

# UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

# ANDREZA DUARTE FREITAS DE SOUZA

# CARACTERIZAÇÃO DA SAM 4244, UM PEPTÍDEO BIOATIVO COM POTENCIAL APLICAÇÃO COMO UM BIOPRESERVATIVO DE ALIMENTOS

## ANDREZA DUARTE FREITAS DE SOUZA

# CARACTERIZAÇÃO DA SAM 4244, UM PEPTÍDEO BIOATIVO COM POTENCIAL APLICAÇÃO COMO UM BIOPRESERVATIVO DE ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao programa de pósgraduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo de Freire Bastos Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selma Gomes Ferreira Leite

> Escola de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro 2010

# CARACTERIZAÇÃO DA SAM 4244, UM PEPTÍDEO BIOATIVO COM POTENCIAL APLICAÇÃO COMO UM BIOPRESERVATIVO DE ALIMENTOS

# ANDREZA DUARTE FREITAS DE SOUZA

Dissertação submetida ao corpo docente 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 a obtenção do grau de Mestre em Ciências, executado sob orientação conjunta das Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Maria do Carmo de Freire Bastos e Selma Gomes Ferreira Leite.

Aprovada por:	
-	(Maria do Carmo de Freire Bastos, PhD – IMPPG/UFRJ)
_	
	(Selma Gomes Ferreira Leite, Dsc – EQ/UFRJ)
-	(Karen Signori Pereira, Dsc – EQ/UFRJ)
-	(Janaina dos Santos Nascimento, Dsc – Micro/IFRJ)
_	(Hilana Ceotto, Dsc – IMPPG/UFRJ)

#### FICHA CATALOGRÁFICA

#### D812c Duarte, Andreza Freitas de Souza

Caracterização da SAM 4244, um peptídeo bioativo com potencial aplicação como um biopreservativo de alimentos / Andreza Duarte Freitas de Souza – 2010.

xviii, 116 f.; il.; 29,7cm.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadoras: Maria do Carmo de Freire Bastos, Selma Gomes Ferreira Leite.

1. Bacteriocinas. 2. Biopreservativo. 3. Alimentos. 4. *Staphylococcus* – Teses. I. Bastos, Maria do Carmo de Freire e Leite, Selma Gomes Ferreira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título.

CDD:664.024

#### **AGRADECIMENTOS**

Estes agradecimentos não serão apenas em relação à realização deste trabalho, serão agradecimentos a companheiros da vida, que muito me ajudaram, tornando a minha caminhada mais simples e alegre. Não conseguirei agradecer a todos, mas todos que estiveram ao meu lado esses anos sabem da sua importância.

À minha orientadora, professora Maria do Carmo de Freire Bastos, por ser um grande exemplo de profissional. Muito obrigada por todo incentivo, carinho e dedicação durante a realização deste trabalho e também pelos "puxões de orelha" nas horas necessárias. Eles foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha orientadora, professora Selma Gomes Ferreira Leite por ter aceitado me orientar nesta tese de mestrado. Agradeço toda a ajuda e incentivo durante a realização deste trabalho.

À professora Karen, por ser essa pessoa carinhosa e dedicada. Muito obrigada por todas as dicas para este trabalho e pelos vários "e-mails" super atenciosos, estando sempre disposta a ajudar.

Aos meus avós, Risete e Joaquim. Não há palavras para agradecê-los. Sem vocês talvez eu nunca tivesse chegado até aqui! Muito obrigada por existirem, por estarem ao meu lado e me acolherem nos momentos mais difíceis da minha vida!

À minha irmã Andréa, que, apesar de ter feito uma "grande arte" que adiou a apresentação da minha tese, sempre esteve ao meu lado, me dando todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado, Rafael, por me aturar nos meus constantes momentos de estresse. Muito obrigada pelo carinho e amor. Sua presença fez as coisas parecerem mais fáceis.

A todos do Laboratório de Genética Molecular, Janaína Nascimento (mesmo distante sempre me motivou), Hilana Ceotto (que me ajudou muito desde o princípio e me deu força em vários momentos de crise), Marcus Lívio (uma "mãe", por toda ajuda e incentivo), Patrícia Carlin (uma pessoa maravilhosa, que adoro muito), Amina Potter (esteve sempre disposta a ajudar), Karlla Fernanda (sua alegria constante é cativante), Bruna (minha irmã querida), Ilana (minha

irmãzinha mais nova) e Maria Danielly (por tentar me comprar com todas aquelas comidinhas gostosas) pelas nossas terapias de grupo e por tornarem o nosso laboratório um ambiente de trabalho maravilhoso, alegre e inesquecível.

Aos amigos Carol Botelho, Douglitus, Patrícia, Juliana e Tatiana, por todas as nossas reuniões para fazer os trabalhos, as milhares de listas de exercícios e estudar as matérias mais "cabeludas".

À Flora, amiga de todas as horas, por saber entender o meu jeito de ser e por me ouvir pacientemente, todas as vezes que precisei de um ombro amigo.

À CAPES, pela bolsa de mestrado a mim concedida.

E aos que impuseram as maiores dificuldades da minha vida, o meu muito obrigada também! Vocês se tornaram um exemplo para mim, um exemplo do que não ser...

A Deus.

"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso".

