANNAMAKER, 1976; HENG *et al*., 2007). Os estudos

pioneiros de Pasteur geraram um método de controle de infecções, a então chamada "estratégia de interferência bacteriana", visando conter a proliferação de patógenos.

Alexander Fleming, em 1929, descobriu as propriedades antibióticas da penicilina, substância produzida pelo fungo do gênero *Penicillium*, que promovia o controle eficaz das infecções por estafilococos, pneumococos e estreptococos (MADIGAN, MARTINGO & PARKER, 2004).

Desde a introdução na medicina humana, os antibióticos têm promovido um enorme impacto no tratamento das doenças infecciosas e no sucesso de procedimentos médicos invasivos, como cirurgias, e também no tratamento de doenças de origem veterinária. Contudo, o aumento da resistência microbiana aos antibióticos contrapõe-se às vantagens de seu emprego (HANCOCK, 2001). Deste modo, o interesse na descoberta de novas substâncias que possuam ação antimicrobiana vem sendo cada vez maior.

Muitos organismos procarióticos produzem uma variedade de moléculas heterogêneas durante o seu crescimento e que são antagonísticas para outros organismos. A função principal destas substâncias é a de promover uma vantagem em relação a organismos competidores que ocupam o mesmo nicho ecológico. Alguns exemplos destas substâncias abrangem toxinas, antibióticos, enzimas, subprodutos das vias metabólicas e as Bac (JACK, TAGG & RAY, 1995; CRUPPER & IANDOLO, 1996).

Bacteriocinas são proteínas ou peptídios sintetizados ribossomicamente por bactérias, que possuem atividade inibitória contra outras bactérias (JACK, TAGG & RAY, 1995; ENNAHAR *et al.*, 2000; McAULLIFE, ROSS & HILL 2001; GÁLVEZ *et al.*, 2007). As estirpes produtoras de Bac possuem um sistema de imunidade, que confere proteção contra suas próprias Bac. Este sistema de imunidade é geralmente expresso concomitantemente com os genes estruturais da Bac (JACK, TAGG & RAY, 1995; ENNAHAR *et al.*, 2000; BASTOS, CEOTTO & NASCIMENTO, 2005; DRIDER *et al.*, 2006; HENG *et al.*, 2007).

A síntese por ribossomos e a presença de um sistema de imunidade diferem as Bac de outros metabólitos produzidos por bactérias, como antibióticos, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, entre outros (BASTOS, CEOTTO & NASCIMENTO, 2005).

Os primeiros estudos em relação às Bac foram realizados com bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae e estabeleceram características para que uma substância antimicrobiana pudesse ser considerada uma Bac (TAGG, DAJANI & WANNAMAKER, 1976; LURIA & SUIT, 1987). Essas características envolvem:

- a presença de um componente de natureza protéica e que seja biologicamente ativo;
- um espectro de ação restrito a espécies relacionadas evolutivamente;
- sensibilidade a enzimas proteolíticas;
- ação bactericida;
- indução por UV e por mitomicina C;
- determinantes genéticos que codificam a produção de Bac e a imunidade, localizados em plasmídios.

Contudo, as Bac produzidas por bactérias Gram-positivas possuem características distintas quando comparadas com as produzidas por bactérias Gram-negativas (JACK, TAGG & RAY, 1995), como por exemplo:

- amplo espectro de ação contra bactérias, abrangendo muitas vezes organismos de diferentes gêneros e espécies;
- termorresistência;
- não indução por UV e por mitomicina C;
- determinantes genéticos localizados no cromossomo ou em transpósons conjugativos, embora a maioria seja codificada por plasmídios.

2.2.1 Classificação das Bacteriocinas

Baseando-se em estudos com bactérias do ácido láctico (BAL), as Bac produzidas por bactérias Gram-positivas podem ser divididas em quatro classes distintas (COTTER, HILL & ROSS, 2005, modificado por HENG *et al.*, 2007).

Classe I – Lantibióticos

A classe I compreende os peptídios que possuem ácidos aminados modificados, como: lantionina, ß-metil-lantionina e ácidos aminados desidratados, entre outros, que conferem a estes peptídios o nome de lantibióticos. Os lantibióticos podem ser divididos em três subclasses:

- subclasse A - lantibióticos que possuem estrutura linear (exemplo: nisina, produzida por estirpes de *Lactococcus lactis*);
- subclasse B – Bac com estrutura globular e compacta (exemplo: mersacidina, produzida por estirpes de *Bacillus* spp.) e
- subclasse C – Bac de dois componentes (exemplo: lacticina 3147, produzida por estirpes de *L. lactis*).

A figura 1 mostra a estrutura da nisina e da lacticina 3147, ambas Bac produzidas por BAL.

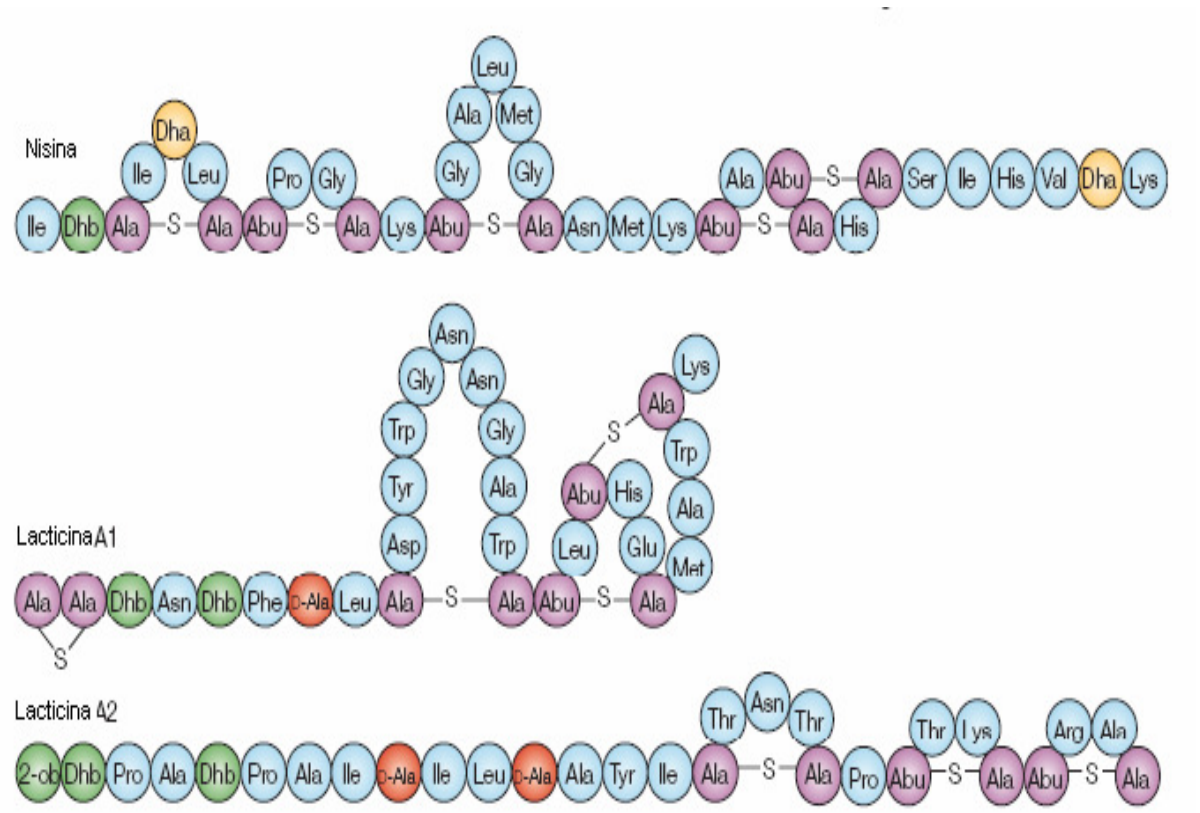

Figura 1: Estrutura dos lantibióticos nisina e lacticina 3147, ambas Bac produzidas por estirpes de *L. lactis*. Lantibióticos podem ser compostos por apenas um único peptídio, como a nisina, ou por dois peptídios que atuam sinergicamente, como a lacticina 3147 (adaptado de COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Classe II – Peptídios não portadores de ácidos aminados modificados

Esta classe é formada por pequenos peptídios, menores do que 10 kDa, não portadores de ácidos aminados modificados, e pode ser dividida em três subclasses:

- subclasse IIa – engloba os peptídios do tipo pediocina, sendo ativos contra *Listeria monocytogenes,* um importante patógeno associado a alimentos (exemplo: pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici* PA-1);
- subclasse IIb - compreende um complexo formado por dois ou mais peptídios diferentes (exemplo: aureocina A70, produzida por *S. aureus* A70; GIAMBIAGI-deMARVAL *et al*., 1990; NETZ *et al*., 2001) e
- subclasse IIc - compreende uma miscelânea de peptídios (exemplo: aureocina A53 produzida por *S. aureus* A53; NETZ *et al*., 2002).

Classe III – Bacteriocinas maiores do que 10 kDa

Esta classe abrange aquelas Bac onde as proteínas são maiores do que 10 kDa e geralmente termolábeis, com exceção da propionicina SM1 produzida por *Propionibacterium jensenii* (MIESCHER *et al*., 2000). A classe III é dividida em duas subclasses:

- subclasse IIIa – compreende as bacteriolisinas (enzimas com ação lítica) (exemplo: lisostafina, produzida por *S. simulans* subsp. *staphylolyticus*) e
- suclasse IIIb – Bac não líticas; sua ação envolve a dissipação da força próton-motora, levando ao extravasamento de ATPs, e morte celular (exemplo: helveticina J, produzida por *Lactobacillus helveticus*).

Classe IV – Bacteriocinas cíclicas

Nesta classe, estão agrupados os peptídios onde o primeiro e o último ácidos aminados do peptídio maduro são ligados covalentemente (exemplo: enterocina AS-48).

De uma forma geral, as Bac produzidas por bactérias Gram-positivas diferem das produzidas por bactérias Gram-negativas em razão do modo e do espectro de ação. As Bac produzidas por bactérias Gram-negativas formam poros na membrana citoplasmática ou exibem uma atividade de nuclease, quando penetram na célula sensível. Receptores específicos são necessários para a adsorção destas Bac à superfície das células sensíveis (JACK, TAGG & RAY, 1995).

Com relação ao modo de ação das Bac produzidas por bactérias Gram-positivas, estas podem apresentar tipos diferentes de modo de ação (figura 2). As Bac da classe I podem atuar formando poros na membrana plasmática, levando à dissipação do potencial de membrana, ao efluxo de metabólitos intracelulares e a inibição do transporte de ácidos aminados. Temos como exemplo de Bac que apresentam este tipo de ação a Pep 5, a epicidina 280, ambas produzidas por estirpes de *S. epidermidis*, e a nisina (McAULLIFE, ROSS & HILL, 2001). Outras Bac pertencentes a esta classe atuam inibindo a atividade de enzimas essenciais, como as envolvidas na biossíntese de parede celular. A mesarcidina é uma Bac que atua desta forma (COTTER, HILL & ROSS, 2005). Alguns peptídios da classe II possuem estrutura helicoidal anfipática, que lhes permite a sua inserção na membrana celular, promovendo despolarização e morte. As bacteriolisinas, como a lisostafina, podem atuar diretamente na parede celular de bactérias Gram-positivas, levando-as à lise celular (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Algumas Bac produzidas por BAL podem apresentar mais de um modo de ação. A nisina pode se ligar ao lipídio II, inibindo a síntese de parede celular, e também pode utilizá-lo como ligante para iniciar o processo de inserção na membrana e, com isso, promover a formação de poros (figura 2).

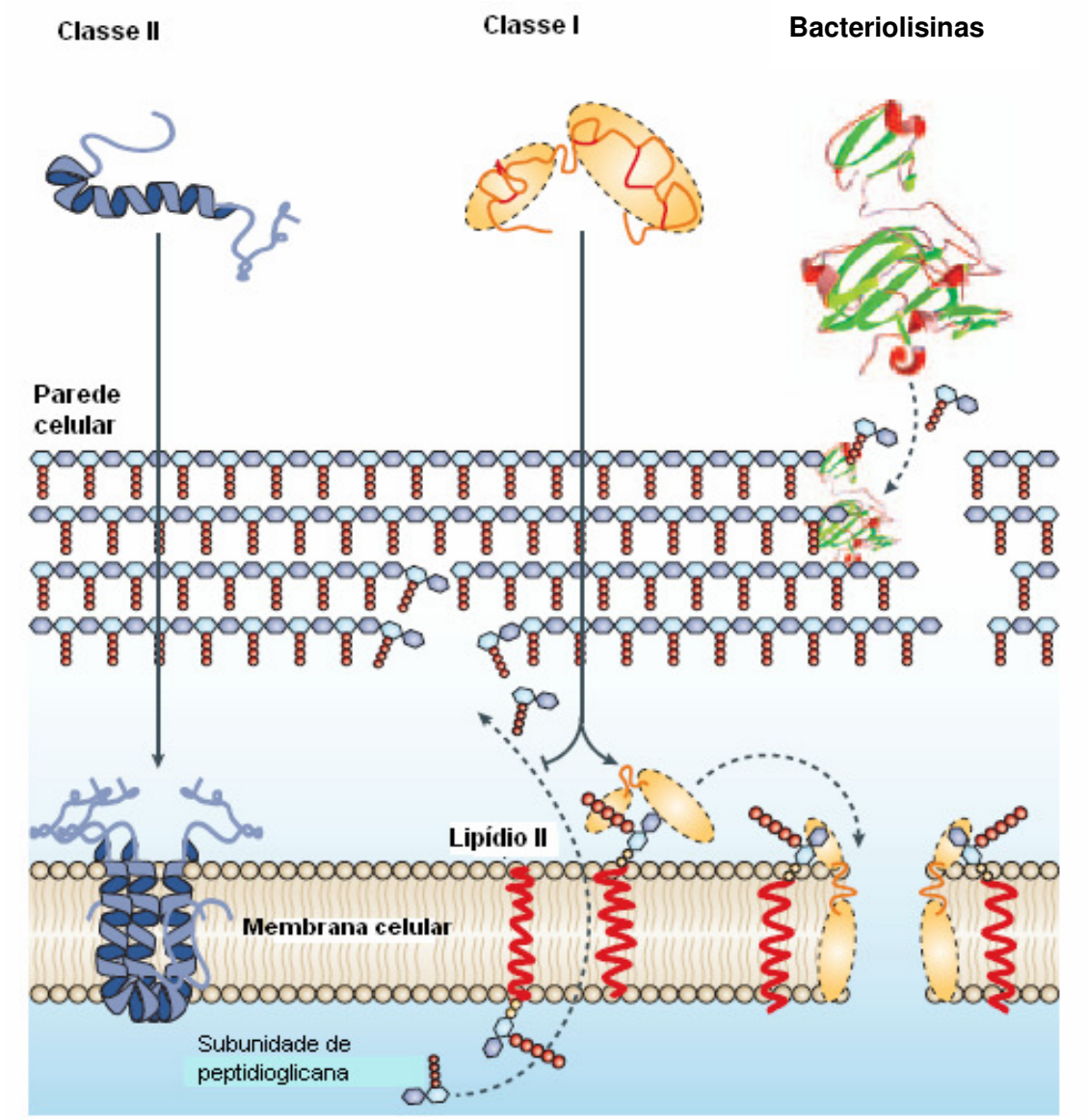

Figura 2: Modo de ação das Bac produzidas por bactérias Gram-positivas. A nisina, uma Bac da classe I, pode ligar-se ao lipídio II e inibir a síntese de parede celular, ou pode utilizá-lo como ligante para iniciar o processo de inserção na membrana celular. Geralmente, os peptídios da classe II possuem uma estrutura helicoidal anfipática que lhes permite se inserirem na membrana celular, proporcionando a sua despolarização. As bacteriolisinas podem atuar diretamente na parede celular de bactérias Gram-positivas, levando-as à lise celular (adaptado de COTTER, HILL & ROSS, 2005).

2.2.2 Bacteriocinas produzidas por *S. aureus*

A primeira descrição da ação de substâncias antimicrobianas (SAM) do tipo Bac entre bactérias Gram-positivas foi realizada em 1885, quando Babes observou a inibição de *Staphylococcus* por outra estirpe de *Staphylococcus* durante o crescimento em meio de cultura sólido (JACK, TAGG & RAY, 1995). O termo estafilococcinas surgiu após a observação de que os estafilococos produziam substâncias que inibiam o crescimento de outros estafilococos e de algumas bactérias Gram-positivas, mas não de bactérias Gram-negativas (FREDERIQ, 1946). Apesar deste fato, não são muito numerosos os trabalhos sobre Bac produzidas por *S. aureus*, porém, algumas dessas Bac têm sido caracterizadas.

Crupper & Iandolo, em 1996, descreveram um agente antimicrobiano denominado Bac 1829, que apresentou uma massa molecular de 6.418 Da e que se mostrou estável frente ao calor, sendo a sua atividade perdida após exposição a 95°C por mais de 15 min. Esta Bac apresentou sensibilidade a enzimas proteolíticas e foram encontrados altos níveis de ácidos aminados hidrofóbicos, revelando o caráter hidrofóbico desta Bac. Ela também possui ação bactericida inibindo bactérias como *Streptococcus suis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* e *Moraxela bovis* (sendo estas duas últimas bactérias Gram-negativas).

Outra Bac produzida por *S. aureus* é a BacR1. Produzida pela estirpe *S. aureus* UT0007, esta Bac apresenta uma massa molecular de 3.338 Da, é resistente à exposição a pH extremo (sendo biologicamente ativa entre pH 3 a 11) e ao aquecimento a 95° por 15 min. É resistente ao NaCl, à uréia e à DNase, mas se mostrou sensível à ação das enzimas proteolíticas tripsina e proteinase K. Possui uma alta proporção de ácidos aminados hidrofóbicos e possui ação bactericida, matando as bactérias sensíveis por um mecanismo dependente de dose (CRUPPER, GIES & IANDOLO, 1997). Seu espectro de ação é amplo, inibindo bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Moraxella* e *Neisseria* (sendo estes dois últimos gêneros pertencentes ao grupo das bactérias Gram-negativas).

Em 1998, Navaratna, Sahl & Tagg estudaram a produção de Bac pela estirpe de *S. aureus* C55. Esta estirpe produz três peptídios distintos sendo estes denominados de C55α, C55β e C55γ. Os peptídios C55α e C55β, quando combinados em concentrações equimolares, atuam sinergicamente contra estirpes de *S. aureus* e *Micrococcus luteus*. Com o seqüenciamento de ácidos aminados da região N-terminal dos três peptídios, verificou-se que as estafilococcinas C55α e C55β são lantibióticos, com o peso molecular de 3.339 e 2.993 Da,

respectivamente. C55γ não parece ser uma lantibiótico e também não promove o aumento da atividade inibitória dos outros peptídios.

Uma vez que a BacR1 e a estafilococcina C55α possuem pesos moleculares quase idênticos (3.338 e 3.339 Da, respectivamente), experimentos de imunidade cruzada (que ocorre quando uma estirpe não é capaz de inibir o crescimento de outra estirpe que também apresente atividade inibitória) foram realizados para se verificar a possibilidade de se tratar do mesmo peptídio, isolado em dois estudos. Estes experimentos mostraram que cada estirpe produtora é imune ao produto da outra. No ano seguinte, em 1999, Navaratna, Sahl & Tagg publicaram a seqüência de ácidos aminados dos peptídios C55α e C55β e da BacR1, quando foi confirmado que a BacR1 e a estafilococcina C55 são a mesma Bac.

2.2.3 Bacteriocinas produzidas por estirpes de *S. aureus* estudadas em nosso laboratório

A produção de Bac por *S. aureus* foi inicialmente relacionada com plasmídios envolvidos com a produção de toxina esfoliativa do tipo B (WARREN *et al.*, 1974). Desde então, alguns outros trabalhos foram publicados, relacionando a produção de Bac de *S. aureus* com a presença de plasmídios (DAJANI & TAUBE, 1974; MASTERSON *et al.*, 1983), mas nenhum relatou detalhes da caracterização genética e molecular desses plasmídios.

Plasmídios bacteriocinogênicos presentes em *S. aureus* foram melhor estudados em nosso laboratório, onde pequenos plasmídios denominados pRJ6, pRJ9, pRJ10 e pRJ11 foram descritos por Giambiagi-deMarval *et al.* (1990). Os plasmídios pRJ9, pRJ10 e pRJ11 constituem um grupo de plasmídios onde as Bac codificadas por eles possuem propriedades químicas semelhantes (como a resistência ao calor e a enzimas proteolíticas), além do fato das estirpes produtoras apresentarem imunidade cruzada.

Em relação ao plasmídio pRJ6, este faz parte de outro grupo, onde a Bac por ele codificada apresentou sensibilidade a enzimas proteolíticas e a estirpe hospedeira A70 não se apresentou imune às Bac produzidas pela família do pRJ9 (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990). Estudos de incompatibilidade realizados, posteriormente, mostraram que os plasmídios pRJ6 e pRJ9 pertencem realmente a grupos de incompatibilidade diferentes. Apesar das diferenças nos mapas físicos de ambas as famílias de plasmídios, existem alguns sítios de restrição conservados entre eles, numa região de homologia de 2,6 kb (ARAÚJO & BASTOS, 1995).

2.2.3.1 Aureocina A70

A estirpe *S. aureus* A70, isolada de leite comercial, produz uma Bac termoestável designada aureocina A70 (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990). A aureocina A70 possui um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, incluindo outras estirpes de *Staphylococcus*, dos gêneros *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e de *Listeria*, incluindo *L. monocytogenes* (OLIVEIRA *et al.*, 1998a). Os genes envolvidos na sua produção e na imunidade a esta Bac estão codificados no plasmídio denominado pRJ6 (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990; ARAÚJO & BASTOS, 1995), que possui 7.904 pb (COELHO, 2007).

Trata-se de uma Bac bastante disseminada entre *Staphylococcus*, já tendo sido detectada em outras estirpes pertencentes ao gênero e que foram isoladas de mastite bovina no Brasil e na Argentina (NASCIMENTO *et al.*, 2002 e 2005), além de estirpes clínicas de *S. aureus* (GAMON, *et al.*, 1999). É formada por quatro peptídios altamente catiônicos e hidrofóbicos, que possuem de 30 a 31 resíduos de ácidos aminados, com massas moleculares variando entre 2.954 Da e 3.086 Da. Através de experimentos de clonagem, verificou-se que estes peptídios são codificados por quatro genes (*aurABCD*) presentes no fragmento *Hin*dIII-A, agrupados sob a forma de um operon (NETZ *et al.*, 2001). Estes peptídios têm elevado conteúdo de pequenos ácidos aminados, como a glicina (23 a 29%) e alanina (13 a 27%), e nenhum resíduo de cisteína foi encontrado. Dentro do fragmento *Hin*dIII-A do plasmídio, existe um gene, *aurT*, que apresenta uma alta similaridade com membros da família dos transportadores ABC. Uma variedade de substratos, como proteínas, peptídios, antibióticos e polissacarídeos, é exportada por tais transportadores.

A purificação e a análise por espectometria de massa destes peptídios revelaram que eles não são processados. A aureocina A70 é a primeira e única Bac composta por quatro componentes descrita na literatura (NETZ *et al.*, 2001). A atividade inibitória de cada peptídio foi avaliada individualmente contra diferentes microrganismos. Quando estirpes de *S. aureus* e de *L. innocua* foram utilizadas como indicadoras, a inibição destas estirpes era somente observada com todos os peptídios juntos. Quando *M. luteus* era utilizado como estirpe indicadora, os peptídios AurA, AurB e AurC inibiam o seu crescimento quando eram empregados individualmente, enquanto que AurD não se mostrou bioativo (BASTOS *et al.*, 2009).

A produção de peptídios hemolíticos que são secretados por estafilococos ocorre de maneira semelhante ao sistema de produção da aureocina A70. Estes são ribossomicamente sintetizados, não sofrem modificação e são secretados sem a presença de uma seqüência-líder.

Entretanto, os peptídios hemolíticos são maiores (43-44 resíduos de ácidos aminados) do que os que constituem a aureocina A70. Nenhuma atividade hemolítica foi observada nas estirpes A70 e A70 Bac$^-$ (curada da produção de Bac) quando crescidas em ágar-sangue de carneiro (NETZ *et al.*, 2001).

2.2.3.2 Aureocina A53

Esta Bac é produzida pela estirpe *S. aureus* A53, também isolada de leite comercial e codificada pelo plasmídio pRJ9 de 10,4 kb (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990). Possui amplo espectro de ação contra bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, estirpes de *L. monocytogenes* e outras estirpes de *S. aureus* associadas à mastite bovina (OLIVEIRA *et al.*, 1998 a e c). Trata-se de uma Bac que foi descrita como um peptídio com 51 resíduos de ácidos aminados, com massa molecular de 6.012,5 Da, rico em triptofano, altamente catiônico e com alta estabilidade em meio extremamente ácido e frente a altas temperaturas (NETZ *et al.*, 2002). Além disso, é resistente à ação de proteases, como a tripsina, e apresenta conformação rígida em meio aquoso. Esta última característica indica uma maior similaridade estrutural com um subgrupo de defensinas (peptídios antimicrobianos produzidos por células eucarióticas), do que com qualquer outro grupo de Bac. É tida como uma Bac atípica em razão destas características distintas daquelas de outras Bac descritas até o momento. O gene estrutural desta Bac é denominado *aucA* e os genes *aucF, aucE* e *aucG* codificam produtos pertencentes à família dos transportadores ABC (NETZ *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2009). Estes transportadores estão envolvidos na formação de bombas bacterianas de efluxo, promovendo o transporte e a secreção de compostos, bem como conferindo à estirpe produtora imunidade contra sua própria Bac (BASTOS *et al.*, *in press*).

A comparação de sua estrutura primária com a de hemolisinas estafilocócicas revelou que não há homologia significativa entre esses peptídios. Além disso, nenhuma atividade hemolítica foi verificada quando a aureocina foi purificada e testada em placas de ágar-sangue de carneiro (NETZ *et al.*, 2002).

Através de experimentos utilizando espectroscopia CD, avaliou-se que 36% da conformação da aureocina A53 estão sob forma hélice α e 18% estão sob a forma β-pregueada (NETZ *et al.*, 2002).

A estirpe *S. aureus* MB50 possui o plasmídio pRJ6, codificador da aureocina A70, e o plasmídio pRJ22, que consiste no plasmídio pRJ9 (codificador da aureocina A53) com a

inserção de um transpóson (Tn*551*) em uma região que não afeta a produção desta Bac (ARAÚJO & BASTOS, 1995). Esta estirpe foi utilizada em experimentos para verificação da atividade sinérgica entre estas duas aureocinas (COELHO *et al*., 2007). A estirpe MB50 exibiu uma maior porcentagem de inibição (91%) contra estirpes de *Streptococcus agalactiae* e de *S. aureus* envolvidas em mastite bovina. Para se confirmar o sinergismo entre ambas Bac, estirpes de *S. aureus* que não foram inibidas pelas Bac sozinhas, mas que foram inibidas pela estirpe MB50, foram empregadas como indicadoras em teste de difusão em ágar. Como esperado, ambas Bac sozinhas não foram capazes de inibir as estirpes de *S. aureus*; entretanto, o sinergismo entre estas Bac foi confirmado pela verificação da ação inibitória das Bac combinadas.

O sumário com as características de ambas as aureocinas A70 e A53 está descrito na tabela 1.

Tabela 1: Sumário das características das aureocinas A70 e A53.

Características	**Aureocina A70**	**Aureocina A53**
Estirpe produtora	*S. aureus* A70	*S. aureus* A53
Origem da estirpe produtora	leite comercial, tipo C	leite comercial, tipo B
Tamanho do plasmídio codificador da Bac	pRJ6 (7,9 kb)	pRJ9 (10,4 kb)
Número de peptídios constituintes	quatro peptídios	um peptídio
Massa molecular da Bac	variando entre 2.954 Da e 3.086 Da	6.012,5 Da
Sensibilidade a enzimas proteolíticas	sensível	resistente
Mobilização do plasmídio	mobilizável	não mobilizável
Classificação	classe IIb	classe IIc

2.2.4 Bacteriocinas produzidas por outras espécies de *Staphylococcus*

Atualmente, a espécie de *Staphylococcus* mais estudada quanto à produção de Bac é *S. epidermidis*. Dentre as Bac produzidas por esta espécie, as principais são a Pep5, a epidermina, a epicidina 280 e a epilancina K7 (BASTOS *et al*., 2009).

A Pep5, produzida pela estirpe *S. epidermidis* 5, é um lantibiótico com massa molecular de 3.448 Da, codificado pelo plasmídio de 20 kb, pED503. Este plasmídio contém o grupamento genético *pepTIAPBC*, com os genes: *pepT*, que codifica o transportador ABC; *pepI*, que codifica a proteína de imunidade à Bac produzida; *pepA*, o gene estrutural da Pep5; *pepP*, que codifica a proteína envolvida no processamento proteolítico e *pepB* e *pepC*, envolvidos nas modificações pós-tradução (SAHL, JACK & BIERBAUM, 1995; BASTOS *et al*., 2009).

A epicidina 280 é um lantibiótico com 30 ácidos aminados, produzido pela estirpe *S. epidermidis* BN280. O operon *eciIAPBC*, responsável pela biossíntese dessa Bac, está localizado no plasmídio pCH01. A análise de similaridade entre as seqüências de ácidos aminados da epicidina 280 e da Pep5 revelou 75% de homologia entre elas. Adicionalmente, testes de imunidade cruzada entre as estirpes produtoras das Bac revelou que os peptídios de imunidade são funcionalmente relacionados (HEIDRICH *et al*., 1998).