**Charles Chaplin** 

#### **RESUMO**

DUARTE, Andreza Freitas de Souza. Caracterização da SAM 4244, um peptídeo bioativo com potencial aplicação como um biopreservativo de alimentos. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Neste estudo, 47 estirpes de Staphylococcus spp., isoladas de gado com mastite de diferentes rebanhos da região sudeste do Brasil, foram analisadas quanto à produção de substância antimicrobiana (SAM). Seis estirpes apresentaram atividade significativa contra a estirpe indicadora Corynebacterium fimi NCTC 7547. PCR e hibridização DNA/DNA revelaram que as estirpes 4059 e 4231 produzem SAM idênticas ou similares à aureocina A70, enquanto que as demais SAM parecem ser diferentes das nove estafilococcinas já caracterizadas. A SAM 4244 foi a que se mostrou mais promissora, sendo capaz de inibir estirpes de diferentes gêneros, incluindo microrganismos deteriorantes de alimentos, patógenos alimentares, Streptococcus spp. isolados de mastite bovina e Enterococcus spp. resistentes à vancomicina. Através da análise da sequência de rDNA 16S, a estirpe 4244 foi identificada como S. hyicus. A SAM 4244 foi parcialmente sensível às enzimas pronase E e proteinase K, indicando que esta substância tem caráter proteico. A produção da SAM 4244 se inicia no começo da fase exponencial de crescimento, atingindo seu máximo em 8 h de cultivo nos meios BHI e M17. A cinética de ação desta SAM concentrada através de precipitação com sulfato de amônio foi bacteriostática contra Listeria monocytogenes ATCC 19117. Através da SDS-PAGE, a massa molecular da SAM 4244 foi estimada em menor do que 20 kDa. Esta SAM apresenta características vantajosas a sua aplicação em alimentos, como alta termoestabilidade e atividade em ampla faixa de pH. A SAM 4244 se manteve estável por pelo menos seis meses quando armazenada a 4°C e por pelo menos 18 meses, quando mantida a -20°C. Quando aplicada em leite UHT, esta SAM foi capaz de inibir eficientemente o crescimento de L. monocytogenes ATCC 19117 e Staphylococcus aureus A70 Bac<sup>-</sup>. A SAM 4244 apresenta, portanto, potencial aplicação como um biopreservativo de alimentos.

Palavras Chaves: Bacteriocinas, Biopreservativo de Alimentos, *Staphylococcus*, Peptídeos Antimicrobianos

#### **ABSTRACT**

DUARTE, Andreza Freitas de Souza. **Characterization of AMS 4244, a bioactive peptide with potential application as food biopreservative.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertation (Master Science) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2010.

In this study, 47 Staphylococcus spp. strains, isolated from cattle with bovine mastitis in different Brazilian dairy herds, located in the southeast region of the country, were tested for antimicrobial substance (AMS) production. Six strains exhibited significant antagonistic activity against the indicator strain Corynebacterium fimi NCTC 7547. PCR and DNA/DNA hybridization analyses showed that strains 4059 and 4231 produced AMS identical or similar to aureocin A70, while the others seem to be different from all nine staphylococcins already characterized. AMS 4244 was the most promising, being able to inhibit strains of different genera, including food spoilage microorganisms, food-borne pathogens, Streptococcus spp. isolated from bovine mastitis and vancomycin-resistant enterococci. By DNA sequence of 16S rDNA, strain 4244 was identified as S. hyicus. AMS 4244 was partially sensitive to pronase E and proteinase K, indicating that this substance has a proteinaceus nature. The production of AMS 4244 begins in the early exponential growth phase, reaching its maximum at 8 h of cultivation in BHI and M17. The kinetics of action of this AMS concentrated by ammonium sulfate precipitation was bacteriostatic against Listeria monocytogenes ATCC 19117. By SDS-PAGE, the molecular mass of AMS 4244 was estimated to be < 20 kDa. This AMS presents advantageous characteristics for application in foods such as high thermostability and activity in a wide pH range. AMS 4244 remained stable for at least six months when stored at 4° C and for at least 18 months, when kept at -20°C. When apply to UHT milk AMS 4244 could efficiently inhibit the growth of L. monocytogenes ATCC 19117 and Staphylococcus aureus A70 Bac. SAM 4244 has, therefore, a potential application as food biopreservative.

Key-words: Bacteriocins, Food Biopreservative, *Staphylococcus*, Antimicrobial Peptides

# SUMÁRIO

1.	INT	RODUÇÃO	1
2.	RE'	VISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
:	2.1	LEITE	3
	2.2	MASTITE BOVINA	5
:	2.3	GÊNERO Staphylococcus	
		2.3.1 Staphylococcus coagulase-negativos	
		2.3.2 Staphylococcus coagulase-positivos	
	2.4	Listeria monocytogenes	
:	2.5	BACTERIOCINAS	19
		2.5.1 CLASSE I OU LANTIBIÓTICOS	20
		2.5.2 CLASSE II	23
		2.5.3 CLASSE III	25
		2.5.4 ESTAFILOCOCCINAS	25
		2.5.4.1 Estafilococcinas produzidas por SCN	27
		2.5.4.2 Estafilococcinas produzidas por <i>S. aureus</i>	29
:	2.6	BACTERIOCINAS COMO BIOPRESERVATIVOS DE ALIMENTOS	33
		2.6.1 Adição de bacteriocinas como ingredientes ou aditivos de alimentos	
		2.6.2 Adição de culturas bacteriocinogênicas a alimentos	
		2.6.3 Adição de bacteriocinas combinadas a alimentos	
		2.6.4 Aplicação de bacteriocinas adsorvidas a embalagens ativas de alimentos	
		2.6.5 Adição de bacteriocinas a alimentos combinada com outros métodos	
	2.7	2.6.6 Adição de bacteriocinas através da expressão heteróloga em BAL	
4	2.1	OUTRAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS BACTERIOCINAS	49
3. (	OB.	JETIVOS	51
	3.1	OBJETIVO GERAL	
	3.2	ABORDAGENS A SEREM EMPREGADAS NESTE TRABALHO	
,	0.2	ABONDAGENG A GENEWI EIWII NEGADAG NEGTE TRABALTIG	01
<b>4</b> . l	MΑ	TERIAIS E MÉTODOS	53
	4.1	Estirpes bacterianas, condições de cultivo e estocagem	53
	4.2	Teste de produção de SAM	
	4.3	Determinação do espectro de ação	
		Caracterização bioquímica	