A epidermina, outro lantibiótico produzido pela estirpe *S. epidermidis* Tü3298, tem 2.164 Da de massa molecular. Os genes envolvidos na produção desta Bac estão organizados em cinco unidades transcricionais presentes no plasmídio pTü3298, de 54 kb. No operon *epiABCD*, estão os genes: *epiA*, gene estrutural da epidermina; *epiB*, envolvido na desidratação de ácidos aminados; *epiC*, codificador da proteína responsável pela formação das ligações tioéteres, e *epiD*, que catalisa a descarboxilação oxidativa da cisteína carboxi-terminal do pré-peptídio. A segunda unidade de transcrição é composta por um único gene, *epiT*, tendo este homologia com transportadores ABC; porém, por apresentar duas deleções no seu quadro de leitura, não codifica uma proteína ativa. O gene *epiH* forma uma unidade transcricional distinta e está envolvido na imunidade à Bac. Os genes *epiF -E* e *–G* estão organizados em uma estrutura tipo operon e parecem estar envolvidos no transporte da Bac e na imunidade da célula produtora. A última unidade de transcrição contém o gene *epiQ*, envolvido na ativação da transcrição dos demais operons, e o gene *epiP*, que codifica a proteína EpiP responsável pelo processamento proteolítico importante para a maturação da epidermina (SAHL & BIERBAUM, 1998; BASTOS *et al*., 2009).

A epilancina K7 é produzida pela estirpe *S. epidermidis* K7. Esta Bac também é um lantibiótico, composto por 31 ácidos aminados, com massa molecular de aproximadamente 3

kDa. Diferentemente das outras Bac citadas acima, esta é codificada pelo cromossomo bacteriano. O gene estrutural *elkA* codifica um pré-peptídio de 55 ácidos aminados, contendo na região amino-terminal o peptídio-líder e, na região carboxi-terminal, o peptídio de 31 ácidos aminados, que sofrerá modificações pós-tradução e originará a epilancina K7 (VAN DE KAMP *et al.*, 1995 b).

A nukacina ISK-1, produzida pela estirpe *S. warneri* ISK-1, é um lantibiótico que possui massa molecular de 2,96 kDa. Os genes responsáveis pela sua produção estão presentes no plasmídio pPI-1. São no mínimo oito genes responsáveis pela produção desta Bac: *nukA*, o gene estrutural; *nukM*, codificador da enzima responsável pelas modificações pós-tradução; *nukT*, que codifica o transportador ABC envolvido no processamento e na secreção da Bac, e os genes *nukFEG*, que codificam o transportador ABC envolvido na imunidade da célula produtora à Bac. O gene *nukH,* quando expresso juntamente com os genes *nukFEG*, resulta em um aumento da imunidade e, quando expresso sozinho, confere imunidade parcial à nukacina ISK-1. Além desses genes, a *orf1* parece estar relacionada com funções de regulação da produção da nukacina (ASO *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2009).

A tabela 2 apresenta o sumário com as características das Bac produzidas por estirpes de SCN descritas acima.

Tabela 2: Sumário das características de Bac produzidas por SCN

Bacteriocina	**Número de ácidos aminados**	**Massa molecular**	**Elemento genético codificador**	**Referência**
Pep5	34	3.448 Da	pED503	SAHL, JACK & BIERBAUM (1995)
Epicidina 280	30	3.133 Da	pCH01	HEIDRICH *et al.* (1998)
Epidermina	22	2.164.6 Da	pTü3298	PESCHEL *et al.* (1997)
Epilancina K7	31	3.032 Da	cromossomo	VAN DE KAMP *et al.* (1995 a)
Nukacina ISK-1	30	2.960 Da	pPI-1	ASO *et al.* (2005)

2.3 Aplicações biotecnológicas das Bac

2.3.1 Aplicação clínica e veterinária

Com o aumento da resistência a antibióticos, houve a necessidade de se buscar uma nova e eficaz forma de prevenção e de tratamento das infecções bacterianas. A utilização de uma estirpe de *S. aureus* avirulenta no tratamento de furunculose se mostrou satisfatória. Além deste fato, estudos vêm cada vez mais avaliando a interferência de estirpes bacterianas (de baixa virulência) e produtoras de Bac, tanto na colonização quanto na infecção por espécies patogênicas (JACK, TAGG & RAY, 1995).

A nisina é uma substância que não apresenta toxicidade para humanos (BREUKINK & KRUIJFF, 1994; REDDY *et al.*, 2004) e pode ser utilizada no combate da úlcera péptica causada por *Helycobacter pylori*. Pode ainda ser aplicada no tratamento de diferentes infecções, como as causadas por *Streptococcus pneumoniae* multirresistentes a drogas (DIEP & NES, 2002).

Outros meios de utilização da nisina de maneira inovadora vêm sendo avaliados *in vitro* e *in vivo*. Estudos realizados em coelhos, com o objetivo de se desenvolver produtos femininos que possam atuar de maneira eficaz, tanto como biocidas, quanto como contraceptivos vaginais, vêm apresentando resultados promissores. A utilização de 400 µg/ml desta Bac foram suficientes para agir como espermicida (*in vitro*), sendo que o seu efeito foi relatado como dose e tempo dependentes. Por outro lado, de acordo com os resultados encontrados *in vivo*, 1 mg de nisina aplicada intravaginalmente em coelhas impediu a fertilização das mesmas, sem causar inflamação ou danos ao epitélio vaginal (REDDY *et al.*, 2004).

No campo da veterinária, a nisina pode ser utilizada no controle da mastite bovina causada por *S. aureus* (BARKEMA, SCHUKKEN & ZADOKS, 2006). A mastite bovina é causa de perdas econômicas significantes, afetando não só a produção do leite, mas também levando à degradação da qualidade do leite, além de despesas com o tratamento desta doença (NASCIMENTO *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2007). Desta forma, a nisina é comercializada como agente ativo do Wipe-out® (lenços contendo nisina) que promove a limpeza das tetas, prevenindo a mastite bovina (COTTER, HILL & ROSS, 2005). A figura 3 mostra a embalagem deste produto comercializado.

Figura 3: Wipe-out® - lenços comercializados que contêm a Bac nisina, sendo usados na higienização das tetas de vacas.

A aureocina A53 também possui potencial de aplicação no tratamento da mastite bovina causada por estirpes de *S. aureus*, uma vez que esta Bac foi capaz de inibir algumas estirpes de *S. aureus* (82%) e de *Streptococcus agalactiae* (68%) envolvidas em casos de mastite bovina testadas em nosso laboratório (OLIVEIRA *et al.*, 1998c; COELHO *et al.,* 2007).

Outra Bac com potencial de aplicação no campo da veterinária é a BacR1 produzida pela estirpe de *S. aureus* UT0007, que pode atuar como agente terapêutico no tratamento da ceratoconjuntivite que acomete o gado bovino e que é causada por *Moraxella bovis* (CRUPPER, GIES & IANDOLO, 1997).

2.3.2 Aplicação como biopreservativos de alimentos

Com a crescente oposição, por parte de consumidores, aos aditivos químicos, como nitratos, EDTA, entre outros, no combate ao crescimento de contaminantes em alimentos e bebidas, há uma crescente demanda pela utilização de formas alternativas de tratamentos com ação antimicrobiana. O emprego de Bac para fins de preservação de alimentos vem cada vez mais atraindo a atenção de cientistas, uma vez que estas substâncias são reconhecidas como compostos “naturais” capazes de influenciar na qualidade e na segurança de alimentos (SETTANI & CORSETTI, 2008).

O termo biopreservação refere-se à extensão da vida de prateleira do alimento, assim como a utilização segura de microrganismos e seus metabólitos. A utilização empírica de microrganismos e/ou de seus produtos naturais na preservação de alimentos vem sendo uma prática comum através da história da humanidade (ROSS, MORGAN & HILL, 2002). O

isolamento de microrganismos patogênicos em alimentos que foram minimamente processados, embalados e refrigerados, e a habilidade desses microrganismos de crescerem durante o armazenamento do alimento têm sido bastante descritos. A procura de desenvolvimento de novas tecnologias que possam ser empregadas na redução do crescimento microbiano tem estimulado muito os estudos sobre a aplicabilidade das Bac como biopreservativos de alimentos. As Bac podem ser aplicadas em alimentos de duas formas (STILES, 1996; GÁLVEZ *et al.*, 2007):

1) adicionadas aos alimentos como biopreservativos (em sua forma purificada ou semipurificada, como aditivos antimicrobianos que proporcionem um aumento na vida de prateleira do alimento) e
2) produzidas *in situ* através da utilização de culturas iniciadoras produtoras de Bac.

Quando comparamos os dados de ação de Bac em meios de cultura em relação aos obtidos em sistemas onde a produção está associada a algum tipo de alimento, é esperada uma eficácia muito menor no alimento, sendo muitas vezes necessário que a concentração de Bac adicionada aos alimentos seja muito maior. Este fato pode ser evidenciado pela ação da nisina, que deve estar em uma concentração muito maior para inibir esporos de *C. botulinum* em carne, do que em meio de cultura (MILLETTE *et al.*, 2007). De acordo com ROSE *et al.* (2008), a nisina poderia ser inativada pela presença de pequenas quantidades de glutationa, um composto de tiol, de pequena massa molecular, presente em carnes frescas.

Muitos fatores podem influenciar a eficácia das Bac quando utilizadas em alimentos. Estes fatores estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Fatores limitantes da eficácia das Bac (adaptado de GÁLVEZ *et al.*, 2007)

Fatores relacionados ao tipo de alimento
Condições de processamento do alimento
Temperatura de armazenamento
pH do alimento (instabilidade da Bac a mudanças de pH)
Inativação por enzimas do alimento
Interação com aditivos/ingredientes dos alimentos
Adsorção da Bac aos componentes do alimento
Baixa solubilidade e sua distribuição na matriz do alimento
Estabilidade limitada durante o processo de vida de prateleira
Fatores relacionados à microbiota do alimento
Carga microbiana
Diversidade microbiana
Sensibilidade à Bac
Interações microbianas com o sistema
Fatores relacionados com a bactéria-alvo
Carga microbiana
Sensibilidade à Bac (Gram, gênero, espécie e estirpe)
Estado fisiológico (fase do crescimento, células estressadas e formação de endósporos)
Desenvolvimento de resistência/adaptação

A aplicação das Bac na preservação de alimentos pode oferecer muitos benefícios, fato este que vem sendo relatado em muitos estudos (THOMAS, CLARKSON & DELVES-BROUGHTON, 2000). Alguns destes benefícios são:

- promoção do aumento da vida de prateleira de alimentos;
- extra proteção durante condições de abuso de temperatura;
- diminuição do risco de transmissão de patógenos durante o processamento de alimentos;
- redução da aplicação de aditivos químicos e
- aplicação de tratamentos térmicos menos severos, sem comprometer a qualidade do alimento (melhor preservação de nutrientes e vitaminas, assim como das propriedades organolépticas).

Como exemplo da aplicação das Bac, temos a nisina e a pediocina PA-1, que são Bac aprovadas para aplicação como biopreservativos em alimentos, sendo a nisina comercializada em mais de 50 países, inclusive no Brasil, após ter sido classificada como GRAS ("generally recognized as safe") pelo FDA ("Food and Drug Administration"). A nisina é formada por 34 resíduos de ácidos aminados, sua massa molecular é de 3,5 kDa e ela possui uma estrutura pentacíclica com um resíduo de lantionina e quatro de β-meti-lantionina (ROSS, MORGAN & HILL, 2002) [vide figura 1]. Esta Bac apresenta um amplo espectro de ação, exibindo atividade inibitória contra várias bactérias Gram-negativas (quando em combinação com agentes quelantes) e Gram-positivas, entre elas, *Clostridium* sp., *Listeria* sp., *Bacillus* sp. e a maioria das BAL (DE VOS *et al.*, 1993), e é utilizada especialmente em laticínios, bebidas fermentadas, verduras, molhos de saladas e até em cervejas (KLAENHAMMER, 1988; JACK, TAGG & RAY, 1995; STILES, 1996; SAHL & BIERBAUM, 1998; CLEVELAND *et al.*, 2001; HAKOVIRTA, REUNANEN & SARIS, 2006). O modo geral de ação da nisina está mostrado na figura 4.

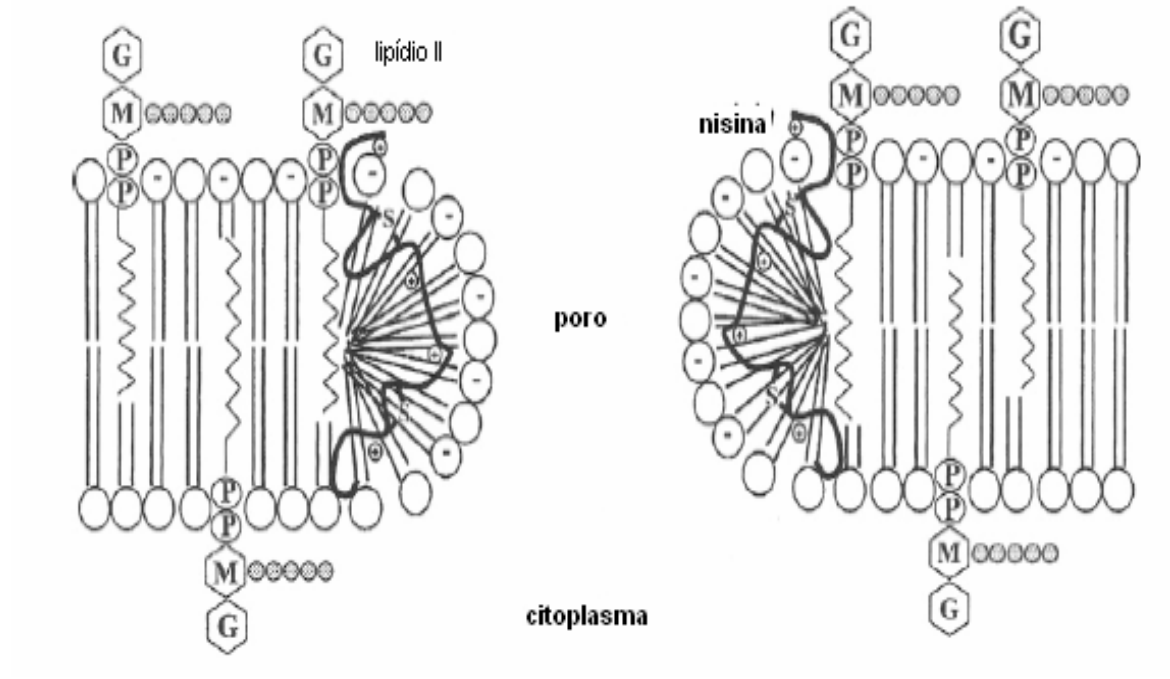

Figura 4: Modo geral de ação da nisina onde o lipídio II serve como molécula de ancoragem, facilitando a formação de poros na membrana citoplasmática pela ligação à nisina e permitindo a conformação correta do peptídio para abertura do poro (adaptado de SOBRINO-LÓPEZ & MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado a existência de outras Bac com potencial de aplicação na preservação de alimentos. Um outro exemplo é a pediocina A, que possui atividade contra *C. botulinum*, e a pediocina PA-1/AcH, ativa contra o gênero *Listeria* em laticínios e carnes em geral (STILES, 1996; CLEVELAND *et al.*, 2001). Esta última Bac não se mostrou imunogênica quando injetada em camundongos e coelhos (CLEVELAND *et al.*, 2001).

A lacticina 3147 é uma Bac estável frente a tratamentos térmicos, ativa em diferentes pHs, além de possuir um amplo espectro de ação. É capaz de inibir a estirpe de *L. monocytogenes* Scott A em queijo "cottage", mostrando uma redução de 99,9% no número deste patógeno associado a alimentos, após cindo dias à temperatura de 4°C (McAULIFFE, HILL & ROSS, 1999; GUINANE *et al.*, 2005). Em razão da sua degradação através da ação da quimiotripsina α, verificada por Gardiner *et al.* (2007), esta Bac se torna um meio seguro quando se tem como objetivo a sua aplicação em alimentos. A sua viabilidade industrial através

da sua utilização sob a forma de pó vem sendo avaliada no emprego como biopreservativo, com isso, sendo aplicada como um ingrediente de alimentos (SOBRINO-LÓPEZ & MARTÍN-BELLOSO, 2008). Morgan *et al*. (2001) verificaram que 10% da lacticina 3147 sob a forma de pó foram extremamente eficientes na inibição de *Listeria* em iogurtes e queijo "cottage". Com apenas 60 minutos depois de adicionada, nenhuma célula viável de *Listeria* foi encontrada no iogurte e, no caso do queijo "cottage", houve uma diminuição de 85% no número de células viáveis após 120 minutos. Estes mesmos autores também verificaram que o pó concentrado desta Bac perdia 75% da sua atividade após cinco meses à temperatura ambiente, enquanto que ela permanecia estável quando sob refrigeração a 4°C.

2.4 Embalagens bioativas

Recentemente, a busca pelo desenvolvimento de embalagens ativas vem se intensificando e despertando cada vez mais o interesse das indústrias com relação à preservação de alimentos. Embalagem ativa é definida como um sistema inteligente que envolve as interações entre a embalagem ou seus componentes e o alimento ou sua atmosfera interna e que cumpra com as demandas de produtos com segurança e alta qualidade e vem sendo introduzida em resposta às contínuas modificações do mercado consumidor (QUINTAVALLA & VICINI, 2002; MAURIELLO *et al*., 2004).

A embalagem antimicrobiana é um tipo de embalagem ativa que atua reduzindo, inibindo ou retardando o crescimento de microrganismos que possam contaminar o alimento embalado (APPENDINI & HOTCHKISS, 2002; SANTIAGO-SILVA *et al*., 2008).

De acordo com COOKSEY (2001), existem três categorias básicas de filmes antimicrobianos para embalagens. São elas:

1) incorporação das substâncias antimicrobianas em sachês conectados à embalagem, dos quais a substância bioativa é liberada durante o armazenamento;
2) incorporação direta do agente antimicrobiano ao filme e
3) incorporação do agente antimicrobiano ao revestimento da embalagem que atua como sua carreadora.

Preparações de Bac podem ainda ser aplicadas em alimentos através de sistemas de imobilização, com a sua utilização parcialmente purificada ou concentrada a partir do meio de

cultura e ligada a um carreador. Este, por sua vez, atua como um reservatório e um difusor das moléculas de Bac concentradas no alimento. Vários métodos para imobilização de Bac e incorporação em filmes de diferentes materiais, assim como alginato, gelatina, celulose, proteína de soja e polietileno, têm sido propostos (SIRAGUSA, CUTTER & WILLETT, 1999; SCANNELL *et al*., 2000a; MAURIELLO *et al*., 2004; GÁLVEZ *et al*., 2007; MILLETTE *et al*., 2007). A figura 5 ilustra diferentes modos de incorporação de aditivos em alimentos.

Siragusa, Cutter & Willett (1999) mostraram a eficiência da nisina ao imobilizá-la em gel de alginato de sódio, permitindo a sua liberação de maneira controlada na superfície de carne, resultando em uma redução de três log UFC/cm^2 no nível de *Brochotrix thermosphacta*, quando comparada com a sua impregnação direta sobre a superfície da carne. A formação de uma matriz de alginato modificado através da reação deste com o ácido palmítico proporcionou uma proteção da nisina contra agentes deletérios da carne.

A ligação dos grupamentos aldeídicos do alginato ativo com os grupamentos amina da nisina levou à formação das bases de Schiff, preservando a integridade desta Bac e fazendo com esta fosse liberada de maneira eficaz do filme de alginato, promovendo, assim, o controle do crescimento de *S. aureus* em pedaços de carne durante o armazenamento a 4°C (MILLETE *et al*., 2007).

Com o objetivo de se controlar o crescimento de *L. monocytogenes* durante o armazenamento de presunto cozido fatiado, Marcos *et al*. (2007) verificam que as embalagens de filmes formados por alginato contendo enterocinas, Bac produzidas por *Enterococcus faecium* CTC492, mostraram ser uma forma eficaz no controle deste patógeno durante oito dias de armazenamento a 6°C. Neste mesmo trabalho, foi verificado também que o mesmo filme de alginato contendo 2.000 UA/cm^2 das enterocinas promoveu a extensão da fase lag de crescimento do patógeno quando este mesmo alimento foi armazenado por 30 dias em embalagem a vácuo.

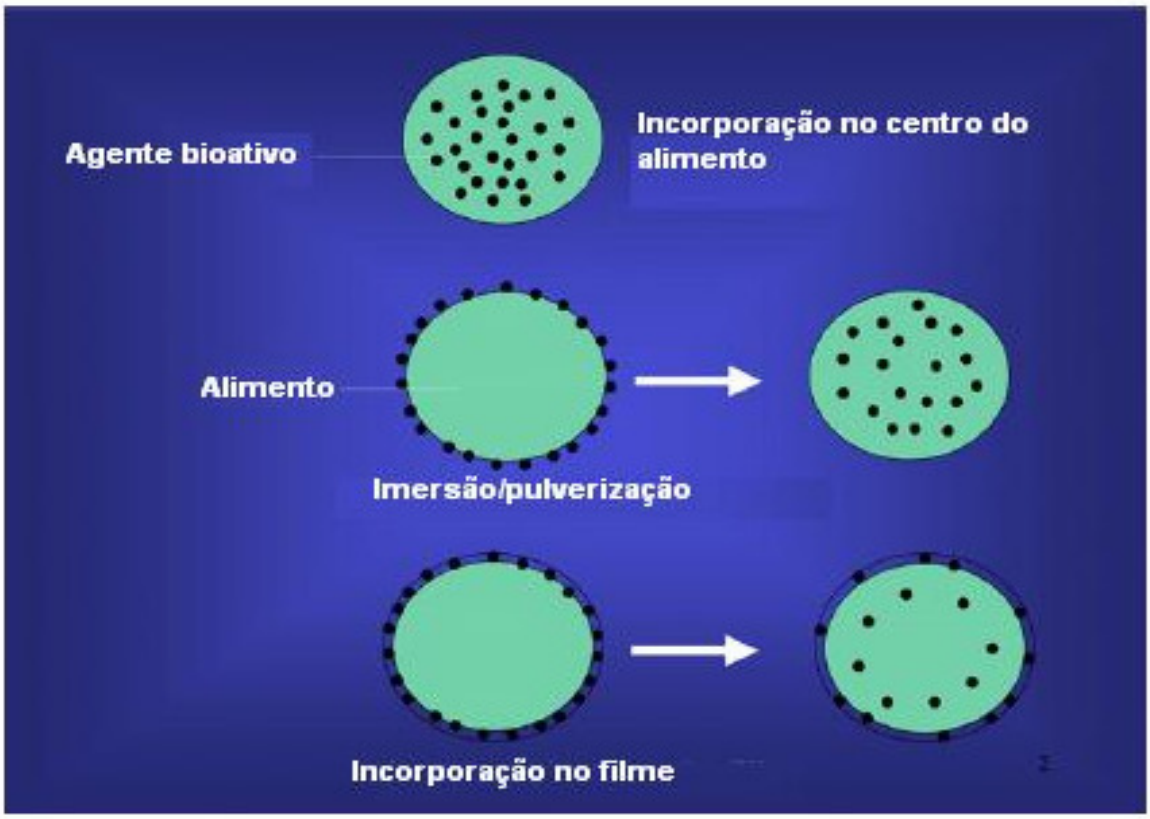

Figura 5: Diferentes modos de incorporação de aditivos em alimentos (incorporação no alimento propriamente dito, imersão do alimento em uma solução contendo o aditivo ou a pulverização deste e, finalmente, a sua incorporação em um filme). Os pontos pretos correspondem ao composto antimicrobiano (adaptado de COMA *et al*., 2008).

A utilização de alta pressão é uma outra estratégia de preservação de alimentos que já vem sendo aplicada em países como os EUA e Espanha. Marcos *et al*. (2008) avaliaram três estratégias no controle de *L. monocytogenes*: aplicação de alta pressão, uso de uma embalagem antimicrobiana (enterocina) e emprego da combinação da alta pressão e da embalagem antimicrobiana. Verificaram também a eficiência destas duas tecnologias (alta pressão juntamente com a embalagem antimicrobiana) promovendo um abuso de temperatura (24 h à temperatura ambiente), após dois meses de armazenamento de presunto cozido a 6°C. A embalagem antimicrobiana sozinha promoveu, mais uma vez, a extensão da fase lag de crescimento deste microrganismo e o uso combinado com alta pressão também se mostrou bastante satisfatório, onde as contagens de células foram 6,8-7,3 log de UFC/g menores do

que as observadas nas outras estratégias. Quanto ao abuso de temperatura, o emprego de ambas as estratégias (alta pressão juntamente com embalagem antimicrobiana) proporcionou uma maior proteção do alimento, que foi evidenciada por um menor aumento na contagem de células após o abuso de temperatura.

O efeito do sinergismo entre agentes antimicrobianos já vem sendo descrito. A compreensão do modo de ação de cada agente permite uma maior eficácia da combinação dos tratamentos (CLEVELAND *et al.*, 2001). Um aumento da atividade antimicrobiana pode ser alcançado pela combinação de Bac ou de outros tipos de proteínas ou peptídios.

Nisina e lisozima atuam sinergicamente contra bactérias Gram-positivas, incluindo lactobacilos e *S. aureus* (CHUNG & HANCOCK, 2000), sendo que o espectro de ação se estende às bactérias Gram-negativas através da adição de agentes quelantes (GILL & HOLLEY, 2000). A utilização de agentes antimicrobianos como estes descritos acima e o EDTA, aprisionados em filmes de alginato de sódio e κ-carragena, contra patógenos associados a alimentos, como *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonela enteritidis*, foi verificada por Cha *et al.* (2002). Os filmes feitos a partir de alginato de sódio produziram maiores zonas de inibição do que os filmes a base de κ-carragena, apesar da utilização da mesma quantidade de antimicrobianos presentes em cada filme, demonstrando uma migração mais rápida dos agentes antimicrobianos nos filmes de alginato, resultante da maior capacidade deste tipo de filme de absorver água.

2.5 Produção heteróloga de Bac

Os sistemas de expressão heteróloga de Bac podem oferecer muitas vantagens quando comparados com os sistemas nativos, como facilitar o controle da expressão do gene codificador da Bac ou aumentar o nível de produção. Além disso, a produção heteróloga de Bac por BAL oferece também um método para superar algumas situações adversas que possam afetar a eficácia de algumas Bac em alimentos (PAPAGIANNI, 2003). O emprego de sistemas de expressão heteróloga é realizado por três razões distintas:

1) para elucidar a função de proteínas e peptídios recombinantes;
2) para facilitar o controle da transcrição/tradução de genes recombinantes e
3) para alcançar níveis de produção maiores do que os alcançados nos sistemas nativos.

Alguns fatores, tais como: pequeno espectro de atividade, perda espontânea da função da Bac, pouca adaptação do hospedeiro em alimentos e/ou a emergência de bactérias resistentes à Bac, podem limitar a produção ou a ação de Bac alterando a sua eficácia em alimentos (SCHILLINGER, GEISEN & HOLZAPFEL, 1996).

A construção de estirpes bacteriocinogênicas ou a aquisição de propriedades antimicrobianas por estirpes industriais são objetivos que podem ser alcançados pelos sistemas de expressão heteróloga de genes. Vários exemplos vêm sendo descritos na literatura. *Escherichia coli* é a espécie bacteriana mais utilizada para a clonagem e a expressão heteróloga de genes devido a sua extensiva caracterização genética, porém, esta bactéria ainda possui status de patógeno clínico e de alimentos (VAN REENEN, *et al*., 2003; DRIDER *et al*., 2006). A utilização alternativa de estirpes de BAL, de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Pichia pastoris*, como hospedeiros heterólogos, representa uma oportunidade real para futuras aplicações na indústria (DRIDER *et al*., 2006).

Van Reenen *et al*. (2003) realizaram a clonagem do DNA plasmidial codificador da plantaricina 423, produzida pela estirpe de *Lactobacillus plantarum* 423, em um vetor bifuncional e a sua produção foi verificada após a inserção desse vetor, contendo o gene codificador da plantaricina 423, em células da estirpe *Saccharomyces cerevisiae* L5366h. As células transformantes de *S. cerevisiae* L5366h [YEpPla423], obtidas a partir deste experimento, após três dias de incubação em placas contendo a indicadora *L. monocytogenes*, proporcionaram a produção de zonas de inibição contra este patógeno. Este foi o primeiro relato da expressão de uma Bac de classe II e produzida por *L. plantarum* através de células de *S. cerevisiae*, o que representa uma oportunidade de utilização dessa Bac no controle biológico de microrganismos formadores de esporos durante a fermentação alcoólica do vinho. Estes autores também relataram que Bac empregadas na produção de vinho podem reduzir o uso de dióxido sulfuroso nessas bebidas e que aquelas que possuem ação inibitória contra *Oenococcus oeni* podem participar, significativamente, no controle da fermentação maloláctica neste tipo de bebida.

Outro tipo de microrganismo que pode ser utilizado para a expressão de genes codificadores de produção de Bac é a levedura *Pichia pastoris,* que, como hospedeiro heterólogo, proporcionou a produção de grandes quantidades de Bac da classe IIa, como a enterocina P e a pediocina PA1/AcH (DRIDER *et al*., 2006). A tabela 4 mostra algumas Bac que foram produzidas através do emprego da técnica de expressão heteróloga.

Tabela 4: Bacteriocinas produzidas utilizando-se a técnica de expressão heteróloga (adaptado de PAPAGIANNI, 2003).