	4.5	Extração de DNA plasmideal de <i>Staphylococcus</i> spp	. 5/
	4.6	Extração de DNA genômico de <i>Staphylococcus</i> spp.	. 58
	4.7	PCR para a amplificação de genes estruturais de estafilococcinas conhecidas	. 59
	4.8	Dosagem de DNA	. 59
	4.9	Eletroforese de DNA em gel de agarose	61
	4.10	Detecção dos genes estruturais das estafilococcinas por hibridização DNA/DNA	61
	4.11	Digestão de DNA com as enzimas <i>Eco</i> RI e <i>Hind</i> III	. 62
	4.12	Identificação em espécie através da análise de rDNA 16S	. 62
	4.13	Cinética de produção da SAM 4244 em diferentes meios de cultura	63
	4.14	Titulação da SAM 4244 pelo método de difusão em ágar	. 63
		Concentração da SAM 4244 por precipitação do sobrenadante da cultura com to de amônio	. 64
	4.16	Análise da estabilidade da SAM 4244	64
		4.16.1 Ação de enzimas proteolíticas sobre a atividade da SAM 4244	64
		4.16.2 Ação do pH sobre a atividade da SAM 4244	65
		4.16.3 Ação da temperatura sobre a estabilidade da SAM 4244	65
		Estimativa da massa molecular da SAM 4244 por eletroforese em gel de crilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	. 65
		4.17.1 Extração de proteínas	65
		4.17.2 Tratamento do sobrenadante concentrado	66
		4.17.3 SDS-PAGE	
	4.18	Análise da cinética de ação da SAM 4244	
	4.19	Contagem do número de células viáveis	. 67
	4.20	Análise de atividade da SAM 4244 em leite desnatado UHT e em meio TSB	. 68
	4.21	Determinação da vida de prateleira da SAM 4244	. 68
5.	RES	SULTADOS	.69
	5.1	Teste de produção de SAM	69
	5.2	Caracterização bioquímica das SAM	69
	5.3	Perfil plasmideal das estirpes produtoras de SAM	. 70
	5.4	Amplificação de genes codificadores de estafilococcinas conhecidas	. 72
	5.5 conh	Hibridização DNA/DNA para a detecção genes codificadores de estafilococcinas ecidas	. 73
	5.6	Determinação do espectro de ação das SAM	
	5.7	Identificação em espécie da estirpe 4244 através da análise de rDNA 16S	
	5.8	Cinética de produção da SAM 4244 em diferentes meios de cultura	

	5.9	Cinética de crescimento e de produção da SAM 4244 em meio BHI	80
	5.10	Concentração da SAM 4244	81
	5.11	Determinação das propriedades da SAM 4244	81
		5.11.1 Sensibilidade da SAM 4244 a enzimas proteolíticas	81
		5.11.2 Ação do pH sobre a atividade da SAM 4244	82
		5.11.3 Ação da temperatura sobre a atividade da SAM 4244	83
	5.12	Estimativa da massa molecular da SAM 4244	84
	5.13	Cinética de ação da SAM 4244	85
	5.14	Atividade da SAM 4244 em leite desnatado UHT e em meio TSB	86
	5.15	Determinação da vida de prateleira da SAM 4244	88
6.	DIS	CUSSÃO	89
_			
7.	CON	NCLUSÕES	95
8.	PER	RSPECTIVAS FUTURAS	96
9.	RFF	FRÊNCIAS	97

#### **ABREVIATURAS E SIGLAS**

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

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - "American Type Culture Collection"

Bac - Estirpe curada do plasmídeo codificador de bacteriocina

**BAL** – Bactérias do Ácido Láctico

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

C/Cys - Cisteína

**CCC** – "Covalently Closed Circle" (Círculo Covalentemente Fechado)

**CCS** – Contagem de Células Somáticas

**CDC** – Centers for Disease Control and Prevention

CEP - Campo Elétrico Pulsado

Da - dalton (s)

**Dha** – Dideidroalanina

**Dhb** - Dideidrobutirina

**DINAL** – Divisão Nacional de Alimentos

**DETEN –** Departamento de Técnicas Normativas

**DIPOA –** Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

**DO** – Densidade Óptica

**DPA -** Dairy Partners Americas

EDTA - "Ethylene Diamine Tetraacetic Acid" (Ácido Etileno Diamino Tetraacético)

**EGA** – Eletroforese em Gel de Agarose

**ETA / B**– "Exfoliative Toxins A e B" (Toxinas Esfoliativas A e B)

G/Gly - Glicina

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

**HACCP** – "Hazard Analysis Critical Control Point" (Análise de Ponto Crítico de Controle de Segurança)

IFRJ - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

InIA - Internalina A

InIB - Internalina B

kb - Quilobase (s), 1.000 pb

kDa - Quilodalton (s), 1.000 Da

LLO - Listeriolisina O

MPa - Megapascal

MRS - "Man, Rogosa & Sharpe"

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

N/Asn - Asparagina

NCTC - "National Collection of Type Cultures"

OC - "Open Circle" (Círculo Aberto)

**ORF** – "Open Reading Frame" (Quadro de Leitura Aberto)

**PAGE –** "Polyacrylamide Gel Electrophoresis" (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)

pb - Par (es) de Bases

PCR - "Polymerase Chain Reaction" (Reação em Cadeia da Polimerase)

p/v - Peso por Volume

PC-PLC - Fosfolipase C Fosfatidil-Clorado

PI-PLC - Fosfolipase C Fosfatidil-Inositol

PrfA - Proteína Reguladora de Virulência

PLA - Polímero de Ácido Poliláctico

q.s.p - quantidade suficiente para

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RPM - Rotações Por Minuto

**SAM** – Substância (s) Antimicrobiana (s)

SE – "Staphylococcal Enterotoxins" (Enterotoxinas Estafilocócicas)

**SCN** – *Staphylococcus* coagulase-negativo (s)

**SCP** – *Staphylococcus* coagulase-positivo (s)

SDS – "Sodium Dodecil Sulfate" (Dodecil Sulfato de Sódio)

SSC - Salina/Citrato de Sódio

TAE – Tampão de Tris-Acetato-EDTA

TE - Tampão de Tris-EDTA

Tm – Temperatura de Desnaturação Média

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

**TSB** – "Tryptic-Soy Broth" (Caldo de Soja Tríptica)

TSST-1 – "Toxic Shock Syndrome Toxin 1" (Toxina da síndrome do Choque Tóxico 1)