Bacteriocina	Organismo hospedeiro	Hospedeiro heterólogo	Vetor	Referência
Acidocina A	*Lactobacillus acidophilus* TK9201	*Lactobacillus casei* TK9008	pESX72	KANATANI,OSHIMURA & SANO (1995)
Colicina V	*E. coli*	*L. lactis* IL1403 (pMB500)	pLEC2	VAN BELKUM, WOROBO & STILES (1997)
Lacticina 3147	*L. lactis* DPC3147	*E. faecalis* FA2-2	pOM02	RYAN *et al.* (1999)
Lactocina S	*Lactobacillus sakei* L45	*L. plantarum* NC8	pELS163	SKAUGEN, CHRISTIE & NES (2002)
Mesentericina Y105	*Leuconostoc mesenteroides* Y105	*Lactobacillus cremoris* LC	pFBYC04	BIET *et al.* (1998)
Pediocina PA-1	*P. acidilactici* PAC1.0	*E. coli* V850	pSRQ11.1	MARUGG *et al.* (1992)
	P. acidilactici PAC1.0	*L. lactis* MM210	pMC117	BUYONG, KOK & LUCHANSKY (1998)
	P. acidilactici 347	*L. lactis* IL1403	pJM04	MARTINEZ *et al.* (2000)

2.6 Agentes utilizados na formação de matriz de filmes

Os agentes formadores de matriz de filmes que são amplamente utilizados pela indústria são os carboidratos (amido e maltodextrina), proteínas (gelatina, caseína e soro de leite), derivados de celulose (carboximetilcelulose), gomas (arábica, guar e alginato) e lipídios (ceras, parafinas e ácidos graxos), ou até mesmo suas combinações (DAVANÇO, TANADA-PALMU & GROSSO, 2007). O emprego de polímeros biodegradáveis na indústria vem sendo muito estudado, em razão da necessidade cada vez maior da substituição de embalagens sintéticas convencionais, que causam grande impacto ao meio ambiente (LIMA *et al.*, 2007). Além deste aspecto, o desenvolvimento de embalagens de alimentos utilizando filmes poliméricos com

agentes antimicrobianos incorporados, que possam atuar como uma barreira para a contaminação destes alimentos e com isso promover a extensão da vida de prateleira do alimento, vem sendo alvo de inúmeros estudos (CHA *et al.*, 2002; MAURIELLO *et al.*, 2004; SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2008).

Fatores como custo, disponibilidade de biopolímeros, assim como as propriedades funcionais desejadas para os filmes, devem ser levados em consideração quando se pensa em uma possível aplicação industrial. Propriedades como resistência e flexibilidade, cor e opacidade, permeabilidade ao vapor de água, oxigênio e dióxido de carbono e solubilidade em água fazem parte das propriedades funcionais que devem ser avaliadas. Estas irão variar de acordo com o biopolímero a ser utilizado (peso molecular, conformação e polaridade), das condições de fabricação (concentração, pH, tipo e teor de aditivos), além das condições ambientais (temperatura e umidade), sendo importantes em razão da natureza higroscópica dos biopolímeros. A espessura também é um parâmetro que influencia as propriedades funcionais dos filmes, uma vez que a permeabilidade ao vapor de água é diminuída com o aumento da espessura (SOBRAL, 2000).

2.6.1 Alginato

O alginato de sódio é um polissacarídeo originário da parede celular de algas marinhas pardas da classe Phaeophyceae e das espécies *Fucus serratus*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata*, *Laminaria cloustonii*, *Ecklonia máxima* e *Macrocystis pyrifera.* A figura 6 mostra uma das espécies de algas pardas, que pode ser utilizada para fabricação de alginato.

O ácido algínico é um polímero linear, formado por resíduos de ácidos α-L-gulurônico (G) e β-D-manurônico (M), unidos por ligações β 1→ 4, de composição homopolimérica G-G ou M-M, ou por blocos com seqüências alternadas de M-G (DONG, WANG & DU, 2006). O peso molecular dos alginatos comerciais costuma oscilar entre 32.000 a 200.000 Da. A estrutura química dos ácidos formadores do ácido algínico está apresentada na figura 7.

Figura 6: Alga *Macrocystis pyrifera*, uma das espécies de algas pardas de onde o alginato é originado. Foto retirada do site (http://www.algaebase.org).

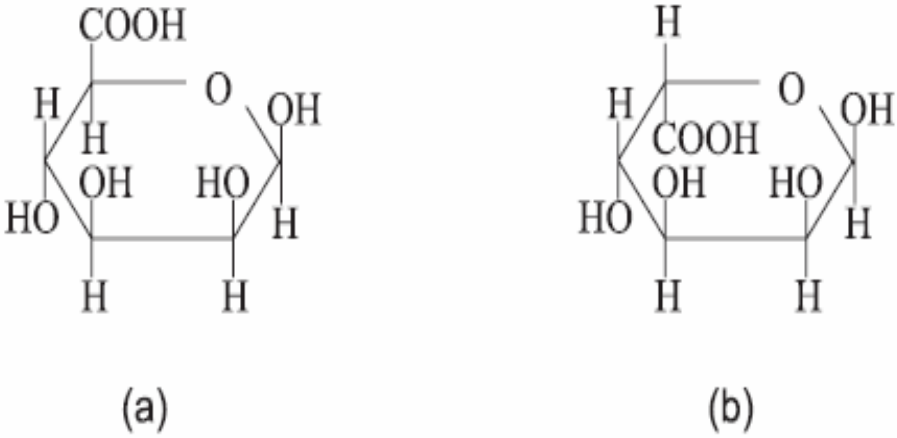

Figura 7: Estrutura química dos ácidos que formam o ácido algínico. (a) ácido manurônico e (b) ácido gulurônico (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006).

A sua habilidade de reagir com cátions polivalentes, especialmente íons cálcio, é a propriedade mais útil dos alginatos, promovendo, assim, a formação de géis fortes ou polímeros insolúveis que tenham aplicação na indústria de alimentos. Já na indústria farmacêutica, este filme permite a liberação controlada de drogas incorporadas às matrizes (DONG, WANG & DU, 2006). De uma maneira geral, os íons cálcio promovem a formação de complexos com quatro resíduos de unidades de ácido gulurônico, criando uma estrutura conhecida como "egg box", como pode ser observado na figura 8 (RHIM, 2004; DONG, WANG & DU, 2006).

A quantidade relativa de cada tipo de cadeia varia entre os diferentes alginatos. Existem distintas diferenças estruturais entre os tipos de cadeias. Os blocos $(MG)_n$ formam cadeias mais flexíveis e são mais solúveis em baixos valores de pH. Já os blocos $(G)_n$ formam cadeias rígidas em que duas cadeias G com mais de seis resíduos cada podem ser ligadas por íons bivalentes, levando à formação de gel. Em baixos valores de pH, alginatos de alta massa molecular protonados podem formam géis ácidos fracos. Os géis com grande quantidade de $(G)_n$ exibem alta porosidade, baixo encolhimento durante a formação do gel e menor inchamento após a secagem. Quanto maior a quantidade de $(M)_n$, mais macios os géis se tornam e os seus poros se apresentam de menor tamanho (KAWAGUTI & SATO, 2008).

O grande interesse no emprego do alginato, tanto na indústria de alimentos quanto na indústria farmacêutica, se deve às suas propriedades coloidais como espessante, formador de filmes, gelificante e estabilizante de emulsões. Com isso, produtos à base de carne, sorvetes e bebidas já utilizam o alginato em suas fórmulas. A figura 9 mostra um produto comercializado que possui alginato em sua composição e é utilizado como curativo de feridas na pele.

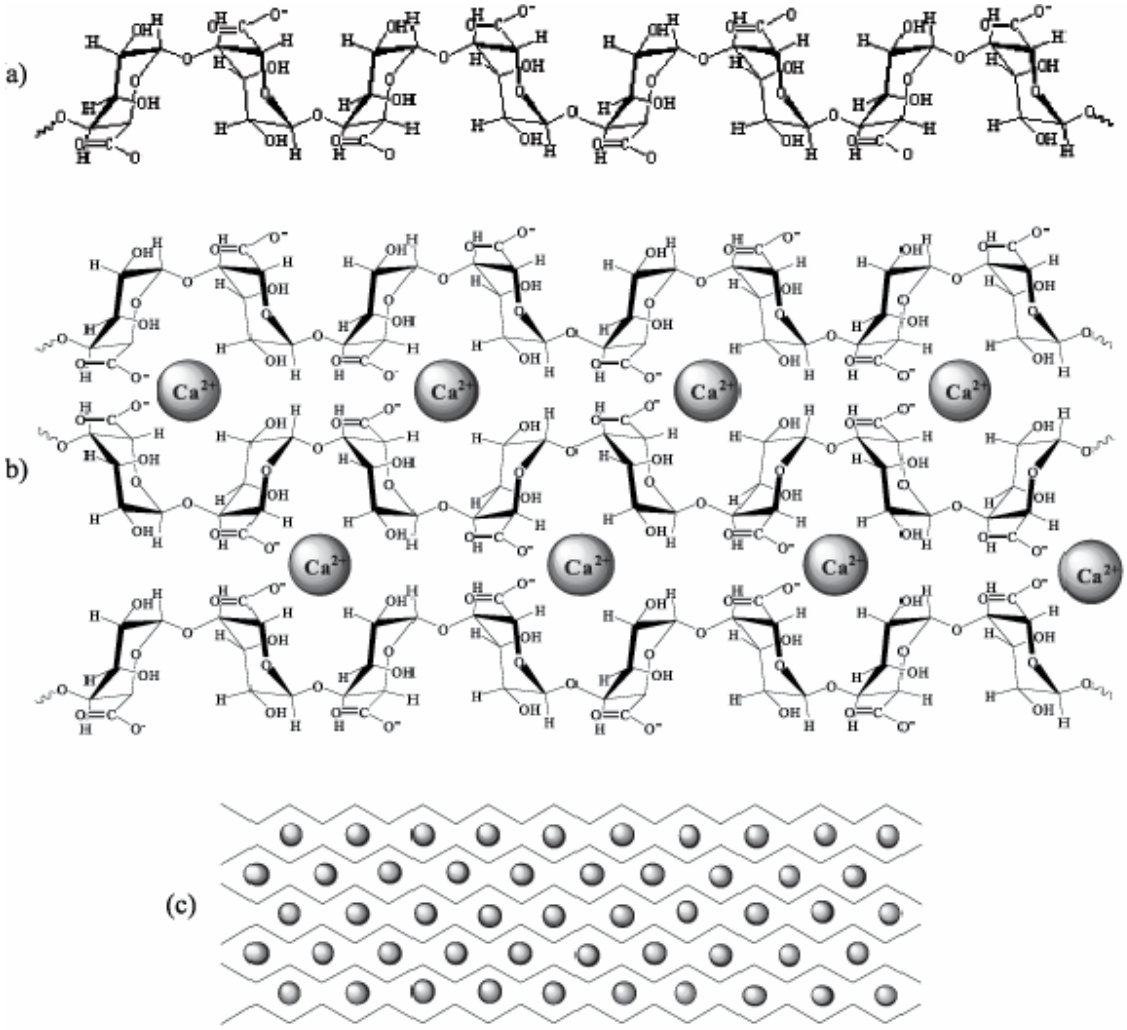

Figura 8: Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de ácido gulurônico; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) formação da rede de gel (adaptado de KAWAGUTI & SATO, 2008).

Figura 9: Fibracol Plus® da Johnson & Johnson, produto que utiliza o colágeno e o alginato em sua composição.

2.6.2 Gelatina

A gelatina é um polímero natural obtido pela desnaturação térmica ou pela degradação física e química do colágeno, proteína esta que é amplamente encontrada na natureza e o maior constituinte da pele. A biodegradação e a biocompatibilidade da gelatina são características que atraem o interesse de aplicação na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica, além de ser um material muito mais barato do que o próprio colágeno e de mais fácil obtenção em soluções concentradas (DONG, WANG & DU, 2006; GASPARD *et al*., 2008). A gelatina é um ingrediente utilizado em uma grande variedade de alimentos comercializados, assim como sobremesas, produtos cárneos e produtos de confeitaria (ANTWI, *et al*., 2006), e também vem sendo aplicada como material constituinte de produtos que promovem a limpeza de feridas, adesivos e, especialmente, em materiais farmacêuticos usados para a liberação controlada de droga ("drug delivery") (DONG, WANG & DU, 2006).

Estes mesmos autores, com o objetivo de produzir um sistema de liberação controlada de drogas, utilizaram, como modelo, filmes de alginato e de gelatina com ciprofloxacina incorporada, visando desenvolver um mecanismo eficaz de liberação controlada de drogas, *in vivo* e *in vitro* (DONG, WANG & DU, 2006). Além disso, a caracterização estrutural e morfológica do filme foi realizada. Os resultados indicaram que o filme pode ter uma aplicação

eficaz, mas que parâmetros como pH, quantidade de droga utilizada e espessura do filme possuem influência relevante nas propriedades de liberação da droga a partir do filme.

Assim como os antibióticos, as Bac também podem ser incorporadas em matrizes poliméricas para a formação de filmes ou estruturas bioativas, que tenham a possibilidade de emprego, tanto na indústria de alimentos como na indústria farmacêutica. As Bac produzidas pelas estirpes de *S. aureus* podem vir a ser empregadas, em sua forma purificada, como uma nova estratégia no controle da colonização de alimentos por microrganismos indesejáveis, assim como no controle e na prevenção de doenças infecciosas, uma vez que possuem um amplo espectro de ação, são resistentes a tratamentos térmicos e de pH. Além disso, o emprego de meios de cultura e a utilização de materiais mais baratos que proporcionem, ainda assim, um bom rendimento de produção de Bac, são formas de produção não tão onerosas para a indústria. O desenvolvimento de uma nova e possível estratégia de emprego industrial das Bac, utilizando-se técnicas de imobilização em matrizes de biopolímeros, vem a ser outro aspecto importante quando se pensa em uma aplicação na indústria farmacêutica ou de alimentos. Em razão disso, o estudo da produção de Bac e o desenvolvimento de uma estratégia que promova novas possibilidades de aplicação destas Bac são necessários.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de aplicação das aureocinas A70 e A53 na preservação de alimentos, ou como agentes terapêuticos, detectar a produção e caracterizar novas Bac produzidas por *Staphylococcus* spp. de origem animal.

3.2 Objetivos específicos

(Parte 1)

- Levantar o perfil de crescimento das estirpes produtoras das aureocinas A70 e A53 e de produção das respectivas Bac nos meios de cultura BHI, YPD e PD;
- Determinar os parâmetros cinéticos do crescimento microbiano e de produção das aureocinas A70 e A53;
- Determinar a meia-vida e o tempo de prateleira das aureocinas A70 e A53 nas temperaturas de -20°C, 4°C e 25° C;
- Aprisionar as aureocinas A70 e A53 em matriz de alginato/gelatina e verificar a sua liberação a partir desta matriz;
- Verificar a adsorção das aureocinas A70 e A53 a material plástico utilizado como embalagem de alimento;
- Analisar a cinética de ação das aureocinas A70 e A53.

(Parte 2)

- Detectar a produção de substâncias antimicrobianas (SAM) por 21 estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal;
- Identificar as estirpes que se mostraram produtoras de SAM;
- Analisar a sensibilidade das SAM produzidas pelas estirpes estudadas a enzimas proteolíticas e ao NaOH 0,2 N;

- Analisar o perfil de DNA plasmidial das estirpes;
- Estudar a ação das Bac produzidas por estirpes de *S. aureus* e de *S. epidermidis* sobre as estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal;
- Determinar o espectro de ação da Bac 3682;
- Purificar e determinar a massa molecular da Bac produzida pela estirpe 3682.

Parte 1

Investigação do potencial de utilização das aureocinas A70 e A53 como biopreservativos de alimentos

4. Materiais e Métodos

4.1 Estirpes bacterianas utilizadas e condições de cultivo

4.1.1 *Staphylococcus* spp.

As estirpes de *S. aureus* A70 e A53 foram isoladas, independentemente, a partir de leite pasteurizado dos tipos C e B, respectivamente (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990), e foram empregadas neste trabalho para os estudos de produção das Bac em diferentes meios de cultura, de vida de prateleira e de meia-vida, nos experimentos de aprisionamento em matriz de alginato e gelatina, de adsorção a material plástico e na determinação da cinética de ação das aureocinas A70 e A53. As estirpes de *S. aureus* A70 e A53 foram crescidas em meio BHI e incubadas a 37°C por 18 h, para posterior utilização. Estas estirpes foram estocadas em meio BHI com glicerol 40% (v/v), a -20°C, até o momento do uso.

4.1.2 Outras bactérias utilizadas como indicadoras

A estirpe *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 foi utilizada como estirpe indicadora (por ser muito sensível à ação de estaficoccinas) nos experimentos para a verificação da produção das aureocinas A70 e A53 nos diferentes meios de cultura, verificação da vida de prateleira e meia-vida dessas Bac e nos experimentos de aprisionamento das mesmas em matriz de alginato e gelatina e de adsorção a material plástico. A estirpe de *Micrococcus luteus* ATCC 4698 foi empregada para a titulação das preparações das aureocinas semipurificadas que foram utilizadas nos experimentos da verificação da cinética de ação das aureocinas. O emprego desta estirpe nestes experimentos foi realizado uma vez que o seu crescimento não proporcionava a formação de grumos que, desta forma, pudessem interferir na leitura da DO_{600}. A estirpe de *Listeria innocua* ATCC 33090 também foi empregada neste trabalho, como indicadora da atividade antimicrobiana das aureocinas, para verificação da sua cinética de ação. A estirpe mencionada acima foi utilizada neste trabalho por pertencer a um importante grupo de patógenos associados a alimentos sendo, porém, menos patogênica do que *L. monocytogenes*.Todas as estirpes foram previamente crescidas em meio BHI e incubadas a 37°C por 18 h, para posterior utilização. Estas estirpes bacterianas também foram estocadas em meio BHI com glicerol 40% (v/v), a -20°C, até o momento do uso.

4.1.3 Meios de cultura

- Meio BHI: *Brain Heart Infusion* (Difco ou Oxoid). Este meio foi utilizado em caldo, sólido [acrescido de ágar a 1,5% ou 1,0% (p/v)] e semi-sólido [acrescido de ágar a 0,7% (p/v)]. O meio BHI foi utilizado em todos os experimentos associados à produção das aureocinas.

- Meio YPD: 1% (p/v) de extrato de levedura (Difco), 2% (p/v) de peptona de carne (Vetec) e 2% (p/v) de dextrose (glicose anidra; Reagen).

- Meio PD: 0,2% (p/v) de peptona de carne e 2% (p/v) de dextrose.

- Meio TSB: *Tryptone Soya Broth* (Difco): Este meio de cultura foi utilizado como meio sólido [acrescido de ágar a 1,5% (p/v)], designado TSA, somente para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

Todos estes meios de cultura foram esterilizados por autoclavação em autoclave vertical, por 15 min a 121°C, e armazenados sob refrigeração até o momento do uso.

4.1.4 Outros materiais

- Ágar bacteriológico (Merck® ou Biolog®)
- Alginato de sódio – ISP Alginates Inc. Keltone® LV
- Cloreto de cálcio 2-hidrato cristalizado ($CaCl^{2+}$) (Merck®)
- Fosfato de sódio dibásico – (Reagen®)
- Gelatina bacteriológica – (Reagen®)
- Glicerol - (Reagen®)
- Hidróxido de sódio – (QEEL®)

4.2 Avaliação da produção de Bac pelas estirpes *S. aureus* A70 e A53 (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990, modificado)

As estirpes foram crescidas em 5 ml de meio BHI a 37°C por 18 h; 5 µl de cada cultura foram inoculados na forma de pontos na superfície de uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 25 ml de meio BHI sólido. Após um período de 24 h a 37°C, as bactérias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio por 30 min e, sobre a placa, foram vertidos 3 ml de meio BHI semi-sólido acrescido de alíquotas de 0,3 ml da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 (previamente crescida por 24 h a 37°C, em 5 ml de meio BHI). As placas foram reincubadas a 37°C por 18 h e a produção das aureocinas foi indicada pelas zonas de inibição ao redor dos pontos de crescimento das estirpes produtoras. Zonas de inibição iguais ou maiores do que 15 mm foram consideradas como possíveis indicadoras de produção de Bac pelas estirpes produtoras.

4.3 Curva de crescimento das estirpes *S. aureus* A70 e A53 nos meios BHI, YPD e PD

As estirpes foram previamente crescidas em 5 ml de meio BHI, por 18 h a 37°C. Após esse período de incubação, 1 ml da cultura foi inoculado em 100 ml dos meios de cultura BHI, YPD E PD, sendo estes incubados a 37°C por 24 h, sob agitação a 120 rpm em incubadora de bancada CT-712 (Cientec). Alíquotas de 100 µl foram retiradas assepticamente nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h. As diluições de 10^{-4} a 10^{-7} foram preparadas em 900 µl de salina estéril [NaCl a 0,85% (p/v)], sendo 100 µl de cada diluição semeados em placas de Petri contendo meio TSA. As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h, para a posterior contagem das UFC.

4.4 Curva de produção das aureocinas A70 e A53 nos meios BHI, YPD E PD

Para a avaliação da produção das aureocinas nos diferentes meios de cultura, as estirpes foram previamente crescidas em 5 ml de meio BHI, por 18 h a 37°C. Após esse período de incubação, 1 ml da cultura foi inoculado em 100 ml dos meios de cultura BHI, YPD E PD, sendo estes incubados a 37°C por 24 h, sob agitação a 120 rpm. Alíquotas de 1 ml foram retiradas dos meios nos mesmos intervalos de tempo descritos no item 4.3, para a avaliação da

atividade das aureocinas. Neste caso, o material (células e meio de cultura) foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 min em microcentrífuga CT-14000 R (Cientec), para a remoção das células bacterianas. O sobrenadante resultante foi então aquecido em banho-maria a 80°C por 10 min, para morte das células residuais e inativação de proteases, provenientes do metabolismo microbiano, que pudessem vir a interferir na atividade da aureocina A70, sendo esta Bac sensível à ação de enzimas proteolíticas (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990). O tratamento térmico por sua vez pôde ser realizado para esterilização do sobrenadante em razão da resistência das aureocinas a este tipo de tratamento (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990) e pelo fato dos estafilococos não formarem esporos (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

4.5 Determinação das unidades arbitrárias das Bac (UA/ml) (COELHO *et al.*, 2007)

Placas de Petri contendo 25 ml de meio BHI sólido foram cobertas por uma camada de BHI semi-sólido contendo aproximadamente 10^6 células da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547, previamente crescida por 24 h a 37°C, em 5 ml de meio BHI. Orifícios de 6 mm de diâmetro foram feitos no meio e preenchidos com 40 µl de diluições seriadas (1:2 a 1:512) das aureocinas, preparadas em meio BHI líquido. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. O título (UA/ml) foi dado pelo inverso da maior diluição que produzia halos de inibição contra a estirpe indicadora, multiplicado por 25, sendo os halos sempre medidos em mm. Este teste foi sempre realizado antes da utilização das aureocinas semipurificadas, para a quantificação das mesmas, utilizadas em experimentos posteriores.

4.6 Metodologias utilizadas nos cálculos das variáveis de resposta (SCHMIDELL *et al.*, 2005)

4.6.1 Fatores de conversão

Para a realização dos cálculos dos fatores de conversão, foram adotadas as seguintes definições:

4.6.1.1 Conversão de substrato (glicose) em Bac

$R = \Delta P/\Delta S = (P-P_o)/(S_o-S)$

Onde: P = concentração máxima de Bac

P_o = concentração inicial de Bac

S_o = concentração de substrato em P_o

S = concentração de substrato em P

4.6.1.2 Conversão de Bac por células formadas

$Y_{p/x} = \Delta P/\Delta X = (P-P_o)/(X-X_o)$

Onde: P = concentração máxima de Bac

P_o = concentração inicial de Bac

X = concentração máxima de UFC

Xo = concentração inicial de UFC

4.6.2 Produtividade

Para os cálculos da produtividade, foram utilizadas as seguintes formas de cálculo:

4.6.2.1 Produtividade em termos de produto:

$Q_p = (P-P_o)/(t-t_o)$

Onde: P = concentração máxima de Bac

P_o = concentração inicial de Bac

t = tempo de crescimento onde há a máxima produção de Bac

t_o = tempo inicial do crescimento

4.6.2.2 Produtividade em termos de células formadas :

$Q_x = (X-X_o)/ (t-t_o)$

Onde: X = concentração máxima de UFC

Xo = concentração inicial de UFC

t = tempo final de crescimento

t_o = tempo inicial de crescimento

4.7 Expressões matemáticas do crescimento

4.7.1 Taxa específica de crescimento

Este parâmetro cinético foi calculado da seguinte forma:

$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1)$

onde: X_2 = concentração de UFC no final da fase exponencial

X_1 = concentração de UFC no início da fase exponencial

t_2 = tempo de crescimento referente a X2

t_1 = tempo de crescimento referente a X1

4.7.2 Tempo de duplicação

$t_d = \ln 2/\mu$

Onde : μ = taxa específica de crescimento

4.8 Determinação da cinética de ação das aureocinas A70 e A53

4.8.1 Obtenção das preparações de Bac (PARENTE & HILL,1992, modificado)

As estirpes de *S. aureus* A70 e A53 foram crescidas em 15 ml de meio BHI, a 37°C por 18 h. Após este período de incubação, 10 ml de cada cultura foram inoculados em 1l de meio BHI, sendo novamente incubados por a 37°C por 8 h (aureocina A70) ou 24 h (aureocina A53), sob agitação a 200 rpm. Posteriormente, estas culturas foram centrifugadas a 16.300 x *g* por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram então coletados e precipitados com sulfato de amônio a 70% de saturação, sendo mantidos a 4°C por 3 h e meia, sob agitação. Decorrido esse tempo, uma nova centrifugação foi realizada a 23.300 x *g*, por 40 min a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e o sedimento foi suspenso em 100 ml de água Milli-Q estéril. A bacteriocina presente no sobrenadante foi titulada (UA/ml) através do método de titulação em microplacas de poliestireno (TTP), após esterilização por meio de filtração (membranas Millipore com poros de 0,22 μm).

4.8.2 Titulação das aureocinas A70 e A53 em microplacas de poliestireno

A solução das Bac foi diluída (1:2 a 1:4.048) em 100 µl de meio BHI colocados nos poços de microplacas de poliestireno. A cada poço, foram posteriormente adicionados 100 µl de uma cultura de *M. luteus* ATCC 4698, previamente crescida em 5 ml de meio BHI, por 24 h a 37°C, e diluída neste mesmo meio de cultura até uma DO_{600} correspondente a 0,05. Como controles, foram preparados dois poços contendo 200 µl das Bac não diluídas ou 100 µl de meio BHI adicionados de 100 µl da cultura diluída da estirpe indicadora (controle do crescimento microbiano). A microplaca foi incubada a 37°C por 24 h e, após este período, a DO_{600} de cada poço foi lida no aparelho "Automated Microplate Reader – ELX800" (Biotek Instruments). O título das Bac (UA/ml) correspondeu à maior diluição de Bac que resultou em uma redução de, no mínimo, 50% da DO_{600} correspondente ao controle de crescimento bacteriano, multiplicada por 10.

4.8.3 Análise da cinética de ação das aureocinas A70 e A53

A estirpe de *L. innocua* ATCC 33090 foi crescida em 5 ml de meio BHI e incubada a 37°C por 18 h. O material foi centrifugado a 13.000 rpm em microcentrífuga 5415 D

(Eppendorf), por 2 min, e as células foram então suspensas em 0,6 ml de meio BHI até a DO_{600} = 1,0 (aproximadamente 10^9 células). À suspensão celular, foi adicionada uma determinada quantidade de cada Bac, separadamente. À suspensão contendo a aureocina A53, ainda foram adicionados 300 µl de meio BHI para que a solução desta Bac estivesse com o mesmo título (2.048 UA/ml) da aureocina A70. Posteriormente, 400 µl de cada suspensão (células acrescidas das Bac) foram inoculados em microplacas do tipo "honeycomb" e incubadas no aparelho Bioscreen C (OY Growth Curves – Finland), por 8 h a 37°C. A cada hora, foi feita a leitura de DO_{600} de cada suspensão celular, precedida por agitação por 10 s antes de cada leitura. Nos controles de crescimento bacteriano (apenas a estirpe de *L. innocua*), não houve adição das aureocinas.

4.9 Avaliação da vida de prateleira das aureocinas A70 e A53:

4.9.1 Crescimento das estirpes *S. aureus* A70 e A53 e preparo do sobrenadante contendo as aureocinas:

As estirpes foram crescidas em 5 ml de meio BHI, a 37°C por 18 h; 1 ml das culturas foi inoculado em 100 ml de meio BHI e crescido sob agitação a 120 rpm, a 37°C por 8 h (estirpe A70) ou 24 h (estirpe A53). O sobrenadante das estirpes produtoras das aureocinas foi recolhido após centrifugação a 7.710 x*g* por 20 min e colocado em banho-maria a 80° C por 10 min, para morte celular e inativação de proteases. Este sobrenadante resultante foi, então, ultrafiltrado com a utilização de membrana Amicon YM10 (Millipore), com limite de exclusão de 1.000 Da, para concentração dos sobrenadantes. A titulação do sobrenadante foi realizada como descrito no item 4.5.

4.9.2 Estudo da vida de prateleira das aureocinas A70 e A53:

Após passagem pela membrana de ultrafiltração (conforme descrito no item anterior), o sobrenadante das aureocinas foi distribuído em alíquotas de igual volume (1,5 ml) e armazenado às temperaturas de -20° C, 4°C e 25°C, por um período de um ano e cinco meses. A determinação das UA/ml foi realizada, como descrito no item 4.5, ao longo de 72 semanas para a avaliação da vida de prateleira das Bac.

4.9.3 Estudo da meia-vida das aureocinas A70 e A53

A meia-vida das aureocinas foi determinada no momento em que o seu título caiu pela metade, nas diferentes condições de temperatura a que foram submetidas, durante o tempo de avaliação da atividade.

5. Aprisionamento das aureocinas A70 e A53 em matriz de alginato e gelatina

5.1 Obtenção das aureocinas A70 e A53 (semipurificadas) a partir de precipitação com sulfato de amônio (PARENTE & HILL,1992)

As estirpes foram crescidas em 5 ml de meio BHI a 37°C por 18 h. Posteriormente, 1 ml de cada suspensão celular foi inoculado em 100 ml de meio BHI e as culturas foram crescidas sob agitação a 120 rpm, durante 8 h (A70) ou 24 h (A53). As culturas foram centrifugadas a 7.710 x*g*, por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e precipitados com sulfato de amônio a 70% de saturação, a 4°C, sob agitação por 2 h. Após o sal entrar todo em solução, as preparações foram centrifugadas a 13.200 x*g*, por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os materiais precipitados foram dissolvidos em 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Em seguida, as preparações foram submetidas à diálise em membranas com limite de exclusão de 2.000 Da (para a aureocina A70) ou de 3.500 Da (para a aureocina A53), por 24 h a 4°C, contra o mesmo tampão. As preparações foram esterilizadas através de aquecimento a 80°C por 10 min e o título foi encontrado como descrito anteriormente no item 4.5.

5.2 Produção de matriz de alginato/gelatina com adição das Bac semipurificadas (MARCOS *et al.*, 2008, modificado)

Primeiramente, o alginato de sódio (0,4 g) e a gelatina bacteriológica (0,5 g) foram dissolvidos em 8 ml de água Milli-Q, até a formação de uma solução homogênea que foi submetida à esterilização por autoclavação a 121°C, por 15 minutos. Após o resfriamento da solução de alginato/gelatina, foram incorporados, gentilmente, 2 ml das soluções das aureocinas A70 e A53, semipurificadas, com o título de 3.200 UA/ml e 800 UA/ml, respectivamente, obtidas conforme descrito no item anterior, formando-se então uma solução

homogênea de alginato a 4% (p/v) e gelatina a 5% (p/v), adicionada de cada Bac separadamente.

Para a formação da matriz, uma alíquota de 1 ml desta solução foi vertida sobre uma placa de Petri estéril de 10 cm de diâmetro, onde, prontamente, foi submetida ao espalhamento com o auxílio de alça de vidro, sobre uma área de aproximadamente 20 cm^2. Após secagem do material à temperatura ambiente por 15 min, 10 ml de solução de $CaCl_2$ 0,15 M foram vertidos sobre o material. Após 30 min sob a ação do $CaCl_2$, este foi retirado e titulado como descrito no item 4.5, para se verificar se o $CaCl_2$ não inibiria o crescimento da bactéria indicadora ou se haveria atividade residual das Bac na solução de $CaCl_2$.

5.3 Verificação da atividade das aureocinas A70 e A53 aprisionadas em matriz de alginato/gelatina (MARCOS *et al.*, 2007)

Para a verificação da atividade das Bac aprisionadas na matriz de alginato/gelatina, uma seção da matriz com tamanho de 1,5 x 1,0 cm foi retirada com o auxílio de um estilete e posicionada sobre a superfície de uma placa de Petri contendo 25 ml de meio BHI sólido, coberto por uma camada de BHI (3 ml) semi-sólido contendo aproximadamente 10^6 células da indicadora *C. fimi* NCTC 7547. Logo após, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, foi verificada, ou não, a inibição da estirpe indicadora no local onde a seção foi posicionada e se houve formação de halo de inibição, sendo este medido.

5.4 Verificação da adsorção das aureocinas A70 e A53 a material plástico utilizado na conservação de alimentos (SCANNELL *et al.*, 2000b, modificado)

Sacos plásticos (de polietileno), cujas dimensões de 10,0 x 6,0 cm e que são utilizados para produzir vácuo foram empregados para se verificar a possível adsorção das aureocinas A70 e A53 a este material. Seções de 2,0 x 2,0 cm do material plástico foram cortadas e colocadas dentro de um saco plástico, juntamente com 1 ml das preparações das aureocinas A70 e A53, obtidas como descrito no item 5.1. Após 48 h de armazenamento a 4°C, as seções foram secadas à temperatura ambiente por aproximadamente 20 min (ou até que este material não apresentasse gotículas na superfície). Posteriormente, cada seção foi lavada com água Milli-Q estéril e novamente secada à temperatura ambiente por aproximadamente 20 min (ou até que este material não apresentasse gotículas na superfície). Após a secagem, a seção foi

posicionada sobre a superfície de uma placa de Petri contendo 25 ml de meio BHI sólido, coberto por uma camada de 3 ml de BHI semi-sólido contendo aproximadamente 10^6 células da indicadora *C. fimi* NCTC 7547 (previamente crescida por 24 h a 37°C, em 5 ml de meio BHI). A placa foi então incubada a 37°C por 24 h e, posteriormente, foi verificada a presença ou não de zonas de inibição ao redor da seção.

5.5 Análise estatística

O teste T (com o valor de $p<0,05$) foi empregado visando-se comparar se a diferença no tamanho dos halos encontrados nos experimentos de produção das aureocinas A70 e A53, nos meios de cultura BHI e YPD e nos tempos de seis e oito horas, era significativa. Este mesmo teste também foi utilizado para se verificar se havia diferença significativa entre o crescimento da estirpe A70 nos meios BHI e YPD, no período de 6 a 8 h de crescimento da estirpe. O software utilizado para estas análises foi o EXCEL XLSTAT 2008.

6. Resultados, Discussão e Conclusões

6.1 Verificação da produção de Bac pelas estirpes *S. aureus* A70 e A53

A produção de Bac pelas estirpes de *S. aureus* A70 e A53 em meio BHI sólido está demonstrada na figura 10, onde se verifica a formação de halos de inibição contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547. A média dos halos de inibição, após três experimentos independentes, foi de 29 mm ± 1, para a estirpe A53, e 32 mm ± 3, para a A70.

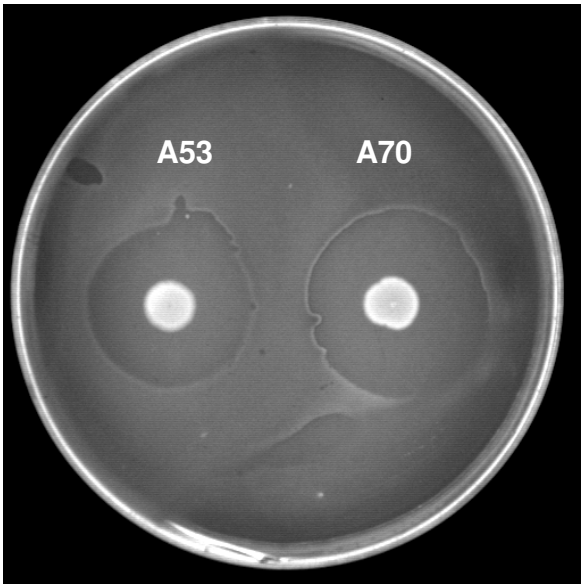

Figura 10: Produção de Bac pelas estirpes A70 e A53. A estirpe *C. fimi* NCTC 7547 foi utilizada como indicadora.

6.2 Curvas de crescimento e produção de Bac pelas estirpes *S. aureus* A70 e A53 em diferentes meios de cultura

Os experimentos foram realizados para se verificar o crescimento das estirpes de *S. aureus* A70 e A53 nos diferentes meios de cultura BHI, YPD e PD e se estimar os parâmetros cinéticos e de rendimentos.

6.2.1 Curva de crescimento da estirpe A70 e produção de aureocina A70

A curva de crescimento da estirpe *S. aureus* A70 nos meios BHI e YPD está representado na figura 11. Partindo-se de uma cultura contendo 3,2 x 10^6 UFC/ml desta estirpe em meio BHI, o número de células encontradas no intervalo de 2 a 4 h do crescimento da estirpe foi de 9,7 x 10^7 UFC/ml e 9,3 x 10^8 UFC/ml, respectivamente, em meio BHI, e 4,1 x 10^7 UFC/ml e 3,2 x 10^8 UFC/ml, respectivamente, em meio YPD. Com 6 h de crescimento nos meios de cultura, onde a produção da aureocina A70 foi detectada (figura 12), o número de células encontrado chegou a valores de 1,7 x 10^9 UFC/ml, em meio BHI, e 1,2 x 10^8 UFC/ml, em meio YPD.

No meio BHI, a produção máxima da aureocina A70 ocorreu após 8 h de crescimento, onde o número de células alcançou 1,2 x 10^{10} UFC/ml. Já no meio YPD, o máximo da produção da aureocina A70 foi atingido após 6 h, sendo que o número de células encontrado foi de 1,1 x 10^9 UFC/ml. Com 24 h de incubação, observou-se um decréscimo no crescimento da estirpe em ambos os meios de cultura, indicando o início de uma fase de morte celular, onde o número de células encontrado foi de 7,7 x 10^9 UFC/ml, em meio BHI, e de 5,4 x 10^8 UFC/ml, em meio YPD.

Em razão do pouco crescimento da estirpe A70 no meio líquido PD, a contagem de UFC/ml neste meio não foi realizada. O meio de cultura PD não proporcionou também a produção da aureocina A70. Este fato deve estar relacionado com o pouco crescimento da estirpe neste meio, em razão da menor quantidade de peptona (fonte de nitrogênio) contida neste meio, além da ausência do extrato de levedura. Os meios de cultura YPD e PD são empregados no crescimento de leveduras (RIBEIRO & HORII, 1999; VAN REENEN *et al.*, 2003), e, por serem meios não tão onerosos em relação ao meio BHI, foram empregados neste trabalho.

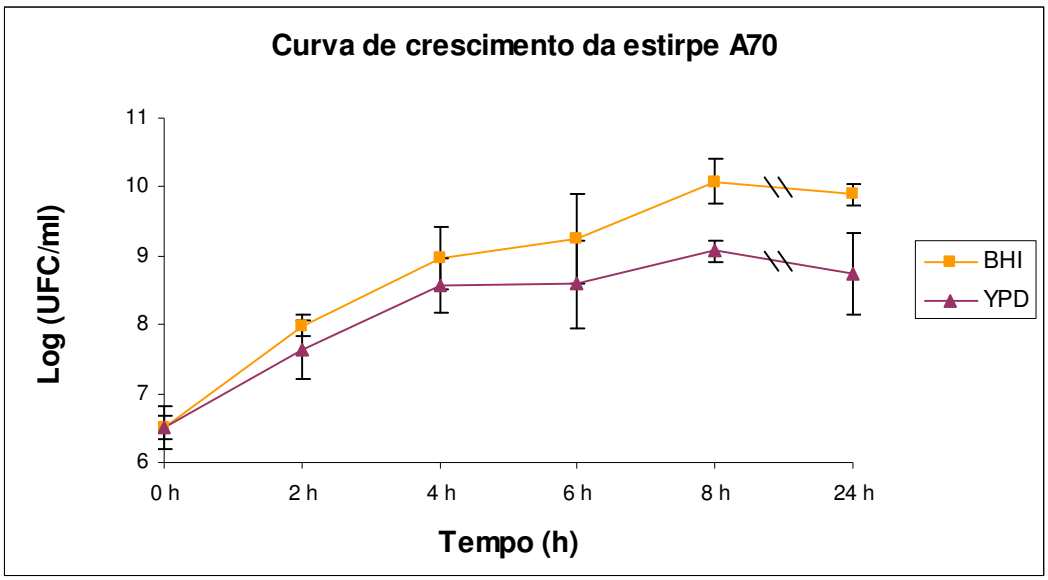

Figura 11: Curva de crescimento da estirpe *S. aureus* A70 nos meios de cultura BHI (■) e YPD (▲). Média de três experimentos independentes, sendo os desvios-padrão representados pelas barras.

É possível se evidenciar que a diferença nutricional dos meios de cultura influencia no crescimento da estirpe *S. aureus* A70, uma vez que o seu crescimento no meio de cultura BHI foi maior do que no meio de cultura YPD. Esta diferença foi comprovada estatisticamente (p=0,050), utilizando-se o teste T e comparando-se o crescimento da estirpe nos meios BHI e YPD no intervalo de 6 a 8 h.

Quando o crescimento microbiano desta estirpe alcançou o intervalo de 4 a 6 h, o início de uma fase estacionária de crescimento pareceu se estabelecer, porém este fato não se mostrou verdadeiro, uma vez que, com 8 h de crescimento, ainda houve um aumento no número de células viáveis. O intervalo de 4 a 6 h de crescimento da estirpe A70 coincide com o intervalo de começo da detecção da produção da aureocina A70, como podemos verificar na figura 12.

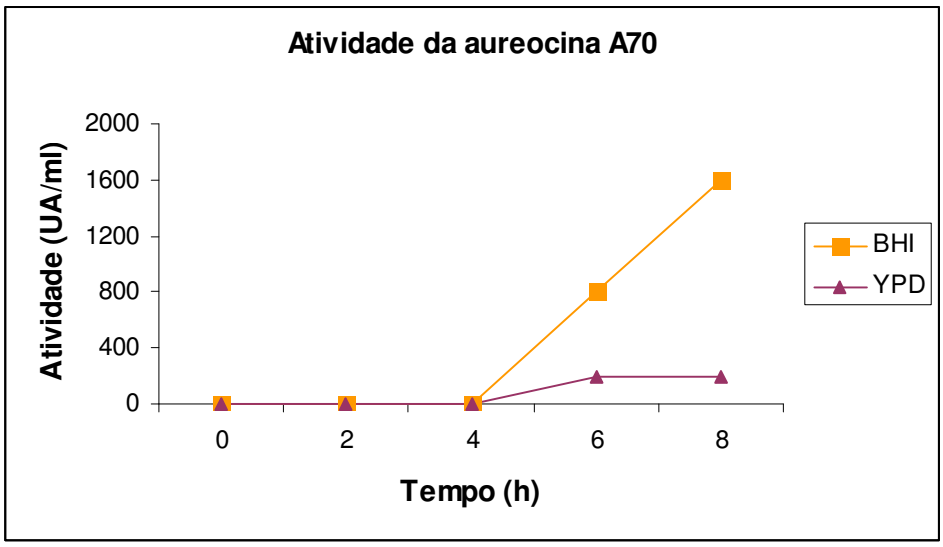

Figura 12: Curva de produção da aureocina A70 nos meios BHI ■ e YPD ▲. Média de três experimentos independentes. Desvios-padrão, zero.

O início da detecção da produção da aureocina A70 foi observado com 6 h de crescimento da estirpe nos meios BHI e YPD, quando uma aparente fase estacionária pareceu se estabelecer, sendo o título alcançado de 800 UA/ml e 200 UA/ml, respectivamente. O máximo de produção foi verificado com 8 h de crescimento no meio BHI, alcançando 1.600 UA/ml. Por outro lado, no meio YPD, a produção com 8 h de crescimento manteve-se igual à encontrada com 6 h de crescimento da estirpe. Após 24 h de crescimento da estirpe, a produção da aureocina A70 não foi observada em nenhum dos meios de cultura, sugerindo uma perda total da atividade inibitória ocasionada, provavelmente, pela degradação da aureocina A70 por enzimas do metabolismo microbiano liberadas no meio de cultura. Este fato pode ser explicado através dos resultados descritos por Giambiagi-deMarval *et al.* (1990), que mostraram que a aureocina A70 é uma Bac sensível à ação de enzimas proteolíticas.

Os resultados encontrados com relação à produção da aureocina A70 em meio de cultura BHI foram semelhantes aos descritos por Nascimento *et al.* (2004), que verificaram que a produção máxima desta Bac alcançava 1.600 UA/ml com 8 h de crescimento. Entretanto, o título encontrado pelos autores supracitados, após 6 h de crescimento da estirpe, foi a metade do título encontrado neste trabalho. Este fato talvez esteja relacionado com o volume de meio de cultura utilizado no presente trabalho, que foi o dobro do empregado pelos autores mencionados acima e com a forma de obtenção da preparação de Bac, que foi realizada por liofilização no trabalho precedente.

O meio YPD não proporcionou uma grande produção da aureocina A70, mesmo com 8 h de crescimento, indicando que a diferença na composição deste meio de cultura em relação ao meio BHI influenciou muito na produção da aureocina A70. Este fato pode ser explicado uma vez que a estirpe de *S. aureus* A70 apresentou um menor crescimento neste meio de cultura.

O máximo de produção da aureocina A70 foi detectada com 8 h de crescimento, quando se verificou, também, a maior contagem do número de células viáveis da estirpe A70, no meio BHI, nas condições experimentais que foram utilizadas neste trabalho. Com isso, verificamos que, pelo menos no meio BHI, a quantidade de células viáveis influencia na produção desta Bac. Este fato não foi observado quando o meio de cultura YPD foi empregado.

A figura 13 representa o histograma do tamanho dos halos de inibição observados em relação à aureocina A70 não diluída, produzida nos meios BHI e YPD. Os halos de inibição da aureocina A70 produzida em meio BHI mostraram-se maiores do que os encontrados quando a produção da aureocina A70 foi realizada em meio YPD, alcançando a média de 18 mm, no meio BHI, e 12 mm, em meio YPD, com 8 h de crescimento da estirpe. Como descrito anteriormente, após 24 h de crescimento, não foi detectada a produção da aureocina A70 nos meios de cultura.

A diferença no tamanho dos halos encontrados quando a produção da aureocina A70 se deu no meio de cultura BHI, nos tempos de 6 e 8 h de crescimento, não se mostrou significativa quando comparados através do emprego de testes estatísticos (p= 0,975), embora a quantidade de aureocina A70 presente no meio fosse o dobro com 8 h de crescimento. Este resultado revela que o tamanho dos halos encontrados não indica, necessariamente, uma maior produção da Bac.

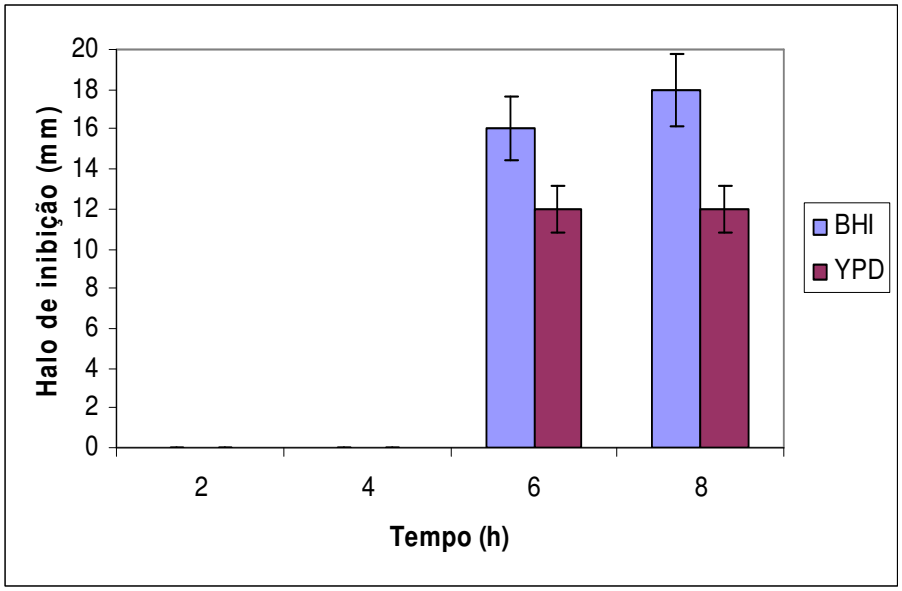

Figura 13: Histograma do tamanho dos halos de inibição (em mm), contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547, causados pela aureocina A70 não diluída, produzida nos meios BHI e YPD. Média de três experimentos independentes, sendo os desvios-padrão representados pelas barras.

6.2.2 Curva de crescimento da estirpe A53 e produção da aureocina A53

A figura 14 apresenta a curva de crescimento da estirpe *S. aureus* A53 nos meios de cultura BHI e YPD. Partindo-se de uma cultura com 3,7 x 10^6 UFC/ml da estirpe *S. aureus* A53 em meio BHI, o número de células encontradas no intervalo de 2 a 4 horas de crescimento foi de 6,2 x 10^7 UFC/ml e 7,9 x 10^8 UFC/ml, em meio de cultura BHI, e de 5,2 x 10^7 UFC/ml e 3,3 x 10^8 UFC/ml em meio de cultura YPD. Com 6 h de crescimento, as contagens de células chegaram a 2,0 x 10^9 UFC/ml, em meio BHI, e 7,7 x 10^8 UFC/ml, em meio de cultura YPD. Com 8 h de crescimento, as contagens de células viáveis não mostraram grandes alterações, alcançando 3,9 x 10^9 UFC/ml, em meio BHI, e 8,7 x 10^8 UFC/ml, em meio de cultura YPD. Após 24 h de incubação, observou-se um decréscimo no crescimento bacteriano tanto no meio BHI como no meio YPD, onde as contagens obtidas foram de 9,7 x 10^8 UFC/ml e 2,8 x 10^8 UFC/ml, respectivamente.

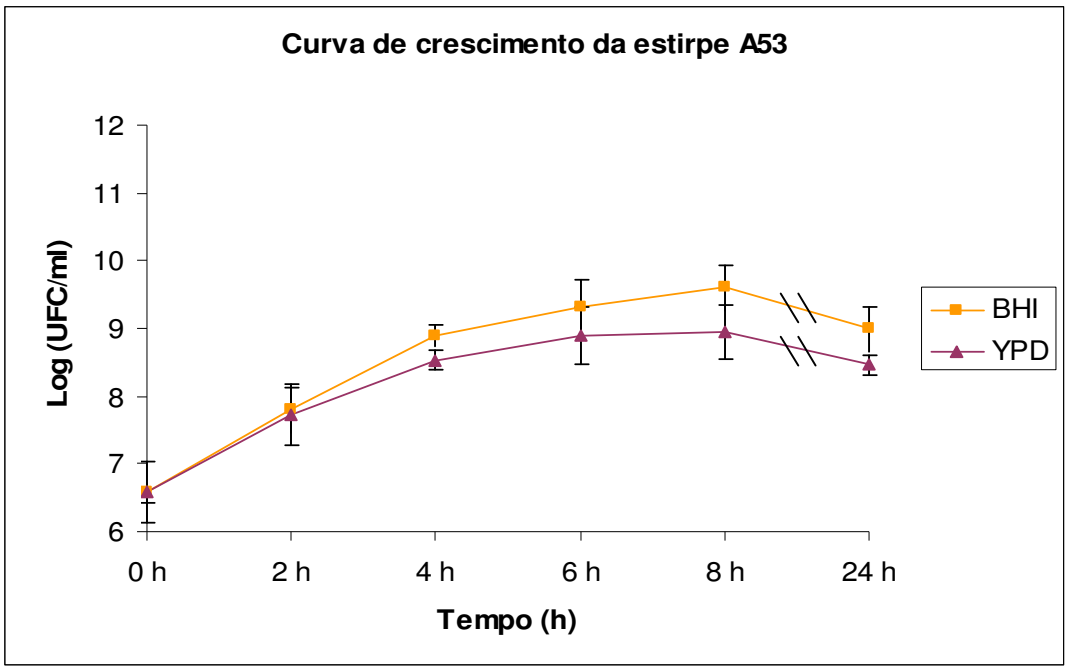

Figura 14: Curva de crescimento da estirpe *S. aureus* A53 nos meios de cultura BHI ■ e YPD ▲. Média de três experimentos independentes, sendo os desvios-padrão representados pelas barras.

A estirpe *S. aureus* A53 parece entrar na fase estacionária a partir de 6 h de crescimento microbiano no meio de cultura YPD. Porém, no meio de cultura BHI, parece haver desaceleração do crescimento a partir de 4 h, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho. Nascimento *et al.* (2004) verificaram que a estirpe A53 também iniciava a sua fase de desaceleração em meio BHI a partir de 4 h do crescimento da estirpe.

A produção da aureocina A53 nos diferentes meios de cultura está representada na figura 15. Sua detecção se deu com 6 h de crescimento da estirpe de *S. aureus* A53 no meio BHI, alcançando o máximo de produção (400 UA/ml) também neste mesmo tempo. Com 8 h de crescimento da estirpe neste meio de cultura, o título da Bac manteve-se inalterado. No meio YPD, a produção da aureocina A53 também foi detectada com 6 h de crescimento da estirpe produtora. O título máximo alcançado foi a metade (200 UA/ml) do observado em meio BHI. Não foi observado decréscimo na quantidade da aureocina A53 durante o período de 24 h, em ambos os meios de cultura, mantendo-se o título de 400 UA/ml, em meio de cultura BHI, e 200 UA/ml, em meio de cultura YPD.

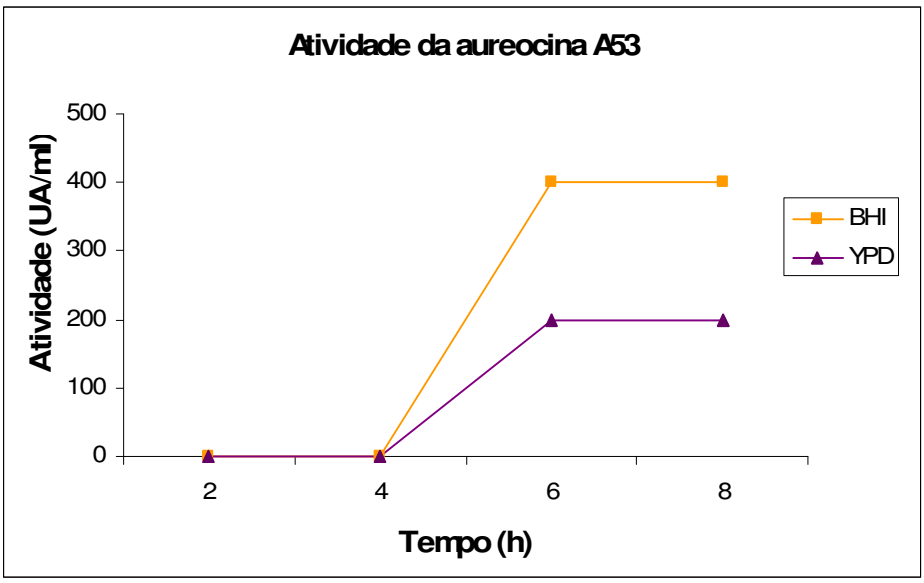

Figura 15: Curva de produção da aureocina A53 nos meios BHI ■ e YPD ▲. Média de três experimentos independentes. Desvios-padrão, zero.

Nascimento *et al.* (2004) detectaram que a produção da aureocina A53 em meio BHI iniciava no intervalo entre 4 h e 6 h de crescimento da estirpe produtora de Bac, juntamente com o início da fase de desaceleração do crescimento da estirpe. No presente trabalho, a produção da aureocina A53 foi detectada com 6 h de crescimento microbiano nos meios de cultura BHI e YPD. Devido à metodologia empregada neste trabalho, não foi feita a avaliação da atividade antimicrobiana no intervalo entre 4 h e 6 h. Em relação ao meio YPD, este promoveu um crescimento menor da estirpe de *S. aureus* A53, além de promover uma menor produção da aureocina A53.

Crupper, Gies & Iandolo (1997), estudando a Bac R1 produzida pela estirpe *S. aureus* UT0007, verificaram que a produção desta Bac iniciava-se após 4 h de crescimento da estirpe produtora, e, com 8 h de crescimento, alcançava o máximo de produção (300 UA/ml), mantendo-se desta maneira por, pelo menos, 24 h.

Na figura 16, pode-se verificar que praticamente não houve diferença no tamanho dos halos de inibição encontrados quando a aureocina A53 foi produzida nos meios BHI e YPD nos tempos de 6 e 8 h, embora os títulos da Bac nesses dois meios fossem bem diferentes. Com 8 h, os halos encontrados foram ligeiramente maiores do que os detectados com 6 h de crescimento da estirpe, embora os títulos da Bac fossem os mesmos nesses dois tempos. Entretanto, a diferença no tamanho dos halos encontrados, quando a produção da aureocina A53 foi realizada no meio de cultura BHI nos tempos de 6 e 8 h de crescimento, não se mostrou

significativa, quando os tamanhos dos halos foram comparados entre si, através do emprego de testes estatísticos (p=0,313). O mesmo resultado foi encontrado em relação ao meio de cultura YPD (p=0,313).

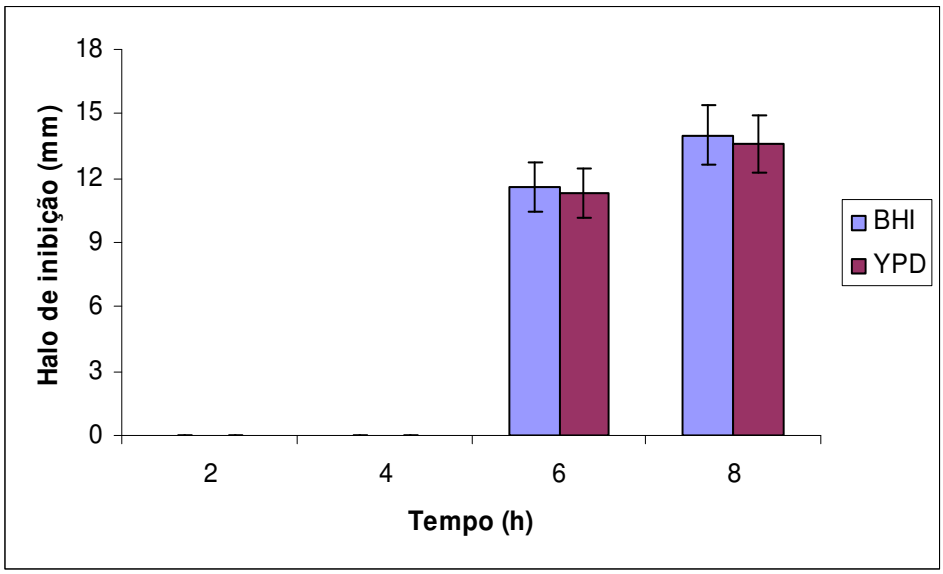

Figura 16: Histograma do tamanho dos halos de inibição (em mm), contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547, causados pela produção da aureocina A53 produzida nos meios BHI e YPD. Média de três experimentos independentes, sendo os desvios-padrão representados pelas barras.

Com 24 h de crescimento da estirpe, o tamanho dos halos também aumentou um pouco, passando para 16 mm no meio BHI e 14 mm no meio YPD. Este fato não representa uma maior produção da aureocina A53, uma vez que o título encontrado com 24 h de crescimento da estirpe não aumentou. Esses resultados confirmam, ainda, a resistência desta Bac à ação de enzimas proteolíticas (GIAMBIAGI de-MARVAL *et al.*, 1990; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho reafirmam que a composição nutricional do meio de cultura empregado influencia bastante na produção das aureocinas A70 e A53, uma vez que em relação ao meio BHI, o meio YPD pode ser considerado pobre nutricionalmente. Nascimento *et al.* (2004) testaram a produção das aureocinas A70 e A53 em diferentes meios de cultura como, BHI, TSB, ágar nutriente, entre outros, e verificaram que o meio BHI proporcionava uma maior produção destas Bac do que os outros meios de cultura testados.