**UA -** Unidades Arbitrárias

ufc - Unidades Formadoras de Colônia

**UI -** Unidade Internacional

**UHT –** "Ultra High Temperature" (Temperatura Ultra Alta)

VRE – Enterococcus Resistentes à Vancomicina

V/Val – Valina

v/v – Volume por Volume

**x***g* – Gravidades

**USPTO** – "United States Patent and Trademark Office"

Y/Tyr - Tirosina

# **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Resposta imunológica à multiplicação bacteriana no interior do úbere e a consequente morte de células epiteliais mamárias.	7
<b>Figura 2</b> – A ativação dos diversos fatores de virulência de <i>L. monocytogenes</i> após a sua ingestão e as etapas de infecção da célula hospedeira, desde a sua internalização até a sua disseminação para células adjacentes.	16
Figura 3 – Modo de ação das bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.	22
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática dos genes envolvidos na biossíntese das aureocinas A70 e A53.	31
<b>Figura 5</b> – As BAL produzem diversos metabólitos antimicrobianos durante a fermentação, tendo as bacteriocinas grande atividade inibitória.	34
Figura 6 – Estrutura da nisina.	37
<b>Figura 7</b> – Perfil de DNA plasmideal das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. produtoras de SAM, determinado através de EGA a 0,7% (p/v) por 7 h a 70 V.	71
<b>Figura 8</b> – Análise dos produtos de amplificação do operon <i>aur</i> ABCD através de EGA a 1,4% (p/v), por 2 h a 50 V.	72
<b>Figura 9</b> – Hibridização DNA/DNA empregando-se sonda para a detecção do operon <i>aur</i> ABCD.	73
<b>Figura 10</b> – Cinética de produção da SAM 4244 em meios BHI, GBHI, M17, GM17, e TSB a 37°C durante 24 h de cultivo da estirpe <i>Staphylococcus</i> spp. 4244.	79
<b>Figura 11</b> – Cinética de crescimento e produção da SAM 4244 em meio BHI durante cultivo da estirpe <i>Staphylococcus</i> spp. 4244 a 37°C por 24 h.	80
<b>Figura 12</b> – Titulação da SAM 4244 após concentração com sulfato de amônio, utilizando-se <i>M. luteus</i> como indicadora.	
Figura 13 – Atividade da SAM 4244 contra M. luteus sob ação de pH 6,0 e pH	81
11,0.	83

Figura 14 – Atividade da SAM 4244 contra M. luteus após tratamento térmico a	
100°C por 15 min e 121°C por 15 min.	83
Figura 15 – Perfil de atividade da SAM em SDS-PAGE.	84
Figura 16 – Cinética de ação da SAM 4244 contra a indicadora <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117.	85
<b>Figura 17 –</b> Atividade da SAM 4244 contra a indicadora <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117 em leite UHT desnatado) e em meio TSB.	86
<b>Figura 18 –</b> Atividade da SAM 4244 contra a indicadora <i>S. aureus</i> A70 Bac <sup>-</sup> em leite UHT desnatado e em meio TSB.	87

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Os principais componentes do leite e seus respectivos benefícios	3
Tabela 2 – Classificação mundial dos principais produtores de leite em 2007	4
<b>Tabela 3 –</b> Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas.	21
<b>Tabela 4</b> – Bacteriocinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp.	26
<b>Tabela 5</b> – Algumas diferenças entre as bacteriocinas e os antibióticos	35
Tabela 6 – Exemplos da aplicação de nisina em alguns países	36
<b>Tabela 7</b> – Exemplos de bacteriocinas patenteadas com potencial aplicação em alimentos	38
<b>Tabela 8 –</b> Espectro de ação de algumas estafilococcinas contra patógenos de humanos e de animais	50
<b>Tabela 9</b> – Estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. previamente estudadas, empregadas neste trabalho	54
<b>Tabela 10</b> – Estirpes bacterianas empregadas como indicadoras no estudo sobre o espectro de ação das SAM	55
<b>Tabela 11</b> – Oligonucleotídeos iniciadores, $t_m$ e concentrações de cloreto de magnésio empregados nas PCR para a amplificação dos genes estruturais de diferentes bacteriocinas	60
<b>Tabela 12</b> – Atividade das SAM produzidas por estirpes isoladas de gado com mastite contra a indicadora <i>C. fimi</i>	69
<b>Tabela 13</b> – Perfil de sensibilidade das SAM a enzimas proteolíticas e ao hidróxido de sódio	70
Tabela 14 – Espectro de ação das estirpes produtoras de SAM	74
Tabela 15 – Espectro de ação da SAM 4244	75

**Tabela 16** – Estabilidade da SAM 4244 sob a ação de diferentes valores de pH, temperaturas e enzimas proteolíticas

82

# 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos é responsável por grandes perdas econômicas para as indústrias de alimentos. Além disso, a ingestão de alimentos contaminados por patógenos pode causar diversos tipos de infecções e intoxicações alimentares (CLEVELAND *et al.*, 2001; CDC, 2009).

Listeria monocytogenes é um importante patógeno alimentar, sendo responsável por uma alta taxa de mortalidade. O *Staphylococcus aureus* é outro patógeno relevante veiculado por alimentos. Ambos estão envolvidos em inúmeros surtos alimentares em diversos países, inclusive em países desenvolvidos, como os EUA. A veiculação desses patógenos por alimentos tem se tornado ainda mais preocupante devido ao elevado número de estirpes apresentando um perfil de multirresistência a drogas, inclusive aos últimos antimicrobianos empregados no tratamento de doenças, como a vancomicina (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; SERGELIDIS & ABRAHIM, 2009; JAGLIC *et al.*, *in press*).

Mesmo com tantos avanços tecnológicos, ainda hoje existe um grande debate acerca dos métodos mais adequados para a preservação de alimentos. Além da segurança e da necessidade de se prolongar a vida de prateleira dos alimentos, tem-se verificado ultimamente, por parte dos consumidores, uma grande demanda por alimentos mais naturais, minimamente processados e sem aditivos guímicos (GÁLVEZ et al., 2008).

Diante desta necessidade de um método alternativo que seja natural, seguro e eficaz para a preservação de alimentos, as bacteriocinas surgem como um potencial biopreservativo a ser empregado na indústria de alimentos. Bacteriocinas são peptídeos bioativos que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de estirpes de uma mesma espécie ou de espécies evolutivamente relacionadas à bactéria produtora (DEEGAN *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2009).

As bacteriocinas são consumidas há muitos anos devido a sua produção durante a fermentação de alimentos, como queijos, iogurtes e bebidas. Por esta razão, essas bacteriocinas podem ser consideradas ingredientes naturais de alimentos. Os diversos estudos realizados nos últimos anos mostram que a aplicação de bacteriocinas na preservação de alimentos pode trazer muitos benefícios, tanto para a indústria alimentícia como para os consumidores (COTTER, HILL & ROSS, 2005; GÁLVEZ et al., 2007).

Atualmente, duas bacteriocinas são amplamente empregadas como biopreservativos de alimentos: a nisina, que é comercializada com o nome de Nisaplin®, sendo aplicada em queijos, produtos enlatados e cárneos em diversos países, e a pediocina PA-1, que é

comercializada como ALTA<sup>TM</sup> 2431 e é empregada para estender a vida de prateleira de uma série de alimentos, especialmente produtos cárneos prontos para consumo, apresentando alta atividade contra *L. monocytogenes* (RODRÍGUEZ, MARTÍNEZ & KOK, 2002; COTTER, HILL & ROSS, 2005).

No Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, as pesquisas por novas bacteriocinas com potencial aplicação biotecnológica se iniciaram em 1990. Desde então, foram identificadas algumas bacteriocinas com potencial aplicação, tanto como biopreservativos de alimentos quanto como antimicrobianos de aplicação clínica, como as aureocinas A70 e A53, produzidas por *S. aureus*. Contudo, até o momento, ainda não havia sido avaliada a atividade de nossas bacteriocinas diretamente em uma matriz alimentar (BASTOS *et al.*, 2009).

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 LEITE

Segundo a Instrução Normativa 51 (IN 51) de 18 de setembro de 2002, do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2002).

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos. Ele é de grande importância na alimentação humana devido ao seu elevado valor nutritivo, sendo fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas. O leite traz benefícios não somente às crianças, mas também para adultos e idosos. A ingestão diária deste alimento é importante na prevenção de algumas doenças, como obesidade, hipertensão, diabetes e osteoporose. A **Tabela 1** mostra as concentrações de alguns dos principais componentes do leite e seus respectivos benefícios à saúde. Contudo, como a composição do leite tem uma natureza dinâmica, pode variar de acordo com o estágio de lactação, idade, raça, nutrição e as condições de saúde do animal (McCARRON & HEANEY, 2004; HAUG, HØSTMARK & HARSTAD, 2007; EBRINGER, FERENČÍK & KRAJČOVIČ, 2008).

**Tabela 1** – Os principais componentes do leite e seus respectivos benefícios

Componentes do leite	Concentração em 1l de leite	Benefícios à saúde
Lactose	53 g	Produtos da lactosilação
Gorduras	33 g	Energia
Proteínas	32 g	Aminoácidos essenciais, proteínas
		bioativas, aumenta biodisponibilidade
Ácidos graxos saturados	19 g	Aumenta HDL, reduz LDL, inibição de
		bactérias e vírus
Cálcio	1,1 g	Óssos, dentes, pressão sanguínea,
		controle de peso
Ácido Linoleico	1,2	Ômega 6
Magnésio	100 mg	Para idosos, tratamento de asma
Zinco	4 mg	Sistema imune
Vitamina E	0,6 mg	Antioxidante
Vitamina A	280 μg	Visão, diferenciação celular
Selênio	37 μg	Câncer, alergia

HAUG, HØSTMARK & HARSTAD, 2007.

O leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como o café beneficiado e o arroz. O agronegócio de leite e derivados desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de empregos e renda para a população (EMBRAPA, 2003).

Atualmente, o Brasil possui uma posição de destaque no cenário mundial de produção de leite, ocupando o sexto lugar no "ranking" mundial (**Tabela 2**). Contudo, a produtividade do rebanho leiteiro brasileiro é relativamente baixa quando comparada à de outros países. Esta baixa produtividade é decorrente de problemas no início da cadeia produtiva do leite, visto que vários fatores podem afetar a baixa produção de animais em lactação, como o manejo inadequado, a nutrição deficiente, a pouca ou nenhuma seleção genética e o baixo controle de sanidade animal (EMBRAPA, 2009).

Tabela 2 - Classificação mundial dos principais produtores de leite em 2007

Posição Mundial	País	Produção de leite (mil t)	Produtividade (ton/cabeça)
1°	EUA	84.189	9,22
2°	Índia	42.140	1,11
3°	China	32.820	3,11
4°	Rússia	31.950	3,4
5°	Alemanha	27.900	6,92
6°	Brasil	26.134	1,24
7°	França	23.705	6,24
8°	Nova Zelândia	15.841	3,82
9°	Reino Unido	14.450	7,19

EMBRAPA (2009).

O leite, ao ser sintetizado e secretado nos alvéolos da glândula mamária, é estéril, mas ao ser retirado pode ser contaminado com a microbiota anfibiôntica originária da superfície das tetas e do úbere do animal. Além disso, o leite pode sofrer contaminação devido a práticas inadequadas de manejo na ordenha, higienização deficiente de equipamentos em sala de ordenha, armazenamento e conservação inadequados e higienização deficiente de equipamentos de beneficiamento. Deve-se considerar também as inúmeras fontes de contaminação provenientes de todo o ambiente da fazenda (BRITO; BRITO, 2001; LeJEUNE; RAJALA-SCHULTZ, 2009).

A grande disponibilidade de nutrientes no leite, a sua alta atividade de água e o seu pH (próximo da neutralidade) tornam o leite um meio extremamente favorável ao

crescimento microbiano. Esta contaminação pode atingir números na ordem de milhões de bactérias por ml, podendo incluir tanto microrganismos patogênicos como deteriorantes. A contaminação microbiana prejudica a qualidade do leite, interfere na industrialização, reduz o tempo de prateleira do leite fluido e derivados lácteos e pode colocar em risco a saúde do consumidor (BRITO & BRITO, 2001; ARCURI *et al.*, 2006).

O ambiente da fazenda de gado leiteiro é um importante reservatório para diversos patógenos alimentares. Alguns trabalhos relatam a frequência de contaminação do leite ainda na fazenda por patógenos, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (OLIVER, JAYARAO & ALMEIDA, 2005; LeJEUNE & RAJALA-SCHULTZ, 2009).

A ingestão de leite e de derivados lácteos contaminados por patógenos pode provocar intoxicações e/ou infecções alimentares. Nos EUA, somente em 2007, foram confirmados 147 casos veiculados por *C. jejuni* e *Campylobacter* spp., 13 casos por *Salmonella* spp. e cinco por *L. monocytogenes* (resultando em três mortes) (CDC, 2007). Infelizmente, no Brasil, não há dados oficiais sobre esses surtos alimentares, visto que, no caso de relatos de infecções alimentares, o único que se obriga de médicos e hospitais é com relação àquelas provocadas pela bactéria *Clostridium botulinum*, que causa o botulismo (Portaria n° 1.943 de 18 de outubro de 2001 - ANVISA).

Uma das principais causas que exercem influência extremamente prejudicial sobre a produtividade, a composição do leite e o potencial risco à saúde dos consumidores é a mastite bovina.

#### 2.2 MASTITE BOVINA

A mastite bovina é a principal doença que acomete o gado leiteiro em todo o mundo. Esta doença é caracterizada por um processo inflamatório nas glândulas mamárias, tendo caráter geralmente infeccioso. De acordo com a intensidade do processo inflamatório, a mastite pode ser classificada como clínica, subclínica ou crônica, e o seu grau depende da natureza do agente, da idade, da raça e da saúde do animal (RIBEIRO *et al.*, 2003; VIGUIER *et al.*, 2009).

A mastite clínica apresenta sinais evidentes, tais como: edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus e alterações macroscópicas das características do leite. Na forma subclínica, os sinais não são evidentes, não havendo sinais visíveis de inflamação do úbere e não apresentando alterações aparentes das características do leite (RIBEIRO *et al.*, 2003). No entanto, este

tipo de infecção pode ser detectado através de cultura bacteriana e de provas indiretas do leite, onde se verifica o aumento típico na contagem de células somáticas (CCS). A mastite crônica é a forma mais rara da doença e resulta em uma inflamação persistente da glândula mamária (QUINN et al., 2000; BRADLEY, 2002; VIGUIER et al., 2009).

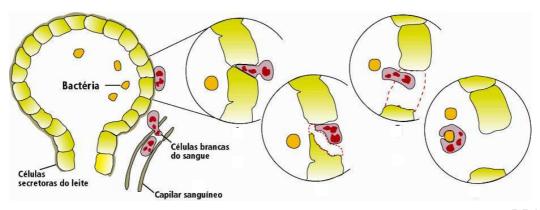
A mastite bovina é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, sendo responsável por uma redução temporária da quantidade de leite produzida, ou até mesmo pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Calcula-se que um único quarto infectado durante o período de lactação possa reduzir a produção de leite de uma vaca entre 7 e 64% (RIBEIRO *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2007).

Esta doença pode ser causada por agentes físicos ou químicos, mas os principais agentes são microbianos, incluindo bactérias, micoplasmas, leveduras, fungos e algas. Há também o relato de vírus associados à mastite. Já foram descritas 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros onde se observa a predominância de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (QUINN et al., 2000; RIBEIRO et al., 2003; VIGUIER et al., 2009).

Os microrganismos causadores da mastite podem ser classificados em dois grupos, de acordo com a fonte de infecção e o modo de transmissão: microrganismos contagiosos, transmitidos principalmente durante a ordenha, e microrganismos ambientais. Os patógenos contagiosos podem ser considerados organismos adaptados a sobreviverem no corpo do animal, neste caso, na glândula mamária, sendo capazes de estabelecer infecções subclínicas. Já os patógenos ambientais, encontrados no ar, solo, água e fezes, são descritos como sendo invasores oportunistas. No grupo dos patógenos contagiosos, encontram-se S. aureus, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus Mycoplasma spp., Corynebacterium bovis e L. monocytogenes. Já o segundo grupo inclui a família Enterobacteriaceae (principalmente Escherichia coli), Streptococcus uberis, outros Streptococcus spp., Actinomyces pyogenes, Pseudomonas spp., além de fungos e algas clorofiladas do gênero Prototheca spp. (BRADLEY, 2002; RAWOOL et al., 2007; ZHAO & LACASSE, 2008).

A glândula mamária é responsável pela captação de nutrientes disponíveis na circulação sanguínea, oriundos da absorção via trato gastrintestinal ou de reservas corporais, para a produção do leite através de células epiteliais presentes nesta glândula. O canal do teto apresenta algumas barreiras que evitam a entrada de patógenos. No entanto, uma vez dentro do teto, as bactérias induzem os mecanismos de defesa celular e humoral do hospedeiro (**Figura 1**). Se não for eliminado, esse microrganismo pode ser capaz de começar a se multiplicar na glândula mamária e liberar toxinas, atraindo células do sistema imune, principalmente neutrófilos. A ação dos neutrófilos resulta na liberação de agentes

oxidantes e proteases, que, além de atuarem contra a bactéria, destroem algumas células epiteliais, resultando na redução da produção de leite e na liberação de enzimas no leite. Além disso, as células epiteliais mamárias e os leucócitos mortos são secretados no leite, levando a um aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite (ZHAO & LACASSE, 2008; VIGUIER *et al.*, 2009).



DPA (2007).

**Figura 1 -** Resposta imunológica à multiplicação bacteriana no interior do úbere e a consequente morte de células epiteliais mamárias.

A CCS no leite é uma ferramenta de grande valor na avaliação e estimativa das perdas quantitativas e qualitativas da produção de leite e derivados. O aumento do número de células somáticas está diretamente relacionado à baixa qualidade do leite, havendo alterações no teor dos principais componentes do leite: caseína, lactose, gordura, cálcio e fósforo. Estas alterações causam prejuízos tanto para o produtor de leite (devido à redução da produção e qualidade), quanto para a indústria de laticínios (devido à alteração nas propriedades organolépticas e à diminuição do rendimento industrial e da qualidade do produto final) (COSTA, 1998; SCHÄELLIBAUM, 2000).

Levando-se em consideração que o leite obtido de quartos mamários de animais sadios apresenta uma contagem de aproximadamente 50.000 células/ml, um estudo recente relacionou os custos da mastite com o aumento da CCS, verificando que, em uma produção de 8.500 kg de leite por vaca, com contagem inferior a 100.000 células/ml, o custo é de € 53, sendo bastante elevado quando em CCS superiores: € 72, em contagem entre 100.000 e 200.000 células/ml; € 77, entre 200.000 e 250.000 células/ml; € 94, entre 250.000 e 400.000 células/ml e de € 120, para CCS maior do que 400.000 células/ml (HUIJPS, LAM & HOGEVEEN, 2008).

Além do custo relativo à redução na produção e qualidade leiteira, deve-se considerar os custos relativos ao tratamento da mastite, ao descarte de leite após o emprego de antibióticos e à redução de vida produtiva do gado, além de seu abate precoce (SEEGERS, FOURICHON & BEAUDEAU, 2003; VIGUIER *et al.*, 2009). Estima-se que 38% dos custos com doenças na pecuária são referentes a tratamentos para a mastite bovina, que é responsável por alta mortalidade de gado lactente e a causa mais comum da morte de gado adulto (KOSSAIBATI & ESSLEMONT, 1997; ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 1997; BRADLEY & GREEN, 2001).