Um exemplo da influência nutricional na produção de Bac foi descrito também por Nakamura *et al.* (1983) que, avaliando a produção da estafilococcina IYS2 (produzida pela

estirpe *S. aureus* IYS2 isolada de saliva humana) nos meios de cultura BHI acrescido de extrato de levedura, TSB e ágar nutriente, verificaram que a produção desta Bac era maior no primeiro meio de cultura. A produção máxima desta Bac foi verificada no intervalo entre 8 e 10 h do crescimento microbiano, mantendo o mesmo título até 24 h de crescimento da estirpe produtora.

A produção da sakacina P produzida pela estirpe de *L. sakei* CCUG 42687 também é muito influenciada pelo tipo e concentração de nutrientes complexos presentes no meio, assim como pela disponibilidade de ácidos aminados (AASEN *et al*., 2000).

Arkoudelos e Nychas (1995), estudando o crescimento de *Staphylococcus carnosus* em meios de cultura com e sem glicose, verificaram que a rápida assimilação de glicose, pela estirpe de *S. carnosus* TM-300, promoveu uma grande mudança no pH do meio de cultura, provavelmente pela rápida assimilação da glicose como fonte de carbono disponível, levando à produção de ácido láctico ou acético.

Estudos que revelem as vias metabólicas utilizadas pelas estirpes de *S. aureus* A70 e A53 ainda não foram realizados. Uma vez que fatores ambientais como meio de cultura, tensão de oxigênio, concentração de NaCl e pH podem vir a afetar a produção de Bac (KAISER & MONTVILLE, 1993; AASEN *et al*., 2000; NASCIMENTO *et al*., 2004), a produção das aureocinas A70 e A53 também poderia sofrer influência da acidificação do meio de cultura YPD por produtos do metabolismo microbiano, como o lactato e o acetato (NYCHAS *et al*., 1991; SOMERVIILE *et al*., 2003). A redução do crescimento microbiano, em razão da diminuição do pH, poderia explicar a razão da menor produção das Bac no meio YPD. Esta acidificação não parece acontecer no meio de cultura BHI, por este ser um meio de cultura tamponado. Porém, a medição dos valores de pH dos meios durante o crescimento microbiano, de ambas as estirpes, o que poderia esclarecer este fato, não foi realizada.

Concluímos, portanto, que o meio de cultura BHI, apesar de ser um meio de cultura complexo e caro, parece ser o meio de cultura mais adequado para a produção das aureocinas A70 e A53.

Um grande esforço vêm sendo realizado para se entender a genética da produção de Bac, visando-se aumentar a sua produção, uma vez que a produção de certas Bac é regulada, o que pode levar a uma diminuição da produção destas substâncias sob certas condições (DIEP *et al*., 2006; GÁLVEZ *et al*., 2007; BASTOS *et al*., 2009). Portanto, estudos que venham a desvendar a regulação de produção das aureocinas são, por isso, cruciais e vêm sendo conduzidos em nosso laboratório.

6.3 Resultados obtidos através dos cálculos das variáveis de resposta

Diferentes condições de crescimento, como a composição de um meio de cultura, podem vir a influenciar na taxa específica de crescimento e no tempo de duplicação de estirpes bacterianas, sendo estas variáveis importantes em estudos de síntese de produtos microbianos (KAISER & MONTVILLE, 1993).

6.3.1 Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação

Os resultados encontrados para a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação das estirpes de *S. aureus* A70 e A53 na fase log do crescimento microbiano (intervalo entre 2 a 4 h de crescimento) estão demonstrados na tabela 5.

A estirpe *S. aureus* A70 apresentou uma taxa específica de crescimento maior em meio de cultura BHI do que em meio YPD, mostrando uma maior rapidez de seu crescimento em meio BHI. Com relação à estirpe *S. aureus* A53, os valores encontrados para a sua taxa específica de crescimento foram quase os mesmos em ambos os meios de cultura, mostrando uma melhor adaptação desta estirpe ao meio de cultura YPD, durante a fase log de crescimento.

Com relação ao crescimento de ambas as estirpes em meio BHI, não houve quase diferença nos resultados encontrados, sendo que os valores determinados para a taxa específica de crescimento foram de 1,41 ± 0,2 h^{-1} e tempo de duplicação de 30 min, para a estirpe *S. aureus* A70, e de 1,35 ± 0,08 h^{-1} e 31 min, para a estirpe *S. aureus* A53. Quando comparamos a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação de ambas as estirpes no meio YPD, observamos que a estirpe A70 possui uma taxa específica de crescimento menor do que a estirpe A53, sendo os valores de 1,18 ± 0,1 e 1,33 ± 0,07 h^{-1}, respectivamente. Conseqüentemente, o valor referente ao tempo de duplicação da estirpe A70 no meio YPD foi maior do que o encontrado para a estirpe A53, sendo os valores de 35 min e 31 min, respectivamente.

Estes resultados demonstram que o crescimento da estirpe *S. aureus* A70 parece ser mais afetado pela composição do meio YPD do que o crescimento da estirpe *S. aureus* A53. Entretanto, a produção de ambas as aureocinas A70 e A53 foi maior no meio BHI do que no meio YPD.

Tabela 5: Valores da taxa específica de crescimento na fase log (intervalo de 2 a 4 h) e do tempo de duplicação encontrados para as estirpes *S. aureus* A70 e A53.

Estirpe	Meio BHI		Meio YPD	
	μ	**t_d**	**μ**	**t_d**
A70	1,41 ± 0,2 h^{-1}	0,50 h ou 30 min	1,18 ± 0,1 h^{-1}	0,60 h ou 35 min
A53	1,35 ± 0,08 h^{-1}	0,51 h ou 31 min	1,33 ± 0,07 h^{-1}	0,52 h ou 31 min

μ - taxa específica de crescimento; t_d – tempo de duplicação

Dengremont e Membré (1995), utilizando um modelo estatístico, avaliaram a taxa específica de crescimento de estirpes de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas em diferentes condições de pH, temperatura e concentração de NaCl. O tempo de duplicação encontrado para a estirpe B, com crescimento a 37°C em meio TSB, pH 7,4 e 0% de NaCl, foi de 0,66 h e o valor da taxa de crescimento específica foi de 1,05 h^{-1}. Quando esta mesma estirpe foi crescida a 14°C, pH 7,4 e 0% NaCl, o valor da taxa específica de crescimento caiu para 0,05 h^{-1} (tempo de geração de 13 h). A estirpe C, também utilizada neste trabalho, teve a sua taxa de crescimento específico aumentada de 0,44 h^{-1} (tempo de duplicação de 1,6 h), com 0 % de NaCl, para 0,87 h^{-1} (tempo de duplicação de 0,8 h), com 2 % de NaCl. Estes autores também verificaram que os melhores valores para as taxas específica de crescimento foram observados para valores de pH entre 6,5 e 7,4, sob qualquer temperatura testada. O meio BHI, com pH em torno de 7,4, possui NaCl em sua composição (0,5 %), o que pode sugerir que este sal seja um importante fator para o crescimento das estirpes de *S. aureus* empregadas neste trabalho, uma vez que o meio YPD não possui NaCl em sua composição.

Kaiser e Montville (1993), estudando a produção da bavaricina MN, produzida pela estirpe de *Lactobacillus bavaricus* MN, verificaram que o título desta Bac parecia ser mais influenciado pelo pH da cultura do que pela taxa de crescimento específico, quando a produção desta Bac era testada em um quimiostato.

A produção da nisina, uma Bac produzida por certas estirpes de *L. lactis*, sofre influência não apenas da composição do meio de cultura, mas também do pH do meio de cultura e da taxa específica de crescimento. O título máximo desta Bac (160 AU/ml) foi encontrado com um valor de μ = 0,25 h^{-1} (MEGHROUS *et al.*, 1992).

6.3.2 Rendimentos

Os rendimentos calculados neste trabalho basearam-se no consumo de glicose total durante o crescimento microbiano para conversão em Bac e na conversão de Bac por células formadas. Estes cálculos basearam-se no tempo em que houve maior produção das Bac durante o crescimento microbiano. Com isso, os cálculos de rendimento para a estirpe *S. aureus* A70 foram realizados com 8 h de crescimento microbiano nos meios de cultura BHI e YPD, enquando que os mesmos foram realizados com 6 h para a estirpe *S. aureus* A53. Os valores de rendimentos encontrados estão indicados na tabela 6.

Estes valores de rendimentos foram expressos em UA/UFC, uma vez que a metodologia empregada não foi a usual (peso seco) por se tratar de microrganismos muito pequenos, além do pequeno volume de cultura empregado (100 ml), gerando assim dados sem precisão para que uma curva de peso seco pudesse ser utilizada no trabalho.

Tabela 6: Rendimentos encontrados para a produção das aureocinas A70 e A53

Estirpes	**Rendimentos**	
	R	**$Y_{p/x}$**
A70 em BHI	80 UA/mg	1,3 x 10^{-7} UA/UFC
A70 em YPD	10 UA/mg	1,8 x 10^{-7} UA/ UFC
A53 em BHI	20 UA/mg	2,1 x10^{-7} UA/ UFC
A53 em YPD	10 UA/mg	5,2 x 10^{-7} UA/ UFC

R – rendimento de substrato (glicose) em Bac; $Y_{p/x}$- conversão de Bac por células formadas

De acordo com os resultados contidos na tabela acima, observamos que o meio de cultura YPD promoveu um rendimento menor de conversão de Bac em relação ao consumo de glicose, para ambas estirpes produtoras de Bac. Embora o meio BHI tenha proporcionado um rendimento mais baixo com conversão de Bac em relação ao consumo de glicose pela estirpe *S. aureus* A53, em relação ao rendimento encontrado para a estirpe de *S. aureus* A70, o meio de cultura BHI ainda assim mostrou melhores resultados. Os resultados obtidos em relação à conversão de Bac por células formadas foram semelhantes para a estirpe A70 em ambos os meios de cultura. Com relação à estirpe A53, os resultados encontrados em relação ao meio YPD foram mais do que o dobro dos encontrados com a utilização do meio BHI.

6.3.3 Produtividades

As produtividades em termos de produto (Bac) e em termos de células formadas, encontradas para as estirpes de *S. aureus* A70 e A53, estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7: Produtividades encontradas para as estirpes *S. aureus* A70 e A53

Produtividades	**Estirpes**	
	A70	**A53**
Q_p (meio BHI)	200 UA/h	66,6 UA/h
Q_p (meio YPD)	25 UA/h	33,3 UA/h
Q_x (meio BHI)	1,5 x 10^9 UFC/h	3,3 x10^8 UFC/h
Q_x (meio YPD)	1,3 x 10^8 UFC/h	1,2 x 10^8 UFC/h

Q_p – produtividade em termos de produto (Bac); Q_x – produtividade em termos de células formadas.

Com relação às produtividades relativas ao produto (Bac) formado, observou-se que o meio de cultura YPD proporcionou valores menores do que os encontrados para o meio de cultura BHI, mostrando, mais uma vez, que este meio de cultura não é o melhor meio a ser utilizado para a produção das aureocinas A70 e A53. A produtividade em termos de células formadas também revelou-se maior em relação ao meio de cultura BHI, para ambas as estirpes.

6.4 Verificação da cinética de ação das aureocinas A70 e A53

O estudo quanto à cinética de ação das Bac, objetivando um futuro emprego das aureocinas A70 e A53 como biopreservativos de alimentos ou até mesmo como agentes que possam vir a ser utilizados no combate a infecções, é de extrema importância e cada vez mais estudos que esclareçam estas questões são necessários. A figura 17 mostra a cinética de ação das aureocinas A70 (A) e A53 (B), determinada a partir do emprego de uma preparação semipurificada das aureocinas com o mesmo título (2.048 UA/ml). A cinética de ação foi determinada, medindo-se a diferença da DO_{600} entre as culturas com adição das aureocinas

A70 e A53 e as culturas-controle contendo apenas *L. innocua* ATCC 33090, em relação ao tempo de incubação.

A ação da aureocina A70 foi verificada partindo-se de uma suspensão bacteriana com DO_{600} de 0,8, no inicio do experimento, e chegando-se a uma DO_{600} de cerca de 0,6 ao final de 8 h de incubação, mostrando a diminuição da DO_{600} durante o experimento. Com estes resultados, verificamos que o modo de ação da aureocina A70 parece ser bactericida contra a estirpe de *L. innocua* ATCC 33090. Entretanto, esta Bac não parece promover uma lise celular acentuada.

A garviecina L1-5, produzida por *Lactococcus garviae*, também é um Bac que possui ação bactericida, porém não lítica. Villani *et al*. (2001) verificaram que a densidade óptica do controle (sem Bac) e as das suspensões celulares adicionadas da Bac permaneceram estáveis durante o experimento. Contudo, a contagem de células viáveis nas suspensões acrescidas da Bac diminuiu. Outras Bac também possuem ação bactericida sem serem bacteriolíticas. A Bac R1, quando exposta contra *Corynebacterium renale*, levou esta bactéria à morte, sendo o seu efeito rápido, porém sem proporcionar a lise celular (CRUPPER, GIES & IANDOLO, 1997). Outra Bac com ação bactericida é a propionicina T1, produzida pela estirpe de *Propionibacterium thoenii* T1, cujos experimentos demonstraram a ação bactericida que reduziu a contagem de células viáveis após 4 h de ação (FAYE *et al*., 2000).

Por outro lado, a ação da aureocina A53 mostrou-se completamente diferente. Também partindo de uma suspensão celular com DO_{600} de 0,8, quando a estirpe de *L. innocua* ATCC 33090 foi inoculada juntamente com a aureocina A53, a DO_{600} caiu drasticamente já nas quatro primeiras horas de incubação, alcançando o valor de 0,1. A DO_{600} ainda diminuiu nas 4 h finais do experimento, de modo que, ao final de 8 h de incubação, o valor de DO_{600} atingido foi de 0,04. Este fato indica uma ação bacteriolítica exercida pela aureocina A53. De fato, Netz, Bastos & Sahl (2002) verificaram que esta Bac matava mais de 90% das células sensíveis em poucos minutos e que havia lise celular, observada através da perda da turvação da cultura e pela coloração de Gram.

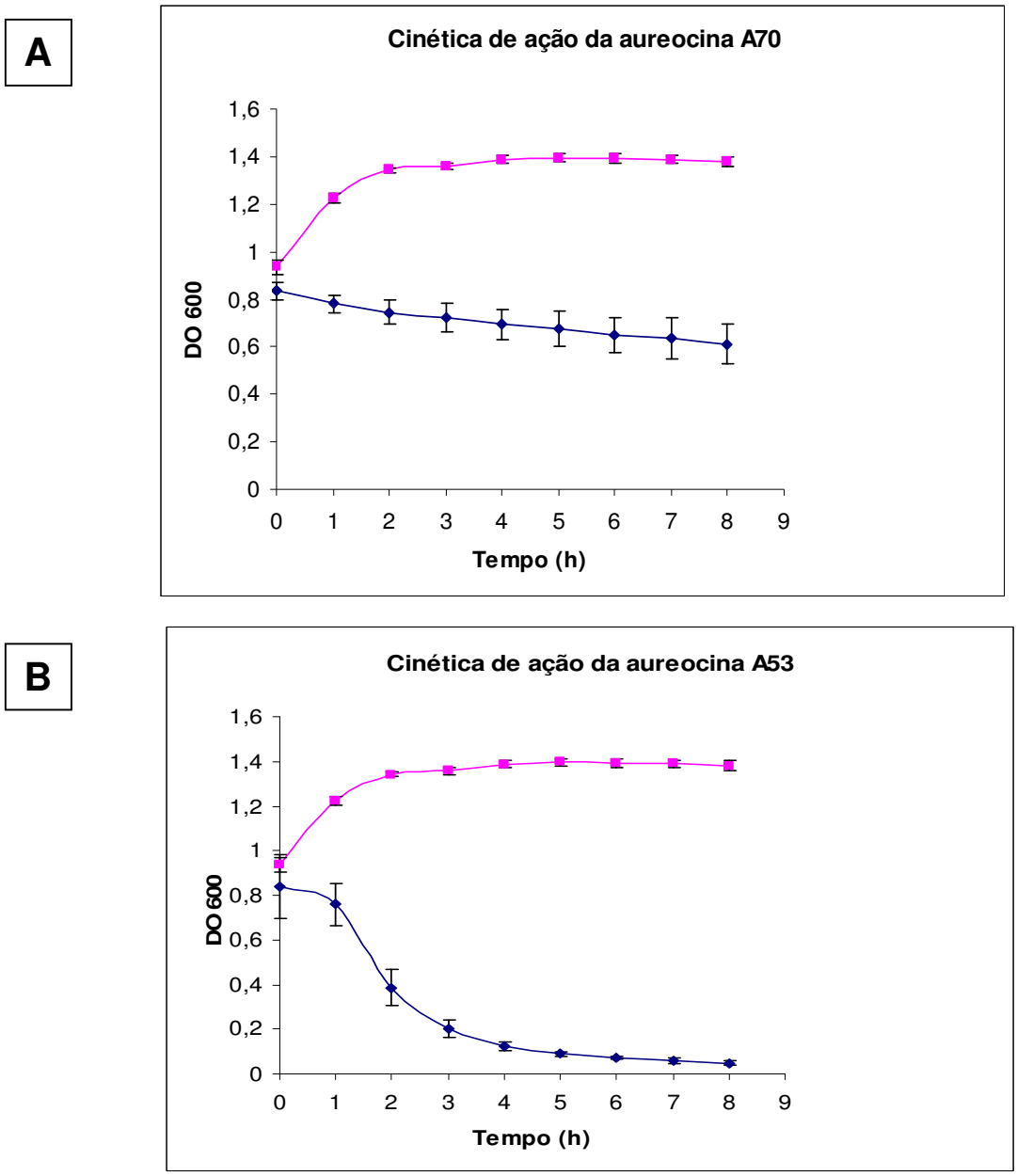

Figura 17: Cinética de ação das aureocinas A70 (**A**) e A53 (**B**) contra a estirpe *L. innocua* ATCC 33090. O símbolo ■ representa o controle do crescimento da estirpe de *L. innocua*, e o símbolo ● representa a *L. innocua* adicionada das aureocinas. Média de três experimentos independentes, sendo os desvios-padrão representados pelas barras.

Outras Bac também possuem ação bacteriolítica. Mortvedt-Abildgaard *et al.* (1995), estudando a ação da lactocina S, produzida pela estirpe de *Lactobacillus sake* L45, constataram que a ação bacteriolítica desta Bac ocorre apenas em valores de pH abaixo de 6,0. Bhunia *et al.*

(1991) verificaram que a pediocina AcH, produzida pela estirpe de *Pediococcus acidillactici* H, também é uma Bac com ação bacteriolítica contra a estirpe de *Leuconostoc mesenteroides* Ly. Motta *et al*. (2007), estudando a produção de uma SAM produzida pela estirpe de *Bacillus* spp. P34, isolada de um peixe da bacia amazônica, verificaram a sua ação bactericida/bacteriolítica contra as estirpes de *L. monocytogenes* ATCC7644 e *B. cereus* 8A, que promoveu a redução na contagem de células viáveis e na DO.

6.5 Avaliação da vida de prateleira e meia-vida das aureocinas A70 e A53

Este experimento foi realizado com o objetivo de se determinar a estabilidade das aureocinas A70 e A53 nas temperaturas de -20°C, 4°C e 25°C, ao longo de um período de um ano e cinco meses. Este tipo de experimento é de extrema importância quando se pensa na aplicação das aureocinas como biopreservativos de alimentos. O estudo da vida de prateleira das aureocinas foi realizado através da concentração das Bac presentes no sobrenadante da cultura microbiana, utilizando–se uma membrana de ultrafiltração.

O título inicial encontrado para a aureocina A70 foi de 3.200 UA/ml, enquanto que, para a aureocina A53 foi de 800 UA/ml, como mostra a figura 18.

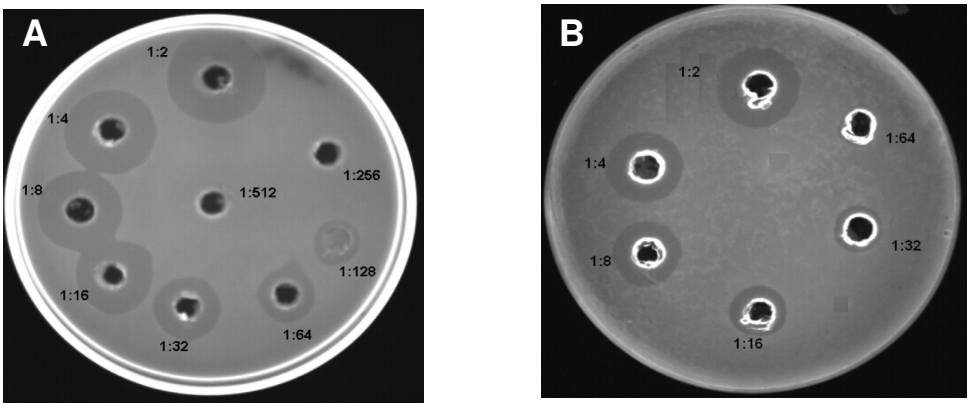

Figura 18: Titulação das aureocinas contra a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 no início do estudo da vida de prateleira; (A) aureocina A70 e (B) aureocina A53. A ação inibitória da aureocina A70 foi observada até a diluição de 1:128, enquanto que, para a aureocina A53, a ação inibitória foi observada até a diluição de 1:32.

O título inicial da aureocina A70 foi mantido, nas diferentes temperaturas, até a 4ª semana de armazenamento (figura 19 A). A partir da 8ª semana, houve uma diminuição do título da Bac a 25°C (1.600 UA/ml), ou seja, a meia-vida da aureocina A70, à temperatura de 25°C, foi de oito semanas. Nas 12ª e 16ª semanas, o título encontrado a 25°C foi de 800 UA/ml. A diminuição do título da Bac A70, nesta temperatura, continuou pelas semanas consecutivas, até a Bac não ser mais detectada após 72 semanas de experimento.

À temperatura de 4°C, a aureocina A70 manteve o mesmo título inicial até a 16ª semana, caindo pela metade na vigésima semana do experimento (meia-vida). Após 24 semanas, o título caiu novamente chegando a 800 UA/ml. O mesmo título foi observado com 48 semanas e, com 72 semanas, caiu novamente até 200 UA/ml.

Com relação à temperatura de -20°C, a meia-vida da aureocina A70 ocorreu no intervalo entre a 20ª e a 24ª semanas de armazenamento, uma vez que o título observado na 24ª semana foi quatro vezes menor do que o título inicial. Após este período, o título (800 UA/ml) manteve-se inalterado até o final da 72ª semana de experimento.

Com relação à aureocina A53 (figura 19 B), não houve mudança no título inicial da Bac nas 48 semanas do experimento, nas temperaturas de -20°C e 4°C. Com relação à temperatura de 25°C, a meia-vida foi observada já na quarta semana do experimento. Este comportamento manteve-se inalterado até o final das 72 semanas de experimento. A meia-vida da aureocina A53 a 4°C só foi detectada após 72 semanas de experimento. A queda do título da aureocina A53, indicando a sua meia-vida, não foi observada na temperatura de -20°C. Este fato revela uma grande estabilidade desta Bac nesta temperatura, durante o experimento.

Assim, os resultados obtidos mostram que a aureocina A53 é mais estável com relação à ação dos fatores temperatura de armazenamento e tempo associado do que a aureocina A70. Algumas mudanças no título das aureocinas ao longo do tempo, podem ser visualizadas na figura 20.

Morgan *et al*. (2001) avaliaram a atividade da solução da lacticina 3147 em água destilada sob diferentes temperaturas de armazenamento. Estes autores verificaram que esta Bac, quando dissolvida e estocada a -20°C, permanecia totalmente ativa após um período de nove meses. Contudo, quando esta Bac foi mantida a -20°C, sob a forma de pó, a sua atividade caiu 50 % (meia-vida) em cinco meses. O armazenamento do produto em pó promoveu a perda de 75 % da atividade desta Bac após cinco meses de armazenamento à temperatura ambiente. Por outro lado, quando esta Bac foi armazenada a 4°C, nenhuma diminuição da atividade desta Bac foi observada no mesmo período de tempo.

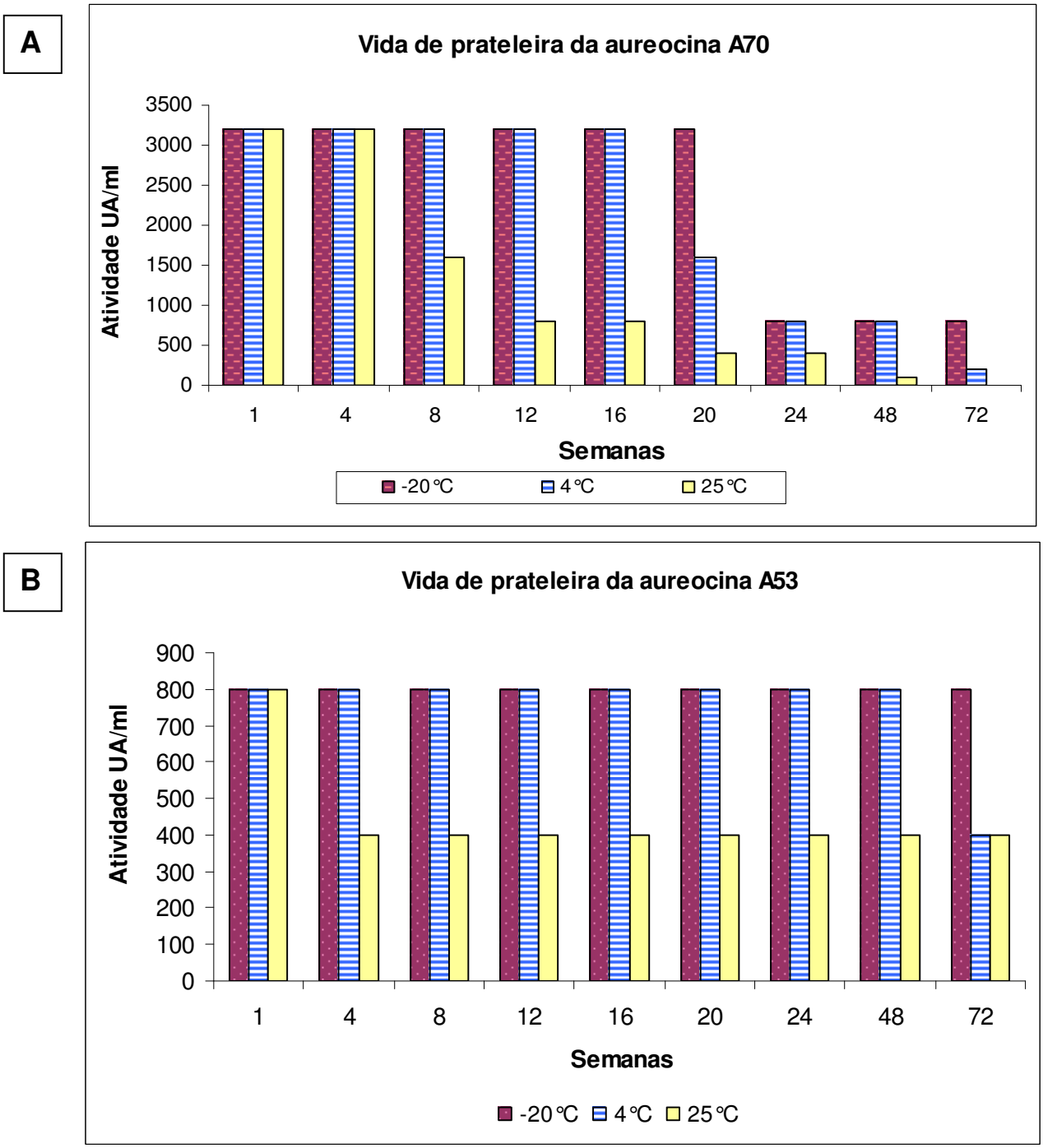

Figura 19: Histogramas da vida de prateleira das aureocinas A70 (A) e A53(B) às temperaturas de -20 °C, 4 °C e 25 °C, durante o período de 72 semanas..