Alguns estudos sugerem que os prejuízos devido à mastite bovina sejam de aproximadamente US\$ 35 bilhões em todo o mundo. Nos Estados Unidos, os custos podem chegar a US\$ 2 bilhões por ano. Já na Inglaterra, o custo é de aproximadamente € 300 milhões. Estima-se que o prejuízo brasileiro seja ainda maior do que o verificado nos EUA e na União Européia (RUEGG, 2005; COSTA, 2009; VIGUIER *et al.*, 2009).

A terapia antimicrobiana é a prática mais empregada para o tratamento da mastite bovina. Contudo, o uso indiscriminado de antibióticos - sem a identificação do patógeno, de seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos antes do início do tratamento e sem prescrição técnica adequada - tem resultado no aumento da frequência de resistência antimicrobiana entre os agentes envolvidos na mastite, dificultando ainda mais o tratamento (BRADLEY, 2002; BARKEMA, SCHUKKEN & ZADOKS, 2006; OCHOA-ZARZOSA *et al.*, 2008).

O emprego extensivo de antibióticos para o tratamento e a prevenção da mastite interfere diretamente na qualidade do leite, sendo o maior responsável pela contaminação do leite e de seus derivados por resíduos de antimicrobianos. A prevenção de resíduos de antibióticos no leite é essencial para a indústria de laticínios, visto que esses resíduos podem inibir o crescimento das culturas lácteas utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos, dificultando a obtenção ou alterando a qualidade final, além de promoverem a formação de odores desagradáveis em manteigas e cremes de leite (BRITO & LANGE, 2005; SAWANT, SORDILLO & JAYARAO, 2005). Contudo, o fator principal para a exigência do uso adequado dos antibióticos e o controle de resíduos no leite é a garantia de segurança alimentar, já que essas substâncias podem oferecer risco à saúde do consumidor. Esses riscos são representados por reações alérgicas, frequentemente associadas a penicilinas, e ação carcinogênica. Adicionalmente, pode ocorrer a seleção de bactérias resistentes da microbiota anfibiôntica e possivelmente a transferência dessa resistência a outras bactérias sensíveis (COSTA, 2002; ANDREW *et al.*, 2009).

S. aureus é reconhecido mundialmente como a causa mais frequente de mastite clínica e subclínica em gado leiteiro. A sua prevalência varia de 5 a 50% nos rebanhos de diferentes países (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007; BARKEMA et al., 2009). No Brasil, relatos do isolamento de S. aureus de mastite subclínica são conhecidos desde o início da década

de 50. Desde então, trabalhos realizados nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do país têm mostrado a predominância de *S. aureus* sobre os demais agentes da doença (RIBEIRO *et al.*, 2003). Este patógeno é um dos mais difíceis de serem controlados, pois se dissemina rapidamente no rebanho e, uma vez estabelecido na glândula mamária do animal, é de difícil erradicação (LAMMERS *et al.*, 2001; BARKEMA *et al.*, 2009). A mastite causada por este microrganismo pode evoluir para uma infecção intramamária crônica, resultando em baixa eficiência do tratamento antibiótico (SAID, ZHU & ZHAO, 2010).

A dificuldade em se erradicar o *S. aureus* dos casos de mastite bovina está relacionada a alguns fatores, como a capacidade desses microrganismos invadirem as células epiteliais mamárias, a produção de uma toxina (leucocidina) que rompe as membranas dos neutrófilos, a formação de abscessos que os protege dos neutrófilos, a habilidade de sobreviverem nos fagócitos, a produção de biofilme que os protege da resposta imune e da ação de antibióticos e a resistência a diversos antibióticos, dentre outros fatores (BARKEMA, SCHUKKEN & ZADOKS, 2006).

Nos últimos anos, os *S. aureus* têm despertado grande atenção devido a sua resistência a drogas. *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), normalmente isolados de seres humanos, têm sido isolados de diversos casos de mastite bovina e também de outros animais. Ao se avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana dessas estirpes MRSA, tem-se verificado que algumas não são apenas resistentes a drogas beta-lactâmicas, mas também resistentes a outros antibióticos comumente utilizados no tratamento animal (TURUTOGLU *et al.*, 2009).

#### 2.3 GÊNERO Staphylococcus

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae e, segundo Euzéby (2009a), é composto por 41 espécies e 24 subespécies. Os *Staphylococcus* spp. são bactérias Gram-positivas em forma de cocos, anaeróbias facultativas, catalase-positivas e possuem um genoma com baixo conteúdo de G + C, entre 30 e 39%. A divisão celular desses cocos pode ocorrer em vários planos, originando cachos irregulares, sendo esta a característica que deu nome ao gênero, que é originado do grego "staphylé", que significa cacho de uva (LYON & SKURRAY, 1987; BANNERMAN & PEACOK, 2007).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são amplamente difundidas na natureza, sendo encontradas principalmente na pele e nas mucosas de mamíferos e pássaros, fazendo parte da microbiota anfibiôntica desses animais. Também podem ser encontradas na boca, nas glândulas mamárias e nos tratos intestinal, gênito-urinário e respiratório

superior. Esses microrganismos geralmente têm relação comensal ou simbiôntica com o seu hospedeiro. No entanto, em casos de rompimento do tecido, de baixa imunidade do hospedeiro e de inoculação por procedimentos invasivos, pode haver o desenvolvimento de infecções estafilocócicas (BANNERMAN & PEACOK, 2007).

De acordo com a capacidade de produzir coagulase, uma enzima que coagula o sangue, o gênero *Staphylococcus* pode ser dividido em dois grupos: os *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP), representados principalmente pela espécie *S. aureus*, que são estafilococos capazes de produzir coagulase e, portanto, de promover a coagulação sanguínea, e os *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), que são os estafilococos que não produzem a coagulase, sendo, portanto, incapazes de promover a coagulação sanguínea (BANNERMAN & PEACOK, 2007).

## 2.3.1 Staphylococcus coagulase-negativos

Por muitos anos, desde o primeiro relato de SCN em 1880, clínicos e microbiologistas acreditavam que os SCN eram microrganismos não patogênicos. Os SCN eram vistos apenas como contaminantes de amostras clínicas, sendo a espécie *S. aureus* considerada a única patogênica do gênero. Somente em 1958, foi publicado o primeiro relato sobre o potencial patogênico dos SNC em pacientes com septicemia, havendo, ao longo dos anos, relatos isolados de SCN envolvidos em endocardite e infecção urinária (BANNERMAN & PEACOK, 2007; PIETTE & VERSCHRAEGEN, 2009; ROGERS, FEY & RUPP, 2009).