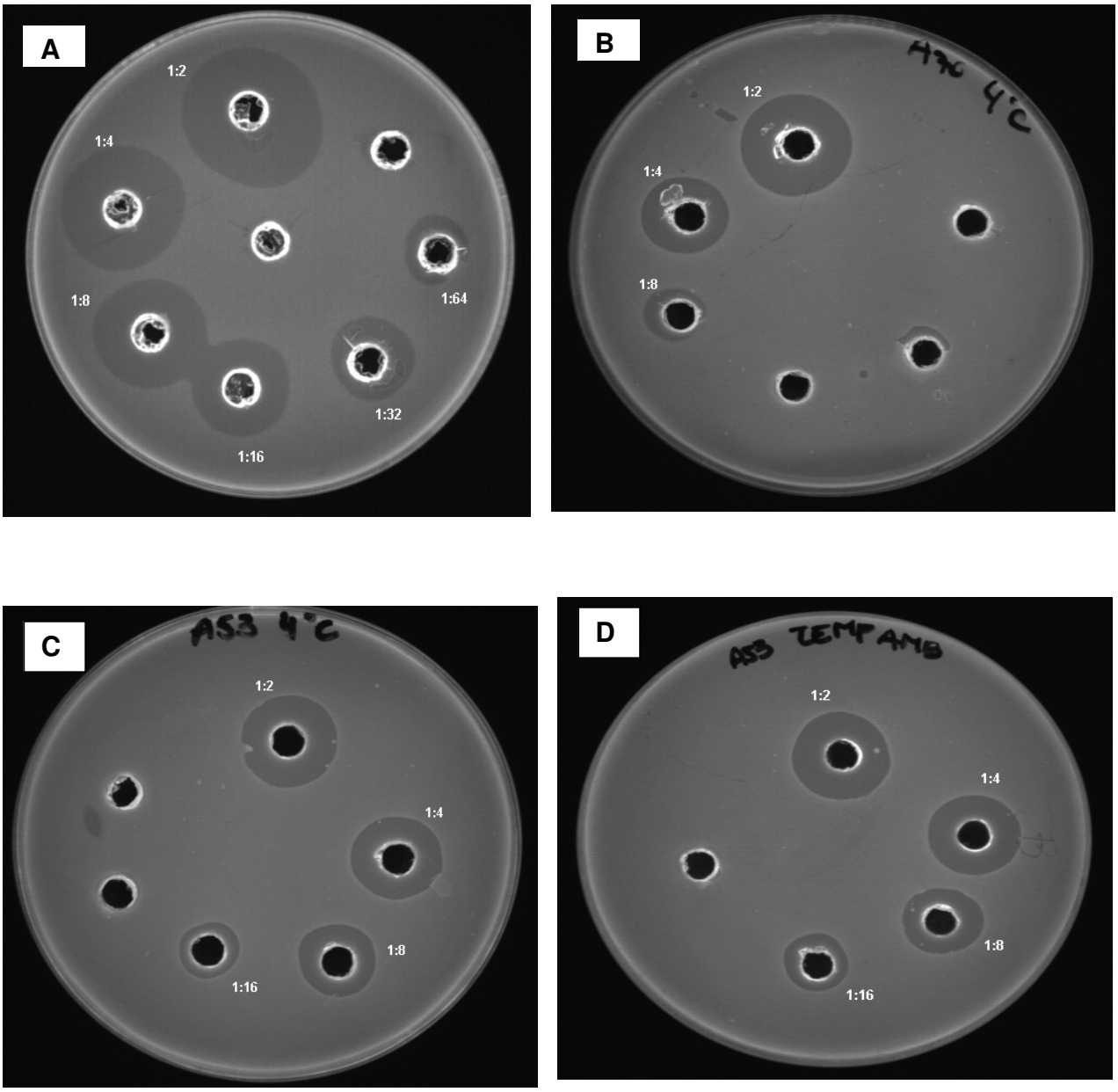

Figura 20: Mudança nos títulos (desaparecimento dos halos de inibição nas diferentes diluições em relação à primeira verificação) das aureocinas. **A** – aureocina A70 após dois meses a 25°C; **B** – aureocina A70 após um ano a 4°C; **C**- aureocina A53 após um ano a 4°C; **D** – aureocina A53 após um ano e cinco meses a 25°C.

Quando comparadas com a lacticina 3147, as aureocinas A70 e A53 armazenadas a -20°C permaneceram totalmente ativas, respectivamente, por cinco meses e por mais de um ano nesta temperatura. À temperatura de 4°C, a aureocina 70 permaneceu totalmente ativa até quatro meses de armazenamento, um tempo menor do que o observado para a lacticina 3147. Já a aureocina A53 permaneceu totalmente ativa por pelo menos um ano, nesta mesma temperatura. Com relação à temperatura de 25°C, a aureocina A70 apresentou-se muito mais sensível do que a lacticina 3147, perdendo 75 % da sua atividade já nos três primeiros meses de armazenamento. Já a aureocina A53 perdeu 50 % da sua atividade após um mês de armazenamento, porém, se mostrou mais estável que a lacticina 3147, mantendo o mesmo título até um ano e cinco meses.

Os resultados encontrados neste trabalho revelaram que as aureocinas A70 e A53 possuem uma ótima vida de prateleira e evidenciam a potencialidade das mesmas quando se pensa em sua aplicação como biopreservativos de alimentos. Entretanto, testes em alimentos serão necessários para a verificação do desempenho das aureocinas *in situ*. Fatores como ligação das Bac a componentes do alimento, tais como gordura ou partículas protéicas, inativação por proteases ou outros inibidores, entre outros, são os maiores obstáculos ao emprego de Bac em alimentos (SETTANNI & CORSETTI, 2008). Além das propriedades específicas de cada tipo de alimento poderem influenciar na atividade das aureocinas, uma avaliação da possível interferência das aureocinas nas propriedades organolépticas do alimento também é necessária.

6.6 Aprisionamento das aureocinas A70 e A53 em matriz da alginato/gelatina

A incorporação de agentes antimicrobianos diretamente em embalagens poliméricas vem atraindo cada vez mais o interesse de pesquisadores, pois permite à industria combinar as funções antimicrobianas com as funções de proteção ao alimento (GALVÉZ *et al*., 2007). Por isso, experimentos de aprisionamento das aureocinas A70 e A53 tiveram como objetivo verificar a possível incorporação e liberação destas Bac a partir de uma matriz de alginato e gelatina.

Os resultados encontrados nestes experimentos podem ser evidenciados na figura 21. A partir de uma matriz contendo 640 UA da aureocina A70, a inibição da estirpe indicadora *C.fimi* NCTC 7547, promovida pela seção de 1,5 cm^2, foi observada. A formação de uma zona de inibição de tamanho igual a 3,4 ± 0,2 cm^2 foi proporcionada pela ação da aureocina A70 contra este microrganismo, indicando que esta Bac foi liberada da matriz de alginato/gelatina. O

título da aureocina A70 na matriz de alginato/gelatina foi calculado através da medida da área da seção de material retirada em razão da área do material espalhado em placa de Petri (aproximadamente 20 cm^2). Este título foi de 48 UA.

Não foi observado halo de inibição proporcionado pela ação da aureocina A53 aprisionada à matriz de alginato/gelatina. Neste caso, a matriz possuía 320 UA da aureocina A53. O título da aureocina A53 na seção de 1,5 cm^2 da matriz de alginato/gelatina foi calculado da mesma maneira como realizada para a aureocina A70, e proporcionou um título de apenas 24 UA.

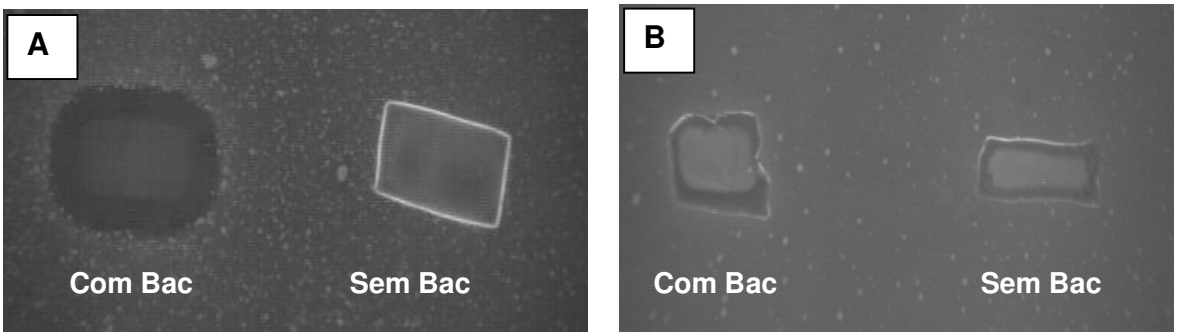

Figura 21: Verificação da inibição ou não da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 pela ação da aureocinas A70 (A) e A53 (B) aprisionadas em matriz de alginato/gelatina. Resultados encontrados em três experimentos independentes.

A não verificação do halo de inibição neste último caso pode ser devido ou ao baixo título do volume da aureocina A53 que foi incorporado à suspensão de alginato/gelatina, ou devido à retenção do peptídio na matriz. O único peptídio que compõe a aureocina A53 possui massa molecular de 6.012,5 Da, enquanto que a aureocina A70 é formada por quatro peptídios de massa molecular variando entre 2.954 e 3.086 Da. A maior massa molecular da aureocina A53 pode ter sido, portanto, um fator que contribuiu para a retenção da aureocina A53 na matriz de alginato/gelatina. Futuramente, a caracterização mais detalhada desses filmes pode vir a contribuir para o melhor entendimento das propriedades desse tipo de matriz com as aureocinas aprisionadas. Experimentos utilizando-se diferentes concentrações das aureocinas também devem ser realizados para elucidar tal questionamento. Estirpes como as do gênero *Listeria*, associadas com a contaminação e a deterioração de alimentos, deverão ser empregadas como indicadoras nestes testes para verificação da potencialidade de tal estratégia. Entretanto, nossos resultados, ainda que preliminares, abrem uma nova

possibilidade de aplicação das aureocinas, tanto no possível desenvolvimento de embalagens bioativas, quanto como uma forma de liberação controlada de drogas.

Dong, Wang & Du (2006), estudando as propriedades de filmes à base de alginato e gelatina, verificaram que filmes com estes constituintes possuem potencial de aplicação em sistemas de liberação controlada de drogas. Portanto, estando a aureocina A53 retida na matriz, a proposta de uma possível aplicação desta Bac como uma alternativa para a indústria farmacêutica no combate de certos tipos de infecções é apresentada. Uma vez que a aureocina A53 é sabidamente uma Bac resistente à ação de enzimas proteolíticas como a tripsina, esta Bac aprisionada em uma matriz poderia servir como agente terapêutico no combate de infecções estomacais. Contudo, estudos que avaliem a sua toxicidade em relação a células eucarióticas e a inibição de patógenos como *Helicobacter pylori*, causador de úlcera péptica, devem ser realizados.

Por outro lado, a liberação da aureocina A70 da matriz de alginato/gelatina nos revela que esta pode ser empregada, quando aprisionada em matriz de alginato 4% e gelatina 5%, como uma alternativa para o controle de microrganismos que promovam a contaminação e/ou a deterioração de alimentos, uma vez que esta Bac possui ação inibitória contra estirpes de *L. monocytogenes*, sendo este um patógeno associado a alimentos (CLEVELAND *et al*., 2001; GUINANE *et al*., 2005; MARCOS *et al*., 2007).

Marcos *et al*. (2007) utilizaram as enterocinas A e B, produzidas pela estirpe de *Enterococcus faecium* CTC492, para a formação de filmes biodegradáveis em matriz de alginato. A habilidade destas Bac, aprisionadas nesta matriz, de controlar o crescimento de *L. monocytogenes* em presunto cozido foi avaliada durante armazenamento sob temperatura de refrigeração. Estes autores verificaram que estes filmes contendo as Bac foram eficazes ao retardarem o crescimento de *L. monocytogenes*. Contudo, os filmes de alginato contendo uma alta concentração das Bac (2.000 UA/cm^2) proporcionaram os melhores resultados.

6.7 Adsorção das aureocinas A70 e A53 a material plástico utilizado na conservação de alimentos

Este teste foi realizado com o objetivo de se verificar a possibilidade das aureocinas A70 e A53 permanecerem adsorvidas a materiais plásticos, que poderiam estar em contato direto com a superfície de alimentos.

Partindo-se de uma solução de Bac semipurificada, o título encontrado contra a estirpe de *C. fimi* NCTC 7547 foi de 1.600 UA/ml, para a aureocina A53, e de 800 UA/ml, para a aureocina A70. O volume de 1 ml das soluções das aureocinas A70 e A53 foi colocado em sacos plásticos, juntamente com seções de plástico, e o conjunto foi armazenado por 48 h a 4°C. Após este período, as seções foram lavadas e secadas. Posteriormente, estas seções foram posicionadas em uma placa de Petri contendo a estirpe indicadora para verificação ou não da sua inibição. Os resultados deste experimento estão apresentados na figura 22.

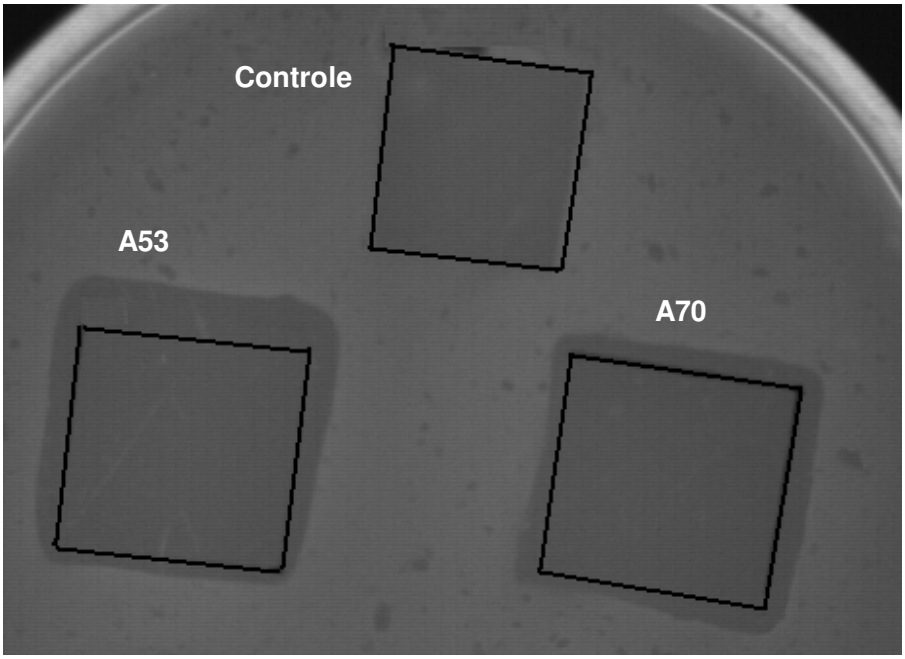

Figura 22: Inibição da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 pela ação das aureocinas A70 e A53 adsorvidas ao material plástico. A área marcada refere-se à dimensão do material plástico que gerou uma menor turvação do meio de cultura, como observado no controle.

Utilizando-se seções de 4 cm^2 do material plástico com a aureocina A53 adsorvida, observou-se a inibição da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 com a formação de zonas de inibição de 5,52 ± 0,7 cm^2, após três experimentos independentes. A aureocina A70 também se manteve adsorvida à superfície plástica (4 cm^2), promovendo zonas de inibição de 4,8 ± 0,3 cm^2 contra a mesma indicadora. Estes resultados mostram que ambas as aureocinas A70 e A53 permanecem adsorvidas à superfície plástica utilizada e ativas, podendo ser aplicadas em embalagens bioativas contendo este tipo de material.

Scannell *et al*. (2000b), estudando a possível adsorção da lacticina 3147 e da nisina a material de embalagens à base de celulose e a material plástico, observaram que a nisina se manteve adsorvida ao material de celulose e também ao material plástico. Por outro lado, a lacticina 3147 permaneceu adsorvida ao material de celulose, porém, não ficou adsorvida ao plástico. Estes autores postularam que tal fato pudesse ocorrer em razão da lacticina 3147 ser uma Bac de dois componentes e que a sua adsorção completa só poderia ocorrer se os dois peptídios estivessem ligados ao plástico. Este fato não ocorreu com a aureocina A70, que é formada por quatro peptídios, revelando que provavelmente todos os peptídios constituintes desta Bac permaneceram ligados à superfície do plástico.

Testes que verifiquem a ação das aureocinas adsorvidas a material plástico empregado em superfície de alimentos devem ser posteriomente realizados para se avaliar a eficácia deste tipo de estratégia como uma forma de conservação de alimentos, utilizando-se embalagens bioativas, no controle de microrganismos indesejáveis.

6.8 Conclusões

- O meio de cultura BHI, em relação ao meio YPD, promoveu as melhores condições para a produção das aureocinas A70 e A53.
- Em meio BHI, o máximo de produção das aureocinas A70 (1.600 UA/ml) e A53 (400 UA/ml) foi detectado com 8 e 6 h de crescimento da estirpe produtora, respectivamente.
- O máximo de produção das aureocinas A70 e A53 no meio de cultura YPD foi de apenas 200 UA/ml.
- Os rendimentos em relação ao consumo de glicose e produção de Bac foram de 80 UA/mg de glicose, para a estirpe A70, e de 20 UA/mg de glicose, para a estirpe A53, no meio de cultura BHI.
- Os rendimentos em relação ao consumo de glicose e produção de Bac foram de 10 UA/mg de glicose para ambas as estirpes produtoras de Bac no meio de cultura YPD.
- As produtividades em relação ao produto formado (Bac) foram de 200 UA/h e 25 UA/h para a estirpe A70 no meio BHI e YPD, respectivamente. As produtividades encontradas para a estirpe A53 foram de 50 UA/h e 25 UA/h nos meios de cultura BHI e YPD, respectivamente.
- A aureocina A70 parece ter ação bactericida contra a estirpe de *L. innocua* ATCC 33090, enquanto que a aureocina A53 parece ter ação bacteriolítica.

- A meia-vida da aureocina A70 foi verificada no intervalo entre a 20ª e a 24ª semanas de armazenamento a -20°C, na 20ª semana a 4°C e na 8ª semana a 25°C.
- A meia-vida da aureocina A53 foi verificada na 4 ª semana a 25°C e na 72 ª semana a 4°C e não foi observada quando armazenada a -20°C.
- A aureocina A70 promoveu a inibição da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC7547 quando aprisionada em matriz de alginato/gelatina, fato este que não ocorreu com a aureocina A53.
- As aureocinas A70 e A53 permaneceram adsorvidas a material plástico, inibindo a estirpe *C. fimi* NCTC 7547.

Parte 2

Detecção da produção de SAM por estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal

7. Materiais e Métodos

7.1 Estirpes bacterianas utilizadas

Vinte e uma estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal, cedidas gentilmente pela Dra. Maria Aparecida V. P. Britto (EMBRAPA/Gado de Leite – Juiz de Fora, MG), foram investigadas quanto à produção de substância antimicrobiana (SAM). Dez estirpes têm como origem leite bovino, sendo oito provenientes do estado de Minas Gerais e duas do estado do Rio Grande do Sul. Duas estirpes de origem bovina, duas estirpes de origem suína e sete estirpes de origem canina são provenientes do estado do Rio Grande do Sul.

As estirpes de *S. epidermidis* produtoras das Bac epilancina K7, Pep5, epidermina e epicidina 280, além das estirpes de *S. aureus* produtoras das aureocinas A70 e A53, foram empregadas neste trabalho nos testes de imunidade cruzada.

A estirpe *C. fimi* NCTC 7547 foi utilizada nos experimentos para verificação da produção de SAM e nos testes de sensibilidade a enzimas proteolíticas e ao NaOH.

As estirpes de *L. innocua* ATCC 33090*, L. monocytogenes* 11LM e L1/2A, *Bacillus coagulans* UH e *M. luteus* ATCC 4698 foram utilizadas nos experimentos para a determinação do espectro de ação.

7.2 Condições de cultivo

As estirpes de *Staphylococcus* spp. foram crescidas em 5 ml de meio BHI ou TSB a 37ºC por 18 h, e, quando necessário, foi utilizado ágar nas concentrações de 1,5% (p/v), para meio sólido, e 0,7% (p/v), para meio semi-sólido. As estirpes de *Staphylococcus* spp. foram estocadas em meio TSB com glicerol 40% (v/v), a -20°C.

O meio BHI foi utilizado para o teste de produção de substâncias antimicrobianas, enquanto que o meio TSB foi utilizado para os demais testes.

As estirpes *C. fimi* NCTC7547, *B. coagulans* UH e as estirpes do gênero *Listeria* foram crescidas em meio BHI a 37°C por 18 h.

7.3 Outros materiais

- cloreto de cálcio (Merck®)
- cloreto de sódio (Reagen®)

- extrato de carne (Difco®)
- fosfato de potássio monobásico (Reagen®)
- fosfato de sódio dibásico (Reagen®)
- L-pirroglutamil-ß-naftilamina (Sigma®)
- lisostafina comercial (Sigma®)
- lisozima (Sigma®)
- plasma de coelho (Biobrás®)
- peptona (Vetec®)
- pronase (Sigma®)
- protease XXIII (Sigma®)
- proteinase K (BMB®)
- sulfato de amônio (Merck®)
- Tris (Promega®)
- tripsina (Sigma®)
- uréia (Reagen®)

7.4 Produção de substâncias antimicrobianas (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990)

As estirpes de *Staphylococcus* spp. foram crescidas em 3 ml de meio BHI a 37°C por 18 h; 5 µl de cada cultura foram inoculados na forma de pontos na superfície de uma placa contendo meio BHI. Após um período de 18 h a 37ºC, as bactérias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio por 30 min e, sobre a placa, foram vertidos 3 ml de meio BHI semi-sólido acrescido de alíquotas de 0,3 ml da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 (previamente crescida por 48 h a 37°C, em 3 ml de meio BHI). As placas foram reincubadas a 37ºC por 18 h e a produção de SAM foi verificada pelas zonas de inibição ao redor dos pontos de crescimento das estirpes produtoras. Zonas de inibição iguais ou maiores do que 15 mm foram consideradas como possíveis indicadoras de produção de Bac pelas estirpes produtoras.

7.5 Identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM a partir de testes bioquímicos convencionais (KLOOS & BANNERMAN, 1994)

7.5.1 Teste de produção de coagulase

Cinco colônias isoladas de cada estirpe, crescida em meio TSA [meio TSB acrescido de ágar a 1,5% (p/v)] por 48 h a 37°C, foram inoculadas em 0,2 ml de plasma de coelho (Biobrás) e incubadas a 37°C, em banho-maria por 4 h. Em caso de amostras negativas, as amostras permaneceram incubadas por 24 ou até 48 h, para se confirmar o resultado. No experimento, três controles foram utilizados:

- 1 gota de $CaCl_2$ 5% (p/v) foi adicionada a 0,2 ml de plasma de coelho e incubada nas mesmas condições acima, para se confirmar a coagulação;
- a estirpe *S. aureus* A70, como controle positivo;
- a estirpe *S. epidermidis* 5, como controle negativo.

7.5.2 Produção da enzima pirrolidonil-arilamidase (PYR)

Três a cinco colônias isoladas de cada estirpe, crescida em meio TSA por 48 h a 37°C, foram inoculadas em 0,2 ml do caldo teste PYR (caldo TSB acrescido de 0,01% de L-pirroglutamil-ß-naftilamina) e incubadas a 35°C, em banho-maria por 4 h. Após o período de incubação, foi adicionada uma gota da solução reveladora (dimetilaminocinamaldeído 1% em HCl 10%) a cada tudo. A observação da coloração rosa ou púrpura após 10 min indicou uma reação positiva para o teste. A reação negativa ocorreu sem alteração da cor do meio. Os seguintes controles foram utilizados:

- uma estirpe de *Enterococcus* spp., como controle positivo;
- a estirpe *S. epidermidis* 5, como controle negativo.

7.5.3 Hidrólise da Uréia

A partir de uma suspensão bacteriana em 5 ml de meio líquido BHI, com incubação a 37°C por 18 a 24 h, sob agitação, duas gotas foram inoculadas em 3 ml de caldo uréia de Rustigian & Stuart's – pH 6,8 (9,1 g de KH_2PO_4, 9,5 g de Na_2HPO_4, 0,1 g de extrato de levedura, 0,01 g de vermelho de fenol e 1l de água destilada) acrescido de 20% (p/v) de uréia (Reagen). Posteriormente, o material foi incubado a 37°C por 48 h. O resultado positivo foi observado através da mudança da coloração do meio para rosa-vermelho. O resultado negativo não mostrou alteração da coloração do meio. Os controles utilizados neste teste foram:

- uma estirpe do gênero *Proteus* spp., como controle positivo;
- uma estirpe de *Escherichia coli*, como controle negativo.

7.5.4 Fermentação de carboidratos

A partir de uma suspensão bacteriana crescida em meio líquido por 18 a 24 h de incubação a 37°C, sob agitação, uma gota foi inoculada em 2,5 ml de caldo base vermelho de fenol pH 7,4 (12 g de peptona; 1,2 g de extrato de carne; 6,0 g de NaCl; 0,022 g de vermelho de fenol e 1 l de água destilada), acrescido de 0,5 ml da solução de açúcar a 1% (p/v) em função do volume do teste (3,0 ml). Uma posterior incubação do material por 72 h foi feita, porém a leitura foi realizada em 24, 48 e 72 h de incubação. Os açúcares utilizados neste experimento foram manitol, lactose e maltose. O resultado positivo foi dado pela mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, mostrando a acidificação do meio. O resultado negativo não mostrou mudança da coloração do meio vermelho-rosa. A coloração laranja foi lida como resultado duvidoso e o teste foi repetido. Os controles utilizados nestes testes foram:

- a estirpe *S. aureus* A70, como controle positivo para os testes com o manitol, a lactose e a maltose;
- a estirpe *S. epidermidis* 5, como controle negativo para os testes com o manitol e a lactose. O controle negativo para o teste com a maltose foi uma estirpe de *Staphylococcus carnosus*.

7.5.5 Utilização do sistema comercial API-Staph

Quando a identificação das estirpes não foi possível através dos testes bioquímicos, o sistema comercial API-Staph (BioMérieux) foi utilizado, de acordo com as recomendações do fabricante.

7.6 Sensibilidade das SAM a enzimas proteolíticas (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990)

Este teste teve por objetivo verificar a natureza protéica das substâncias antimicrobianas produzidas pelas estirpes consideradas SAM^+, para se poder, assim, classificá-las como Bac, uma vez que, para ser uma Bac, a substância precisa ter um componente protéico biologicamente ativo.

Primeiramente, as bactérias foram crescidas em 5 ml de meio TSB e incubadas a 37ºC por 18 h. Em seguida, foram aplicados 10 µl de cada cultura em placas com meio BHI. As placas foram reincubadas nas mesmas condições anteriores, e, em seguida, as bactérias foram mortas com vapores de clorofórmio por 30 min. Ao redor de cada crescimento, foram aplicados 40 µl das enzimas proteolíticas tripsina (Sigma), proteinase K (BMB), pronase (Sigma) e protease XXIII (Sigma), preparadas em tampão (Tris 0,05 M, pH 8,0; $CaCl_2$ 0,01 M), na concentração de 1 mg/ml. As placas foram incubadas a 37ºC por 4 h e, em seguida, foram vertidos 3 ml de meio BHI semi-sólido acrescido de 0,3 ml da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 (previamente crescida por 48 h a 37ºC, em 3 ml de meio BHI). As placas foram reincubadas a 37ºC por 18 h e a ação ou não das enzimas proteolíticas sobre as SAM foi indicada pela ausência ou presença de zonas de inibição.

7.7 Sensibilidade das SAM ao NaOH 0,2N

Este teste foi realizado como descrito no item 7.6, apenas substituindo-se a enzima por 40 µl de NaOH 0,2 N.

O objetivo deste teste foi verificar se a inibição produzida pela SAM sobre as estirpes indicadoras não se deve a ácidos decorrentes do metabolismo da bactéria.

7.8 Testes de imunidade cruzada

As estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal foram empregadas como produtoras e/ou indicadoras no teste da imunidade cruzada com as estirpes de *S. epidermidis* e *S. aureus* produtoras de Bac. Nestes experimentos, foram testadas as aureocinas A70 e A53, produzidas por *S. aureus,* e as Bac Pep5, epidermina, epilancina K7 e epicidina 280, produzidas por *S. epidermidis*. Estes testes foram feitos conforme descrito no item 7.4, sendo que todas as estirpes, quando utilizadas como indicadoras, foram diluídas até 10^{-2} em salina estéril.

Os testes para análise de imunidade cruzada foram realizados para se verificar se as SAM produzidas pelas estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal são diferentes das estafilococcinas já descritas na literatura, uma vez que temos como objetivo a procura por novas Bac com potencial de aplicação biotecnológica. Estes experimentos baseiam-se no fato das estirpes produtoras de Bac possuírem, além dos genes codificadores da produção da Bac, genes de imunidade à Bac produzida. Geralmente, a imunidade é específica para a Bac cognata (JACK, TAGG & RAY, 1995). Estirpes que produzem Bac idênticas, ou mesmo similares, apresentam imunidade cruzada. Como exemplo, temos as estirpes produtoras das Bac Pep5 e epicidina 280, que apresentam imunidade cruzada, uma vez que as Bac possuem 75% de similaridade entre as seqüências de ácidos aminados (HEIDRICH *et al*., 1998). Desse modo, a presença de imunidade cruzada entre estirpes produtoras de Bac é um indício de que as referidas Bac são similares ou relacionadas (ENNAHAR *et al*., 2000; NASCIMENTO *et al*., 2004).

7.9 Extração de DNA plasmidial das estirpes SAM$^+$ (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al*., 1990)

Primeiramente, as estirpes foram crescidas em 3 ml de meio TSB e incubadas por 18 h a 37ºC. As culturas foram então centrifugadas a 10.000 rpm (microcentrífuga Incibrás, modelo Spin III) por 5 min e lavadas em 400 µl de tampão TE (Tris/HCl 10 mM; EDTA 1mM; pH 7,8). Após esta lavagem, as células foram suspensas em 400 µl de tampão de lise [sacarose 25% (p/v); Tris /HCl 50mM, pH7,8; EDTA 40mM, pH7,5; NaCl 50mM]. Foram adicionados 5 µl de lisostafina comercial (Sigma, 1mg/ml, preparada em tampão TE) e 10 µl de lisozima (Sigma, 10 mg/ml, preparada em água bidestilada). A suspensão foi incubada a 37ºC por 1 h. Depois do tempo decorrido, foram adicionados 50 µl de pronase (Sigma, 10 mg/ml, preparada em água

bidestilada) e as suspensões foram reincubadas a 37ºC por 10 min. Após este período, foram adicionados 100 µl de SDS a 10% (p/v), preparado em água bidestilada. A preparação foi novamente incubada a 37ºC por 10 min. Em seguida, a preparação foi incubada a 65ºC por 5 min e, depois, foram adicionados 60 µl de KCl 4M. A preparação foi imediatamente transferida para o gelo, onde foi mantida por 20 min. Após este período, a preparação foi centrifugada a 12.100 x*g* por 20 min. O sobrenadante foi coletado e o DNA precipitado com dois volumes de etanol gelado, após a adição de 1/9 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 7,0, ficando por 18 h a -20º C. Após este período, as preparações foram centrifugadas por 30 min a 17.300 x*g*, a 4º C. O DNA foi então dissolvido em 50 µl de tampão TE e estocado a 4ºC, até o momento do uso.

7.10 Eletroforese de DNA em gel de agarose (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989)

Os géis de agarose a 0,7% (p/v), preparados em tampão TAE 1X (Tris/acetato 40 mM, EDTA 0,001M; pH 8,4), foram empregados para a visualização dos plasmídios. Utilizou-se 10 µl da preparação de DNA acrescidos de 5 µl de corante para eletroforese [glicerol 50% (v/v); azul de bromofenol 0,02% (p/v); xilenocianol 0,02% (p/v); EDTA 10 mM, pH7,5]. Os géis foram submetidos à eletroforese horizontal, a 80 V por 8 h, em tampão TAE 1X. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídio (1 µg/ml), visualizados em aparelho transiluminador de luz U.V. (Vilber Lourmat, modelo TF-20-M) e fotografados (máquina Minolta SRT 100x) com filme Tmax 100 (Kodak).

7.11 Determinação do espectro de ação da Bac 3682

A estirpe 3682 foi crescida em 5 ml de meio BHI a 37°C por 18 h; 5 µl dessa cultura foram inoculados na forma de pontos na superfície de uma placa contendo meio BHI. Após o período de 18 h a 37°C, a bactéria foi morta por exposição a vapores de clorofórmio por 30 min e, sobre a placa, foram vertidos 3 ml de meio BHI semi-sólido acrescido de 0,3 ml das culturas das estirpes indicadoras indicadas no item 7.1. Quando as estirpes do gênero *Listeria* foram empregadas, estas foram diluídas até 10^{-2} em salina estéril, antes de serem adicionadas ao meio semi-sólido. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 h e, após esse período, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos.

7.12 Purificação da Bac 3682

7.12.1 Precipitação com sulfato de amônio

Primeiramente, a estirpe 3682 foi crescida em 15 ml de meio BHI a 37°C, por 18 h. Em seguida, 10 ml da cultura foram inoculados em 1 l de meio de cultura BHI e uma nova incubação a 37°C por 24 h foi realizada sob agitação (200 rpm). Posteriormente, este material foi centrifugado a 16.300 x*g,* por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi então coletado e precipitado com sulfato de amônio a 70 % de saturação, sendo mantido a 4°C por 3 h e meia, sob agitação. Decorrido esse tempo, uma nova centrifugação foi realizada a 23.300 x *g*, por 40 min a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e o sedimento foi suspenso em 100 ml de água Milli-Q estéril. A Bac presente no sobrenadante foi titulada (UA/ml) através do método de titulação em microplacas de poliestireno (descrito no item 4.8.2), após esterilização por meio de filtração (membranas Millipore com poros de 0,22 µm).

7.12.2 Cromatografia de troca catiônica

Em uma coluna de vidro "Econo Collumn" de dimensões de 2,5 x 20 cm (Bio-Rad), foram aplicados 10 ml da resina "SP Sepharose Fast Flow" (Amersham Biosciences). A coluna então foi lavada com água Milli-Q estéril (quatro vezes o volume total da coluna) e, em seguida, equilibrada com 30 ml de ácido acético a 10 mM.

O pH do sobrenadante contendo a Bac 3682 foi ajustado até o valor de 2,0 pela adição de HCl 6M. Em seguida, o mesmo foi submetido a uma centrifugação a 23.300 x*g* , por 15 min a 4°C, e então aplicado na coluna. A coluna foi, então, lavada com 50 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,8 e, posteriormente, lavada com 30 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,8. Uma nova lavagem da coluna foi realizada com 20 ml de NaCl 0,1 M. A Bac 3682 foi então eluída da coluna através de três lavagens consecutivas com 10 ml de NaCl 0,5 M. A Bac presente nas frações referentes ao NaCl 0,5 M foi então titulada pelo método de diluições em microplacas (descrito no item 4.8.2.), após esterilização por meio de filtração (filtros Millipore com poros de 0,22 µm).

7.12.3 HPLC de fase reversa

A purificação final da Bac 3682 foi realizada através de HPLC de fase reversa, usando-se, consecutivamente, a coluna "Resource RPC3" (GE Healthcare) e, duas vezes, a coluna "Resource Sephasil Peptide C_8" (Pharmacia Biotech). O cromatógrafo utilizado para a análise foi o Äkta Purifier (Pharmacia Biotech), juntamente com o programa "Unicom Analysis version 2.30" (Pharmacia Biotech). As colunas foram equilibradas com TFA 0,1% (Merck) em água (v/v). A eluição do peptídio foi realizada empregando-se diferentes gradientes contendo uma mistura de isopropanol (Merck) e água, ambos adicionados de TFA 0,1% (v/v), que variaram em função da coluna utilizada. A eluição do peptídio foi registrada pela DO_{214} . A Bac presente nas diferentes frações colhidas foi titulada pelo método das diluições em microplacas, como descrito no item 4.8.2.

Esta etapa foi realizada no "Laboratory of Microbial Gene Technology" da "Norwegian University of Life Sciences".

7.12.4 Espectrometria de massa

Os espectros de massa foram analisados na "Norwegian University of Life Sciences", através do instrumento "Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics), no modo "positive reflectron" e com uma voltagem de aceleração de 25 kV e uma "delayed extraction" (PIE) de 40 ns. Todos os espectros foram calibrados externamente usando-se o padrão de calibração de peptídios do fabricante (Bruker Daltonics).

8. Resultados, Discussão e Conclusões

8.1 Produção de substâncias antimicrobianas

Partindo-se de uma amostragem de 21 estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de diferentes fontes animais (bovina, suína e canina), apenas quatro estirpes (19,0%) foram produtoras de SAM, apresentando atividade inibitória contra a estirpe de *C. fimi* NCTC 7547. Para a maioria das estirpes SAM$^+$, a média dos halos de inibição ficou em torno de 27 mm, como demonstrado na figura 23.

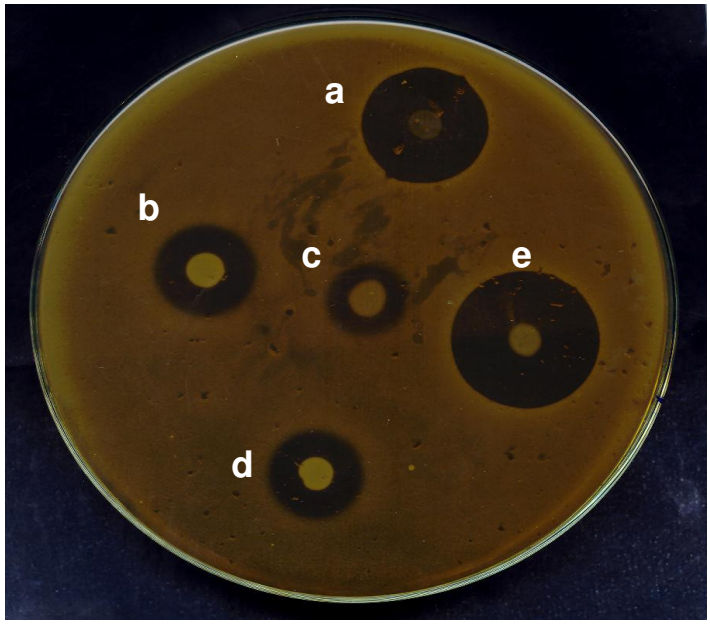

Figura 23: Detecção da produção de substâncias antimicrobianas. A estirpe *C. fimi* NCTC 7547 foi utilizada como indicadora. As estirpes SAM$^+$ de *Staphylococcus* spp. estão representadas como: *a*, 3682; *b*, 3790; *c*, 5358; *d*, 5362. A estirpe *S. aureus* A70 foi utilizada como controle positivo e está representada pela letra *e*.

A freqüência de estirpes produtoras de SAM mostrou-se baixa, como a encontrada em alguns dos trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório, utilizando estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos e de gado sadio, onde se observaram freqüências de detecção de estirpes SAM$^+$ de 8,6% e 8,7%, respectivamente (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990;

OLIVEIRA *et al.*, 1998b). Baixa freqüência também foi encontrada por Nascimento *et al.* (2005), onde estes autores verificaram que apenas 6,4% das estirpes de SCN envolvidas em casos de mastite bovina se mostraram produtoras de SAM. Freqüências maiores foram encontradas em estirpes de *S. aureus* isoladas de casos clínicos (32,5%) (GAMON *et al.*, 1999) e de vacas sofrendo de mastite subclínica (24%) (NASCIMENTO *et al.*, 2002).

A produção de Bac representa, para a estirpe produtora, uma vantagem sobre organismos competitivos existentes no mesmo nicho ecológico (JACK, TAGG & RAY, 1995; BASTOS *et al.*, *in press*).

8.2 Identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM

Das quatro estirpes de *Staphylococcus* spp., duas foram identificadas como *S. intermedius*, uma como *S. hyicus* e uma como *S. epidermidis*. Os resultados desta identificação estão apresentados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Resultados dos testes bioquímicos para a identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal produtoras de SAM.

Estirpes	Testes Bioquímicos					
	Coagulase	**PYR**	**Urease**	**Manitol**	**Maltose**	**Lactose**
3682	+	-	-	-	-	+
3790	-	-	-	-	-	+
5358	+	+	+	-	+	+
5362	+	+	+	-	+	+

(+) produção das enzimas ou fermentação dos açúcares; (-) não produção das enzimas ou não fermentação dos açúcares.

Os resultados encontrados com a utilização do sistema comercial API-Staph confirmaram a identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal, obtida através dos testes bioquímicos.

Tabela 9: Identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM.

Estirpes	Identificação	Origem
3682	*Staphylococcus hyicus*	Leite Bovino
3790	*Staphylococcus epidermidis*	Leite bovino
5358	*Staphylococcus intermedius*	Canina
5362	*Staphylococcus intermedius*	Canina

De acordo com a identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM, três produziram a enzima coagulase. Das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-positivas, uma foi identificada como *S. hyicus*, sendo esta isolada de leite bovino. Esta espécie causa epidermatite exudativa em porcos, mas vem sendo relacionada também com casos de poliartrite séptica em porcos e gado (FUDABA *et al.*, 2005; NISHIFUJI, SUGAI & AMAGAI, 2008). Em humanos, o seu isolamento já foi descrito em casos de bacteriemia polimicrobiana (BEN-AMI *et al.*, 2003).

Duas estirpes foram identificadas como *S. intermedius* e ambas foram isoladas de cães. Esta é uma espécie freqüentemente isolada de cães sadios e doentes, além de vários outros carnívoros, cavalos e aves (BECKER *et al.*, 2001). Em humanos, esta espécie é raramente encontrada, com freqüência descrita de 0,05% (MAHOUDEAU *et al.*, 1997). Infecções em humanos causadas por esta espécie estão geralmente associadas a mordidas de cães (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

A estirpe de *S. epidermidis* (isolada de leite bovino), também identificada por nós, é uma espécie de SCN de grande importância por ser um patógeno causador de vários tipos de infecções humanas, como bacteriemia, infecções oculares, infecções causadas pelo uso de cateteres, entre outros tipos (ARCHER, 2000; PEACOCK, 2007; BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Entre os SCN, os *S. epidermidis* são também os principais causadores de mastite, tanto bovina quanto ovina, devido a sua capacidade de aderência ao tecido mamário (BERGONIER *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos por nós reafirmam os descritos anteriormente com relação à diversidade de espécies de *Staphylococcus* spp. encontradas nas diferentes fontes das estirpes envolvidas neste estudo.

8.3 Sensibilidade das SAM a enzimas proteolíticas e ao NaOH 0,2 N

Estes testes foram realizados para se verificar se as substâncias produzidas pelos *Staphylococcus* spp. SAM^+ são mesmo Bac, ou se a inibição da estirpe indicadora é devido à produção de algum ácido resultante do metabolismo celular. De maneira geral, todas as SAM (com exceção da produzida pela estirpe 3682) mostraram-se sensíveis a pelo menos uma das quatro enzimas proteolíticas testadas, indicando a natureza protéica dessas SAM, sugerindo que as mesmas sejam Bac (tabela 10).

As SAM produzidas por todas estirpes foram resistentes à protease e à tripsina. A estirpe 5358 foi a única cuja SAM foi sensível à pronase. As SAM produzidas pelas estirpes 3790 e 5362 apresentaram-se sensíveis à proteinase K.

A SAM produzida pela estirpe 3682 não se mostrou sensível a nenhuma das enzimas proteolíticas, indicando que a substância antimicrobiana produzida por esta estirpe não seja uma Bac típica.

Nenhuma SAM produzida pelas estirpes apresentou-se sensível ao NaOH.

Tabela 10: Testes de sensibilidade das SAM a enzimas proteolíticas e ao NaOH 0,2N

Estirpes	**Tratamento com**				
	Proteinase K	**Pronase**	**Tripsina**	**Protease**	**NaOH 0,2N**
3682	R	R	R	R	R
3790	S	R	R	R	R
5358	R	S	R	R	R
5362	S	R	R	R	R

R- Resistente, S- Sensível. Cada teste foi realizado pelo menos duas vezes.

A natureza protéica de quase todas as SAM pôde ser confirmada através da inativação dessas substâncias por proteases (TAGG, DAJANI & WANNAMAKER, 1976; JACK, TAGG & RAY, 1995). A resistência da SAM produzida pela estirpe 3682 a proteases não descarta a possibilidade de que esta seja uma substância do tipo Bac. Esta característica de resistência a enzimas proteolíticas, embora infreqüente, já foi descrita em outras Bac, como é o caso da aureocina A53, caracterizada pelo nosso grupo (GIAMBIAGI-deMARVAL *et al.*, 1990; NETZ *et*

al., 2002). A ausência da sensibilidade dessas substâncias ao tratamento com NaOH descartou a possibilidade de inibição por ácidos do metabolismo microbiano. Desta forma, as SAM produzidas pela maioria das estirpes podem ser consideradas como Bac típicas, podendo ser denominadas estafilococcinas.

8.4 Análise do perfil de DNA plasmidial das estirpes SAM$^+$

O resultado obtido após a extração de DNA plasmidial das estirpes SAM$^+$ e análise em eletroforese e pode ser visualizado através da figura 24.

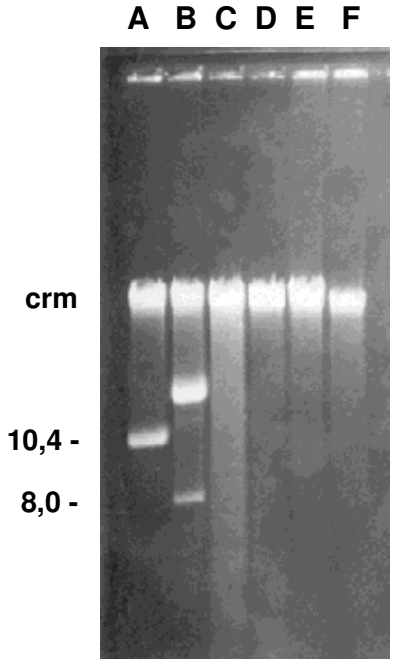

Figura 24: Eletroforese do DNA plasmidial das quatro estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM em gel de agarose 0,7% (p/v), a 80 V por 8 h em tampão TAE. A, A53; B, A70; C, 3682; D, 3790; E, 5358; F, 5362. O tamanho dos plasmídios (forma SC) usados como padrões está indicado à esquerda, em kb. Crm, restos de DNA cromossômico; SC, super-hélice.

A análise de DNA plasmidial revelou a ausência de formas plasmidiais em todas as quatro estirpes de *Staphylococcus* spp., o que sugere que a Bac esteja codificada no

cromossomo bacteriano. Este fato não ocorre com freqüência entre as bactérias Gram-positivas, entretanto já foi descrito para a estirpe de *S. epidermidis* K7, produtora da epilancina K7 (van de KAMP *et al.*, 1995a).

8.5 Ação das Bac produzidas por *S. aureus* e *S. epidermidis* sobre as estirpes de *Staphylococcus* spp.

As aureocinas A70 e A53, produzidas por *S. aureus*, e as Bac Pep 5, epidermina epilancina K7 e epicidina 280, produzidas por *S. epidermidis*, foram testadas por serem Bac já estudadas e caracterizadas. Com isso, verificamos o potencial de inibição de cada uma delas contra as estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM. Havendo inibição, isto indica ausência de imunidade cruzada.

A tabela 11 mostra as estirpes de *Staphylococcus* spp. que foram inibidas pelas Bac produzidas pelas estirpes de *S.epidermidis* e de *S. aureus*. As aureocinas A70 e A53 inibiram 50% e 25 % das estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal, respectivamente. Com relação às Bac produzidas por *S. epidermidis*, a epidermina inibiu 100%, a epilancina K7 e a Pep 5 inibiram 50% das estirpes de *Staphylococcus* spp., enquanto que a epicidina 280 não inibiu nenhuma estirpe.

Tabela 11: Ação das Bac produzidas por *S. aureus* e *S. epidermidis* contra as estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal

Produtoras	**Estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal**			
	3682	**3790**	**5358**	**5362**
A53	+	-	-	-
A70	+	-	-	+
Pep5	-	-	+	+
Epidermina	+	+	+	+
Epicidina 280	-	-	-	-
Epilancina K7	-	-	+	+

Sinal de (+) significa inibição; (-) não inibição da estirpe indicadora.

8.6 Ação das SAM produzidas pelas estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal sobre as estirpes de *S. epidermidis* e de *S. aureus* produtoras de Bac

A estirpe 3682, identificada como *S. hyicus,* inibiu todas as estirpes de *S. aureus* e quase todas de *S. epidermidis* produtoras de Bac (83,3%), com exceção da estirpe produtora da epidermina. Todas as outras estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal não inibiram nenhuma das estirpes de *S. epidermidis* e de *S. aureus* produtoras de Bac, como podemos observar na tabela 12.

Tabela 12: Ação das SAM produzidas pelas estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal sobre as estirpes de *S. epidermidis* e de *S. aureus* produtoras de Bac

Produtoras	**Estafilococcinas produzidas por *S. epidermidis* e por *S. aureus***					
	A53	**A70**	**Pep5**	**Epidermina**	**Epicidina 280**	**Epilancina K7**
3682	+	+	+	-	+	+
3790	-	-	-	-	-	-
5358	-	-	-	-	-	-
5362	-	-	-	-	-	-

Sinal de (+) significa inibição; (-) não inibição da estirpe indicadora.

Uma síntese dos resultados dos testes de imunidade cruzada entre as estirpes está demonstrada na tabela 13.

Tabela 13: Síntese dos resultados obtidos com os testes de imunidade cruzada

Bac produzidas por *Staphylococcus* spp.	**SAM**			
	3682	**3790**	**5358**	**5362**
A53	x			
A70	x			x
Pep5	x		x	x
Epidermina	x	x	x	x
Epicidina 280	x			
Epilancina K7	x		x	x

X –significa qual a SAM deste trabalho é diferente da estafilococcina em questão.

A SAM produzida pela estirpe 3682 parece ser diferente de todas as estafilococcinas utilizadas neste trabalho. A SAM produzida pela estirpe 3790 (identificada como *S. epidermidis*) é diferente da epidermina e as SAM produzidas pelas estirpes 5358 e 5362 (ambas identificadas como *S. intermedius*) não são do tipo Pep5, epidermina e epilancina K7. A SAM produzida pela estirpe 5362 também é diferente da aureocina A70.

Quanto à ação exercida pela epidermina contra as estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal, todas foram inibidas por esta Bac, o que sugere um potencial de aplicação desta Bac contra estas estirpes.

8.7 Espectro de ação da estirpe 3682

Em razão da resistência a enzimas proteolíticas e dos resultados acima, que indicaram que a SAM produzida por esta estirpe parece ser diferente das estafilococcinas aqui testadas, esta estirpe foi escolhida para uma melhor caracterização da Bac por ela produzida.

Um dos experimentos realizados foi a análise do espectro de ação. A estirpe *M. luteus* ATCC 4698 foi empregada neste experimento por ser uma bactéria sensível à ação de estafilococcinas (NETZ, *et al.*, 2002). As estirpes do gênero *Listeria* foram utilizadas por se tratarem de importantes patógenos associados a alimentos (MARCOS *et al.*, 2007) e a estirpe de *B. coagulans* UH, por estar associada com a deterioração de alimentos, principalmente em vegetais enlatados (SETTANI & CORSETTI, 2008). Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Espectro de ação da estirpe 3682

Produtora	**Indicadoras**				
	***L. innocua* ATCC 3090**	***L. monocytogenes* 11LM**	***L. monocytogenes* L1/2A**	***B. coagulans* UH**	***M. luteus* ATCC 4698**
3682	+	+	+	+	+

+, houve inibição do crescimento.

Ao se investigar o espectro de ação da estirpe 3682 (isolada de leite bovino), verificou-se que esta Bac possui ação inibitória contra todas as estirpes empregadas neste experimento,

revelando o potencial de aplicação desta Bac contra esses microrganismos de importância em alimentos.

As aureocinas A70 e A53, produzidas pelas estirpes de *S. aureus* A70 e A53, respectivamente, também possuem ação inibitória contra estirpes do gênero *Listeria* (OLIVEIRA *et al.*, 1998a). Porém, a aureocina A53 também possui ação inibitória contra *Moraxella bovis*, uma bactéria Gram-negativa, causadora da ceratoconjutivite em gado (BASTOS *et al.*, *in press*).

Testes que verifiquem a ação da estirpe 3682 contra bactérias Gram-negativas não foram realizados.

8.8 Purificação da Bac 3682

O primeiro passo para a purificação da Bac 3682, a partir de uma cultura de 1 l em meio BHI, com o crescimento da estirpe por 24 h, foi a precipitação com sulfato de amônio. Posteriormente, este precipitado foi aplicado em uma coluna da troca catiônica, onde o material que permaneceu ligado à resina foi eluído e então utilizado em etapas posteriores de purificação por HPLC de fase reversa. A atividade inibitória da Bac 3682, após cada uma das etapas de purificação, está descrita na tabela 15.

Tabela 15: Quantificação da Bac 3682 durante as etapas de purificação

Etapa	UA totais	% de Recuperação
Sobrenadante da cultura (1 l de BHI)	1.280.000	100
Precipitação com $NH_4(SO_4)_2$	1.024.000	80
"SP Sepharose Fast Flow"	176.640 (frações de NaCl 0,5M)*	13,8
Coluna RPC3	117.760 (frações 6 a 8)*	9,2
Coluna "Sephasil Peptide C_8" (1ª corrida)	81.920 (frações 16 e 17)*	6,4
Coluna "Sephasil Peptide C_8" (2ª corrida)	71.680 (frações 11 a 13)*	5,6

*Frações onde foram detectadas as maiores atividades contra a indicadora *M. luteus*.

Após a precipitação com sulfato de amônio, 80% da Bac 3682 foram recuperados e utilizados na coluna de troca catiônica. A recuperação da Bac 3682, nesta fase de purificação, caiu para 13,8 %. Portanto, uma grande perda da Bac 3682 foi observada, provavelmente,

porque a quantidade de Bac aplicada ultrapassou a capacidade de retenção da coluna. Observou-se atividade desta Bac no eluato (dados não mostrados). Posteriormente, com a primeira HPLC realizada, houve uma recuperação de cerca de 67 % da Bac aplicada na coluna. Na segunda HPLC, a recuperação obtida foi de cerca de 70 %, em relação à etapa anterior, e na terceira, foi de cerca de 88 %. As recuperações observadas nas três etapas de HPLC podem ser consideradas muito boas.

A figura 25 mostra o resultado da última etapa de HPLC da Bac 3682. A atividade da Bac estava contida nas frações referentes ao único pico observado. Estas frações foram analisadas através de espectrometria de massa para a verificação da massa molecular da Bac. A massa molecular estimada foi de 2.139,816 Da (figura 26).

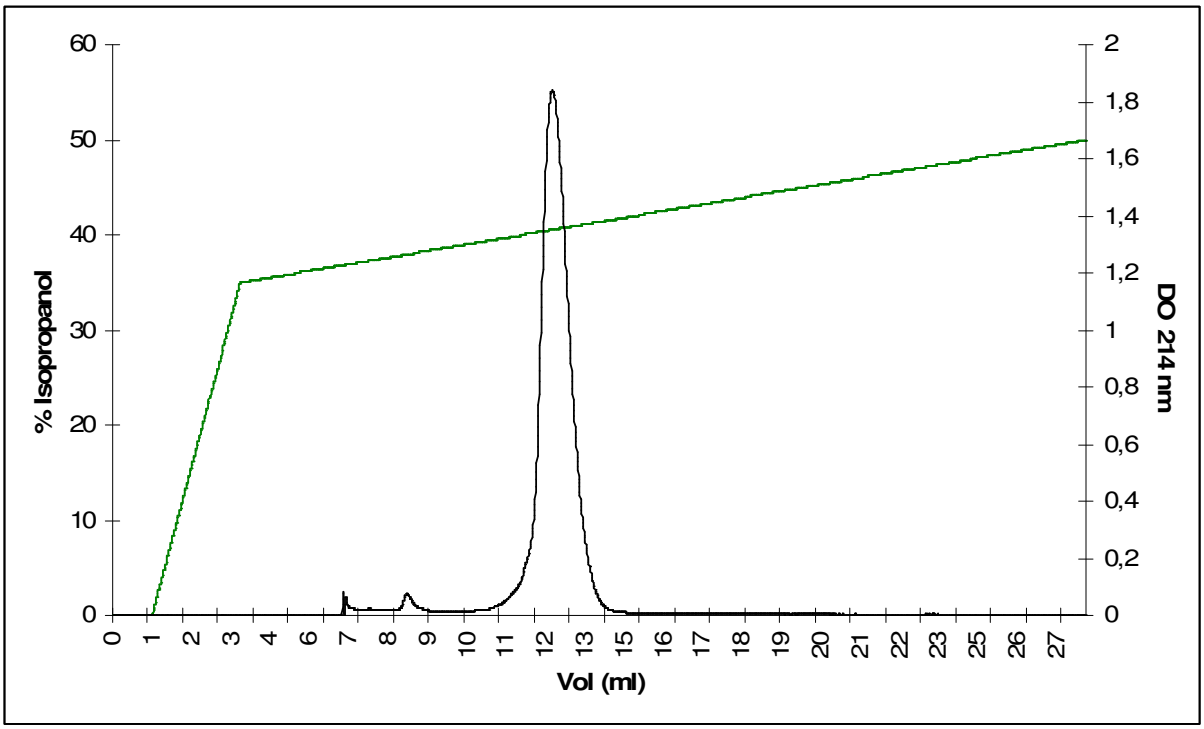

Figura 25: Perfil de eluição da Bac 3682 submetida à terceira etapa de HPLC de fase reversa (coluna "Sephasil Peptide C_8"). O material protéico foi eluido em gradientes de isopropanol (0-36% por 5 min, 36-48 % por 40 min e 48-100 % por 7 min). A eluição foi acompanhada pela medida de DO_{214} e DO_{280} e a atividade inibitória de cada fração de 1 ml foi testada contra *M. luteus* ATCC 4698. A linha verde indica o gradiente de isopropanol utilizado.

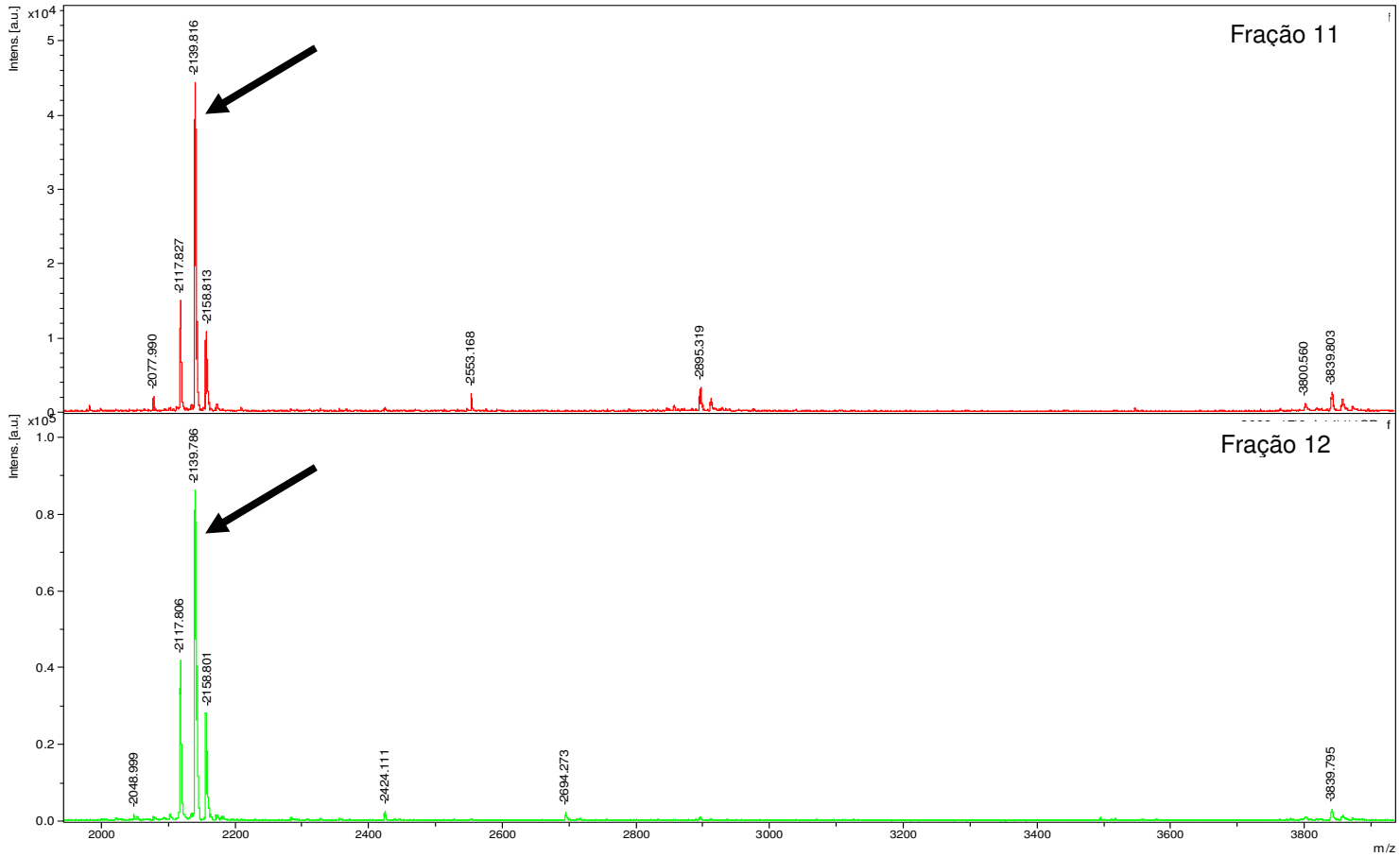

Figura 26: Espectometria de massa MALDI-TOF/TOF da Bac 3682. Todos os espectros foram calibrados externamente usando-se o padrão II de peptídio Bruker Daltonics. A seta indica a massa molecular do peptídio correspondente à Bac 3682.

Comparando-se a massa molecular obtida para a Bac 3682 com a massa molecular de algumas estafilococcinas descritas na literatura, como as aureocinas A70 e A53, Pep5, epidermina, epilancina K7, epicidina 280 e nukacina ISK-1, verificamos que há uma semelhança entre a massa molecular da Bac 3682 (2.139 Da) e a da Bac epidermina (2.164 Da). Porém, os resultados encontrados com relação à imunidade cruzada sugerem que as Bac 3682 e epidermina sejam diferentes, visto que a epidermina inibiu a estirpe 3682.

A epidermina e suas variantes parecem ser o lantibiótico mais produzido por estirpes de SCN, sendo detectado até mesmo em outras espécies de *Staphylococcus* (BASTOS *et al.*, *in press*), porém, a imunidade cruzada entre a epidermina e suas variantes é uma característica observada, o que não ocorreu entre a estirpe 3682 e a epidermina. Além disso, a Bac 3682 apresentou-se resistente à ação de enzimas proteolíticas, diferentemente do que é relatado em relação à Bac epidermina, sendo esta sensível a ação destas enzimas (ALLGAIER *et al.*, 1986). Este fato sugere, mais uma vez, a diferença entre as Bac 3682 e a epidermina.

8.9 Conclusões

- Das 21 estirpes de *Staphylococcus* spp. de origem animal, apenas quatro (19,0%) mostraram ser produtoras de SAM.
- Das quatro estirpes de *Staphylococcus* spp. SAM^+, duas foram identificadas como *S. intermedius*, uma como *S. hyicus* e uma como *S. epidermidis*.
- Quanto à natureza protéica das quatro SAM, quase todas (com exceção da produzida pela estirpe 3682), mostraram ser sensíveis a pelo menos uma enzima proteolítica, sugerindo que as mesmas sejam Bac.
- De acordo com os resultados obtidos com o teste de sensibilidade ao NaOH 0,2N, foi excluída a possibilidade da inibição das bactérias utilizadas como indicadoras pelas estirpes SAM^+ ter sido em razão da produção de ácidos.
- A análise do perfil de DNA plasmidial das quatro estirpes SAM^+ revelou a ausência de formas plasmidiais nas estirpes. Logo, as SAM são codificadas pelo cromossomo bacteriano.
- As Bac produzidas pelas quatro estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM não são do tipo epidermina.
- A Bac 3682 parece ser diferente das estafilococcinas descritas na literatura testadas neste trabalho.

- A Bac 3682 mostrou ação inibitória contra estirpes de espécies bacterianas de importância em alimentos.
- A Bac 3682 foi purificada e a sua massa molecular determinada em 2.139 Da.

Perspectivas Futuras

- Verificar a influência do extrato de levedura e da concentração de peptona no crescimento das estirpes de *S. aureus* A70 e A53 e na produção das aureocinas A70 e A53;
- Analisar a ação das aureocinas A70 e A53 *in vivo*;
- Verificar a influência do título das aureocinas A70 e A53, quando aprisionadas em matriz de alginato e gelatina, na inibição de estirpes indicadoras relacionadas a alimentos;
- Testar a ação inibitória de Bac combinadas e aprisionadas em matriz de alginato e gelatina;
- Seqüenciar os ácidos aminados da Bac 3682.

Referências Bibliográficas

AASEN, I. M.; MORETTO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; STORRO, I**. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Latcobacillus sakei* CCUG** 42687. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 159-166, 2000 .

ARKOUDELOS, J. S.; NYCHAS, G. J. E. **Comparative studies of the growth of *Staphylococcus carnosus* with or without glucose**. Lett. Appl. Microbiol., 20,19-24, 1995.

ALLGAIER, H.; JUNG, G.; WERNER, R. G.; SCHNEIDER, U.; ZÄHNER, H. **Epidermin: sequencing of a heterodet tetracyclic 21-peptide amide antibiotic**. Eur. J. Biochem., 160, 9-22, 1986.

ANTWI, M.; GEERAERD, L. M.; VEREECKEN, K. M.; BERNAERTS, K.; IMPE, V. **Influence of a gel microstructure as modified by gelatin concentration on *Listeria innocua* growth**. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 7, 124-131, 2006.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. **Review of antimicrobial food packaging**. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 3, 113-126, 2002.

ARAÚJO, S. A. & BASTOS, M. C. F. **Incompatibility and molecular relationships between small bacteriocinogenic plasmids of *Staphylococcus aureus*.** World J. Microbiol. Biotechnol., 11, 525-528, 1995.

ARCHER, G. L. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: **Principles and practice of infectious diseases.** Mandall, G. L.; Bennett., J. E.; Dolin, R (eds). 8th ed, Churchul Livingstone, Philadelphia, p. 2092-2100, 2000.

ASO, Y.; OKUDA, K.; NAGAO, J.; KANEMASA, Y.; THI BICH PHUONG, N.; KOGA, H.; SHIOYA, K.; SASHIHARA, T.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. **A novel type of immunity protein, NukH, for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1**. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69 (7), 1403-1410, 2005.

BANNERMAN, T. L.; PEACOCK, S. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: **Manual of Clinical Microbiology.** MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGEMAN, J. H.; LANDY, M. L.; PFALLER, J. M. A (eds). 9th ed. Washington DC, ASM Press., p. 390- 411, 2007.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.R. **Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis**. J. Dairy Sci., 89,1877-1895, 2006.

BASTOS, M. C. F.; CEOTTO, H.; NASCIMENTO, J. S. **Antimicrobial peptides produced by *Staphylococcus* sp. strains isolated in Brazil**. Cur. Top. Prot. Pep. Res., 7, 23-28, 2005.

BASTOS, M. C. F.; CEOTTO, H.; COELHO, M. L. V.; NASCIMENTO, J. S. **Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potencial biotechnological applications.** Cur. Pharm. Biotechnol., 10, (1), 38-61, 2009.

BECKER, K.; KELLER, B.; VON EIFF, C.; BRÜCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. **Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius***. Appl. Environ. Microbiol., 67, 5551-5557, 2001.

BEN-AMI, R.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWARTZ, D.; CARMELI, Y. **Infection of a ventriculoatrial shunt with phenotypically variable S*taphylococcus epidermidis* masquerading as polymicrobial bacteremia due to various coagulase-negative staphylococci and *Kocuria varians***. J. Clin. Microbiol., 41, 2444-2447, 2003.

BERGONIER, D.; CREMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. **Mastitis of dairy small ruminants**. Vet. Res., 34, 689-716, 2003.

BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B.; KALCHAYANAND, N**. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains.** J. Appl. Bacteriol., 70, 25-33, 1991.

BIET, F.; BEGEAUD, I. M.; WARABE, R. W.; CAENATEMPO, Y.; FREMAUX, C. **Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway**. Microbiology, 144, 2845-2854, 1998.

BOCKELMANN, W. **Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses**. Int. Dairy J., 12, 123-131, 2002.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. D. **The lantibiotic nisin, a special case or not ?** Biochem. Biophys. Acta., 1462, 223–234, 1994.

BUYONG, N.; KOK, J.; LUCHANSKY, J.B. **Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheese**. Appl. Environ. Microbiol., 64, 4842-4852, 1998.

CASABURI, A.; VILLANI, F.; TOLDRÁ, F.; SANZ, Y. **Protease and esterase activity of staphylococci**. Int. J. Food Microbiol., 112, 223-229, 2006.

CHA, D. S.; CHOI, J. H.; CHINNAN, M. S.; PARK, H. J. **Antimicrobial films based on Na-alginate and κ- carrageenan**. Lebensm. Wiss. Technol., 35, 715-719, 2002.

CHUNG, W.; HANCOCK, R. E. W. **Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria.** Inter. J. Food Microbiol., 60, 25-32, 2000.

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

COELHO, M. L. V. **Caracterização das funções *mob* do plasmídio bacteriocinogênico mobilizável pRJ6 de *Staphylococcus aureus***. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia (UFRJ), Rio de Janeiro, 99 p., 2007.

COELHO M. L. V.; NASCIMENTO, J. S.; FAGUNDES, P. C.; MADUREIRA, D. J.; OLIVEIRA, S. S.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, M. C. F. **Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastits**. Res. Microbiol., 158, 625-630, 2007.

COMA, V. **Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products**. Meat Sci., 78, 90-103, 2008.

COOKSEY, K. **Antimicrobial food packaging materials**. Additiv. Polym., 8, 6-10, 2001.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. **Bacteriocins: developing innate immunity for food**. Nat. Rev. Microbiol., 3, 777-788, 2005.

CRUPPER, S. S. & IANDOLO, J. J. **Purification and partial characterization of a novel antibacterial agent (Bac1829) produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829**. Appl. Environ. Microbiol., 62, 3171-3175, 1996.

CRUPPER, S. S., GIES, A. J. & IANDOLO, J. J. **Purification and characterization of staphylococcin BacR1, a broad-spectrum bacteriocin**. Appl. Environ. Microbiol., 63, 4185-4190, 1997.

DAJANI, A. S.; TAUBE, Z. **Plasmid-mediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus***. J. Experim. Med., 131, 1004-1015,1974.

DAVANÇO, T.; TANADA-PALMU, P.; GROSSO, C. **Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capróico: efeito de pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes**. Ciên. Tecnol. Aliment., 27 (2), 408-416, 2007.

DENGREMONT, E.; MEMBRÉ, M. **Statistical approach for comparison of the growth rates of five strains of *Staphylococcus aureus*.** Appl. Environ. Microbiol., 61 (12), 4389-4395, 1995.

DIEP. D. B.; NES, I. F. **Ribossomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria**. Cur. Drug Targets, 3, 107-122, 2002.

DIEP, D. B.; GODAGER, L.; BREDE, D.; NES, I. F. **Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745**. Microbiology, 152, 1649-1659, 2006.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. **Exotoxins of *Staphylococcus aureus***. Clin. Microbiol. Rev., 13, 16-34, 2000.

DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. **Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release**. J. Membr. Sci., 280, 37-44, 2006.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PRÉVOST, H. **The continuing story of class IIa bacteriocins**. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70 (2), 564-582, 2006.

DROUAULT, S.; JUSTE, C.; MARTEAU, P.; RENAULT, P.; CORTHIER, G. **Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency**. Appl. Environ. Microbiol., 68, 3166-3168, 2002.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. **Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity**. FEMS Microbiol. Rev., 24, 85-106, 2000.

EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus*, 2007**. URL: http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html. Acesso em: 10 nov. 2008.

FAYE, T.; LANGSRUD, T.; NES, I. F.; HOLO, H. **Biochemical and genetic characterization of propiocin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenni***. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4230-4236, 2000.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. **Polímeros biodegradáveis- Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos**. Quim. Nova, 29 (4), 811-816, 2006.

FREDERIQ, P. **Sur la sensibilité et l´activité antibiotique dês staphylocoques**. C. R. Seances Soc. Biol. Fil., 140, 1167-1170, 1946.

FUDABA, Y.; NISHIFUJI, K.; ANDRESEN, L.O.; YAMAGUCHI, T.; KOMATSUZAWA, H.; AMAGAI, M.; SUGAI, M. ***Staphylococcus hyicus* exfoliative toxins selectively digest porcine desmoglein 1**. Microb. Pathog., 39, 171-176, 2005.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. **Bacteriocin-based strategies for food biopreservation**. Int. J. Food Microbiol., 120, 51-70, 2007.

GAMON, M. R.; MOREIRA, E. C.; OLIVEIRA, S. S.; TEIXEIRA, L. M.; BASTOS, M. C. F. **Characterization of a novel bacteriocin-encoding plasmid found in clinical isolates of *Staphylococcus aureus***. Antonie van Leeuwenhoek., 75, 233-243, 1999.

GARDINER, G. E.; REA, M. C.; O´RIODAN, B.; O´CONNOR, P.; MORGAN, S. M.; LAWLOR, P. G.; LYNCH, P. B.; CRONIN, M.; ROSS, R. P.; HILL, C. **Fate of the two-component lantibiotic lacticin 3147 in the gastrointestinal tract**. Appl. Environ. Microbiol., 73, 7103-7109, 2007.

GARRITY, G. H.; HOLT, J. G. Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. In: **Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology**. GARRITY, G. H. (ed) 2nd ed., Springer-Verlag, New York, p. 427-446, 2001.

GASPARD, S.; OUJJA, M.; ABRUSCI, C.; CATALINA, F.; LAZARE, S.; DESVERGNE, J. P.; CASTILLEJO, M. **Laser induced foaming and chemical modifications of gelatin films**. J. Photochem. Photobiol., A. 193, 187-192, 2008.

GATERMANN, S. G.; CROSSLEY, K. B. Urinary tract infections. In: **The staphylococci in human disease**. CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. (eds). Churchill Livingston, New York, p. 493-508, 1997.

GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; MAFRA, M. A.; PENIDO, E. G. C.; BASTOS, M. C. F. **Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus***. J. Gen. Microbiol., 136, 1591-1599, 1990.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. **Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna**. J. Food Prot., 63, 1338-1346, 2000.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B. **Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and high lethal necrosing pneumonia in young immunocompetent patients**. Lancet, 359, 753-759, 2002.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. **Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food**. J. Appl. Microbiol., 98, 1316-1325, 2005.

HANCOCK, R. E. **Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials**. Lancet Infect. Dis., 1, 156-164, 2001.

HAKOVIRTA, J.; REUNANEN, J.; SARIS, P. E. J. **Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad, dressings, canned tomatoes, and liquid egg products**. Appl. Environ. Microbiol., 72, 1001-1005, 2006.

HEIDRICH, C.; PAG, U.; JOSTEN, M.; METZGER, J.; JACK, R. W.; BIERBAUM, G.; JUNG, G.; SAHL, H. G. **Isolation, characterization, and heterologous expression of the novel lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster**. Appl. Environ. Microbiol., 64, 3140-3146, 1998.

HENG, N. C. K.; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In **Bacteriocins: ecology and evolution.** RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. (eds). Springer, New York, p. 45-83, 2007.

IRLINGER, F. **Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci**. Int. J. Food Microbiol., 126, 302-310, 2008.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. **Bacteriocins of Gram-positive bacteria**. Microbiol. Rev., 59, 171-200, 1995.

JOUSIMIES-SOMER, H.; PYÖRÄLÄ, S.P.; KANERVO, A. **Susceptibilities of bovine summer mastitis bacteria to antimicrobial agents**. Antimicrob. Agents Chemother., 40, 157-160, 1996.

KAISER, A. L.; MONTVILLE, T.J. **The influence of pH and growth rate on production of bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations**. J. Appl. Bacteriol., 75, 536-540, 1993.

KANATANI, K.; OSHIMURA, M.; SANO, K. **Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophillus***. Appl. Environ. Microbiol., 61, 1061-1067, 1995.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGUI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. **Production of flavor esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system**. Process Biochem., 41, 1692-1698, 2006.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. **A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicilin resistance in *Staphylococcus aureus***. Antimicrob. Agents Chemother., 44, 1549-1555, 2000.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H, H. **Produção de isomaltose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana**. Quim. Nova, 31 (1), 134-143, 2008.

KLAENHAMMER, T. R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Biochimie, 70, 337-349, 1988.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H.; GÖTZ, F. The genus *Staphylococcus*. In: **The prokaryotes**. BALOWS, A.; TRÜPER, H. G. (eds). Springer-Verlag, New York, p. 1369-1420, 1991.

KLOOS, W. E.; LAMBE, D. W. *Staphylococcus*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; HERRMANN JR, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. (eds) 5th ed. ASM Press, Washington, DC, p. 222-237, 1991.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. **Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci**. Clin. Microbiol. Rev., 7, 117-140, 1994.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; De VUYST, L. **Funcional meat starter cultures for improved sausage fermentation**. Int. J. Food Microbiol., 106, 270-285, 2006.

LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V.; BORSALI, R. **Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio**. Quim. Nova, 30 (4), 832-837, 2007.

LURIA, S. E.; SUIT, J. L. Colicins and Col plasmids. In ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology**. NEIDHARTD, F. C; INGRAHAN, J. L.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAETER, M. (eds) ASM Press, Washington, DC, p. 1615-1624, 1987.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock: Biology of Microorganisms**, 10th Edition. Prentice-Hall, New Jersey, 1019 p., 2004.

MAHOUDEAU, I.; DELABRANCHE, X.; PREVOST, G.; MONTEIL, H.; PIEMONT, Y. **Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans**. J. Clin. Microbiol., 35**,** 2153-2154, 1997.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. **Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham**. Int. J. Food Microbiol., 120, 152-158, 2007.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. **High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during of cooked ham**. Food Microbiol., 25, 177-182, 2008.

MARTINEZ, J. M.; KOK, J.; SANDERS, J. W.; HERNANDEZ, P.E. **Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies.** Appl. Environ. Microbiol., 66, 3543-3549, 2000.

MARUGG, J. D.; GONZALEZ, C. F.; KUNKA, B. S.; LEDEBOER, A. M.; FUCCI, M. J.; TOONEN, M. Y. **Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC10**. Appl. Environ. Microbiol., 58, 2360-2367, 1992.

MASTERSON, R.; VON DAVID, W.; WILLEY, B. B.; ROGOLSKY, M. **Mutagenesis of extrachromosomal exfoliative toxin B and bacteriocin BacR1 synthesis in *Staphylococcus aureus* after plasmid transfer by protoplast fusion**. Infect. Immun., 42, 973-979, 1983.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. **Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of southern Italy**. Meat Sci., 67, 149-158, 2004.

MCAULIFFE, O.; HILL, C.; ROSS, R. P. **Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture**. J. Appl. Microbiol., 86, 251-256, 1999.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. **Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action**. FEMS Microbiol. Rev., 25, 285-308, 2001.

MEGHROUS, J.; HUOT, E.; QUITTELIER, M.; PETITDEMANGE, H. **Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***. Res. Microbiol., 143, 879-890, 1992.

MIESCHER, S.; STIERLI, M. P.; TEUBER, M.; MEILE, M. **Propiocin SM1, a bacteriocin from *Propionibacterium jensenii* DF1: isolation and characterization of the protein and its gene**. Syst. Appl. Microbiol., 23, 174-184, 2000.

MILLETTE, M.; LE TIEN, C.; SMORAGIEWICZ, W.; LACROIX, A. **Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads**. Food Control, 18, 878-884, 2007.

MORGAN, S. M.; GALVIN, M.; ROSS, R. P.; HILL, C. **Evaluation of spray-dried lacticin 3147 powder for control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems**. Lett. Appl. Microbiol., 33, 387-391, 2001.

MORTVEDT-ABILDGAARD, C. I.; NISSEN-MEYER, J.; JELLE, B.; GRENOV, B.; SKAUGEN, M.; NES, I. F. **Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45**. Appl. Environ. Microbiol., 61, 175-179, 1995.

MOTTA, A. S.; CANNAVAN, F. S.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. **Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin**. Arch. Microbiol., 188, 367- 375, 2007.

NAKAMURA, T.; YAMAZAKI, N.; TANIGUCHI, H.; FUJIMURA, S. **Production, purification, and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva**. Infect. Immun., 39, 609-614, 1983.

NASCIMENTO, J. S.; SANTOS, K. R. N.; GENTILINI, E.; SORDELLI, D.; BASTOS, M. C. F. **Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producer strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis**. Vet. Microbiol., 85, 133-144, 2002.

NASCIMENTO, J. S.; ABRANTES, J.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; BASTOS, M. C. F. **Growth conditions required for bacteriocin production by strains of *Staphylococcus aureus***. World J. Microbiol. Biotechnol., 20, 941-947, 2004.

NASCIMENTO, J. S.; FAGUNDES, P. C.; BRITO, M. A. V. P.; SANTOS, K. R. N.; BASTOS, M. C. F. **Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis**. Vet. Microbiol., 106, 61-71, 2005.

NAVARATNA, A. D. B.; SAHL, H.-G.; TAGG, J. R. **Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55**. Appl. Envirol. Microbiol., 64, 4803-4808, 1998.

NAVARATNA, A. D. B.; SAHL, H.-G.; TAGG, J. R. **Identification of genes encoding two-component lantibiotic production in *Staphylococcus aureus* C55 and other phage group II *S. aureus* strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene**. Infect. Immun., 67, 4268-4271, 1999.

NETZ, D. J. A .; SAHL, H.-G.; MARCOLINO, R.; NASCIMENTO, J. S.; OLIVEIRA, S. S.; SOARES, M. B.; BASTOS, M. C. F. **Molecular characterization of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus***. J. Mol. Biol., 311, 939-949, 2001.

NETZ, D. J.; POHL, R.; BECK-SICKINGER, A. G.; SELMER, T.; PIERIK, A. J.; BASTOS, M. C. F.; SAHL, H. G. **Biochemical characterization and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus***. J. Mol. Biol., 319, 745-756, 2002.

NETZ, D. J. A.; BASTOS, M. C. F.; SAHL, H-G. **Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus***. Appl. Environ. Microbiol., 68 (11), 5274-5280, 2002.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USEROS, J. I.; PELÁEZ-MARTINÉZ, M. C.; HARDISSON DE LA TORRE, A. **Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry**. Meat Sci., 62, 237-243, 2002.

NISHIFUJI, K.; SUGAI, M.; AMAGAI, M. **Staphylococcal exfoliative toxins: "Molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals**. J. Dermatol. Sci., 49, 21-31, 2008.

NYCHAS, G. J.; TRANTER, H. S.; BREHM, R.D.; BOARD, R. G. ***Staphylococcus aureus* S-6: factors affecting its growth, enterotoxin B production and exoprotein formation**. J. Appl. Bacteriol., 70, 344-350, 1991.

OLIVEIRA, S. S.; NASCIMENTO, J. S.; PÓVOA, D. C.; ARAÚJO, S. A.; GAMON, M. R.; BASTOS, M. C. F. **Genetic analysis of the bacteriocin-encodind plasmids pRJ6 and pRJ9 of *Staphylococcus aureus* by transposon mutagenesis and cloning of genes involved in bacteriocin production**. J. Appl. Microbiol., 85, 872-984, 1998a.

OLIVEIRA, S. S.; PÓVOA, D. C.; NASCIMENTO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA, J. P. J.; BASTOS, M. C. F. **Antimicrobial substances produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle in Brazil**. Lett. Appl. Microbiol., 27, 229-234, 1998b.

OLIVEIRA, S. S.; ABRANTES, J.; CARDOSO, M.; SORDELLI, D.; BASTOS, M.C.F. **Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides**. Lett. Appl. Microbiol., 27, 287-291, 1998c.

PAPAGIANNI, M. **Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications**. Biotechnol. Adv., 21, 465-499, 2003.

PARENTE, E.; HILL, C. **Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes***. J. Food Prot., 55, 497-502, 1992.

PEACOCK, S. *Staphylococcus*. In: **Topley & Wilson´s Microbiology & Microbials Infections**. BORRICELLO, S. P.; MURRAY, P. R.; FUNKE, G. (eds).10th ed. ASM Press, Washington, DC, vol. 2, p. 390-411, 2007.

PESCHEL, A. SCHNELL, N.; HILLE, M.; ENTIAN, K. D.; GÖTZ, F. **Secretion of the lantibiotics epidermin and gallidermin: sequence analysis of the genes *gdmT* and *gdmH*,**

their influence on epidermin production and their regulation by EpiQ. Mol. Gen. Genet., 254, 312-318, 1997.

PLACE, R. B.; HIESTAND, D.; BURRI, S.; TEUBER, M. ***Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. *nov*., a dominant isolate from surface ripened cheese**. Syst. Appl. Microbiol., 25, 353-359, 2002.

PLACE, R. B.; HIESTAND, D.; GALLMANN, H. R.; TEUBER, M. ***Staphylococcus equorum* subsp. *lineus* subsp. *nov*., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses**. Syst. Appl. Microbiol., 26, 30-37, 2003.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. **Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens**. Vet. Microbiol., *in press*, 2009

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. **Antimicrobial food packaging in meat industry**. Meat Sci., 62, 373-380, 2002.

REDDY, K. V. R.; ARANHA, C.; GUPTA, S. M.; YEDERY, R. D. **Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies**. Res. Reprod., 128, 117-126, 2004.

RHIM, J-W. **Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films**. Lebensm. Wiss. Technol., 37, 323-330, 2004.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. **Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação do caldo de cana**. Sci. Agric., 56 (2), 255-263, 1999.

ROSE, N. L.; SPORNS, P.; STILES, M. E.; McMULLEN, L. M. **Inactivation of nisin by glutathione in fresh meat**. J. Food Sci., 64, (5), 759-762, 2008.

ROSS, P. R.; MORGAN, S.; HILL, C. **Preservation and fermentation: past, present and future**. Int. J. Food Microbiol., 79, 3-16, 2002.

RYAN, M. P.; JACK, R.; JOSTEN, W.; SAHL, H-G.; JUNG, G.; ROSS, R. P. **Extensive post-translational modification, including a serine to D-alanine convertion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147**. J. Biol. Chem., 274, 3744-3750,1999.

SAHL, H-G.; JACK, R. W.; BIERBAUM, G. **Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications**. Eur. J. Biochem., 230, 827-853, 1995.

SAHL, H-G.; BIERBAUM, G. **Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of modified peptides from Gram-positive bacteria**. Annu. Rev. Microbiol., 52, 41-79,1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, Nova York, 1989.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. F.; NÓBREGA, J. E.; JÚNIOR, M. A. W.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; WÜRLITZER, N. J. **Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham**. Food Control, 20, 85-89, 2008.

SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E. K. **Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate.** J. Appl. Microbiol., 89, 573-579, 2000a.

SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E. K. **Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin**. Int. J. Food Microbiol., 60, 241-249, 2000b.

SCHILIEVERT, P.M.; JABLONSKI, L.M.; ROGGIANI, M.; SADLER, I.; CALLANTINE, S.; MITCHELL, D.T.; OHLENDORF, D. H.; BOHACH, G. H. **Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals**. Infect. Immun., 68, 3630-3634, 2000.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. **Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods**. Trends Food Sci. Technol., 7 (5), 158-164, 1996.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**, 2ª edição. Edgard Blücher, São Paulo, 535 p., 2005.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. **Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation**. Int. J. Food Microbiol., 121, 123-138, 2008.

SIRAGUSA, G. R.; CUTTER, C. N.; WILLETT, J. L. **Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat**. Food Microbiol., 16, 229-235, 1999.

SKAUGEN, M.; CHRISTIE, V. H.; NES, I. F. **Identification, characterization, and expression of a second bicistronic, operon involved in the production of lactocin S in *Lactobacillus sakei* L45**. Appl. Environ. Microbiol., 68, 720-727, 2002.

SOBRAL, P. J. A. **Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares**. Pesq. Agropec. Bras**.**, 35, 1251-1259, 2000.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. **Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products**. Int. Dairy J., 18, 329-343, 2008.

SOMERVILLE, G. A.; SAÏD-SALIM, B.; WICKMAN, J. M.; RAFFEL, S.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M. **Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: Implications for host-pathogen interactions**. Infect. Immun., 71, 4724-4732, 2003.

STILES, M. E. **Biopreservation by lactic acid bacteria**. Antonie van Leeuwenhoek., 70, 331-345, 1996.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. **Bacteriocins of Gram-positive bacteria**. Bacteriol. Rev., 40, 722-756,1976.

THOMAS, L.V.; CLARKSON, M. R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: **Natural food antimicrobial systems**. NAIDU, A. S.(ed). CRC Press, Boca Raton, FL, p. 463-524, 2000.

VAN BELKUM, M. J.; WOROBO, R. W.; STILES, M. E. **Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicinY secretion in *Lactococcus lactis***. Mol. Microbiol., 23, 1293-1301, 1997.

VAN DE KAMP, M.; HORSTIK, L.M.; VAN DEN HOOVEN, H. W.; KININGS, R.N.; HILBERS, C. W.; FREY, A.; SAHL, H.-G.; METZGER, J. W.; VAN DE VEN, F. J. **Sequence analysis by NMR spectroscopy of the peptide lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7**. Eur. J. Biochem., 227, 757-771, 1995a.

VAN DE KAMP, M; VAN DEN HOOVEN, H. W.; KONINGS, R.N.; BIERBAUM, G. A.; SAHL, H.-G.; KUIPERS, O. P.; SIEZEN, R. J.; DE VOS, W. M.; HILBERS, C. W. **Elucidation of the primary structure of the lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7. Cloning and characterization of the epilancin-K7-encoding gene and NMR analysis of mature epilancin K7**. Eur. J. Biochem., 230, 587-600, 1995b.

VAN REENEN, C. A.; CHIKINDAS, M. L.; VAN ZYL, W. H.; DICKS, L. M. T. **Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae***. Int. J. Food Microbiol., 81, 29-40, 2003.

VILLANI, F.; APONTE, M.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; MOSCHETTI, G. **Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk**. J. Appl. Microbiol., 90 (3), 430-439, 2001.

DE VOS, W. M.; MULDERS, J.W.M.; SIEZEN, R. J.; HUGENHOLTZ, J.; KUIPERS, O. P. **Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis***. Appl. Environ. Microbiol., 59, 213- 218, 1993.

WARREN, R.; ROGOLSK, M.; WILEY, B. B.; LOWELL, A. G. **Effect of ethidium bromide on elimination of exfoliative toxin and bacteriocin production in *Staphylococcus aureus***. J. Bacteriol., 113, 980-985, 1974.

YOUNIS, A.; KRIFUCKS, O.; HELLER, E. D.; SAMRA, Z.; GLICKMAN, A.; SARAN, A.; LEITNER, G. ***Staphylococcus aureus* exosecretions and bovine mastits**. J. Vet. Med., 50, 1-7, 2003.

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. **Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures**. Int. J. Food Microbiol.,127, 246-251, 2008.