A partir da década de 70, a importância dos SCN em espécimes clínicos tornou-se crescente, devido à identificação desses microrganismos como patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos e em tratamento hospitalar intensivo, como pacientes transplantados, com neoplasias e recém-nascidos prematuros, e devido ao aumento do uso de dispositivos médicos, como cateteres intravasculares e próteses (BANNERMAN & PEACOK, 2007). As principais patologias causadas por SCN são relacionadas com procedimentos médicos invasivos, podendo causar infecções de sítio cirúrgico, endocardite, peritonite, endofitalmite, meningite, ventriculite e septicemia, dentre outras infecções (PIETTE & VERSCHRAEGEN, 2009; ROGERS, FEY & RUPP, 2009).

As infecções relacionadas a cateteres são as maiores responsáveis por bacteriemias causadas por SCN. A espécie *S. epidermidis* é responsável pela maioria das infecções relacionadas a dispositivos médicos. Provavelmente, isto ocorre porque esta bactéria faz parte da microbiota anfibiôntica da pele humana, resultando na alta probabilidade de

contaminação durante a inserção do dispositivo. Uma vez inserido, este microrganismo é capaz de se aderir e multiplicar nas células hospedeiras. A patogênese de *S. epidermidis* é devido principalmente à produção de polissacarídeos extracelulares, responsável pela formação do biofilme na superfície dos biomateriais. O biofilme serve como uma barreira contra o reconhecimento pelo sistema imune e a penetração de antibióticos e, por isso, uma vez estabelecido, torna a erradicação desse microrganismo ainda mais difícil (OTTO, 2009; ROGERS, FEY & RUPP, 2009).

Além da produção de biofilme, as infecções causadas por SCN ocorrem devido aos diversos fatores de virulência produzidos por esses microrganismos. Dentre esses fatores, pode-se citar a produção de elastase (uma cisteína-protease capaz de degradar IgM, IgA, albumina, fibrinogênio e fibronectina), de lipases, de enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE e SEH) e de toxina do choque tóxico-1 (TSST-1) (VON EIFF, PETERS & HEILMANN, 2002; CUNHA, CALSOLARI & JÚNIOR, 2007; ZELL *et al.*, 2008).

Além de *S. epidermidis*, existem outras espécies de SCN bastante estudadas devido ao seu potencial patogênico. *S. saprophyticus* é o segundo principal agente de infecção do trato urinário, que acomete principalmente mulheres jovens, com idades entre 18 e 35 anos, e sexualmente ativas (NYS *et al.*, 2006; ROGERS, FEY & RUPP, 2009). *S. lugdunensis* é o segundo principal causador de endocardite por SCN, sendo responsável por mais de 44% dos casos. A endocardite causada por este microrganismo é agressiva e resulta em alta taxa de mortalidade (FRANK, DEL POZO & PATEL, 2008). *S. haemolyticus* é o segundo SCN mais isolado de sangue, especialmente em neonatos, estando envolvido em diferentes tipos de infecções em humanos (BANNERMAN & PEACOK, 2007; ROGERS, FEY & RUPP, 2009).

Os SCN têm sido frequentemente isolados de casos de mastite bovina clínica e subclínica em diferentes países, havendo predominância das espécies *S. simulans* e *S. chromogenes*. Grande parte dos SCN isolados de mastite pode ser oportunista, proveniente do meio ambiente. Contudo, algumas espécies parecem se adaptar especificamente ao ambiente do úbere. A importância dos SCN como agentes da mastite bovina ainda é muito discutida. Enquanto alguns autores sugerem que a presença dos SCN no úbere do animal é uma proteção contra os principais patógenos associados à mastite bovina, havendo inclusive um aumento na produção de leite, outros autores relatam os SCN como patógenos emergentes, havendo relatos de mastite bovina causada por estes microrganismos, resultando em aumento característico na CCS no leite e na redução da produção leiteira (PYÖRÄLÄ & TAPONEN, 2009; SCHUKKEN *et al.*, 2009).

Apesar do potencial patogênico de algumas estirpes, muitas espécies de SCN possuem o "status" GRAS (geralmente reconhecida como segura), sendo tecnologicamente importantes na fabricação de diversos alimentos. Esses microrganismos estão envolvidos

nas reações desejáveis, como para sabor e aroma, durante o processo de amadurecimento de alimentos fermentados, principalmente em queijos. Em produtos cárneos, especialmente em salsichas, os SCN são empregados como cultura iniciadora do processo fermentativo a fim de elevar a qualidade e a segurança do produto final. Os principais SCN empregados em alimentos são *S. xylosus, S. carnosus* e *S. equorum* (IRLINGER, 2008; SIMEONI *et al.*, 2008; ROSENSTEIN & GÖTZ, 2010). Contudo, tem-se verificado nos últimos anos, inclusive entre estirpes isoladas de alimentos, uma alta taxa de resistência a antimicrobianos. Um estudo recente analisou algumas estirpes isoladas de uma planta de produtos cárneos quanto à presença de onze genes codificadores de resistência a antibióticos amplamente empregados em tratamentos clínicos, sendo verificada uma alta proporção de SCN e SCP multirresistentes a drogas, havendo alguns carreadores de mais de seis genes de resistência a antibióticos (SIMEONI *et al.*, 2008).

#### 2.3.2 Staphylococcus coagulase-positivos

O hábitat mais comum dos *S. aureus* é o trato respiratório superior. Estudos estimam que aproximadamente 20% da população sejam carreadores permanentes de *S. aureus*, 60% sejam carreadores transitórios, enquanto que somente 20% não carreiam *S. aureus* em sua microbiota anfibiôntica. Este microrganismo geralmente coloniza seus hospedeiros de forma assintomática. No entanto, sob condições adversas, como rompimento da barreira protetora da pele e baixa imunidade do hospedeiro (por exemplo, AIDS), pode se tornar patogênico (KLUYTMANS, BELKUM & VERBRUGH, 1997; CHAMBERS & DeLEO, 2009).

Das espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* é a que tem maior importância médica, sendo responsável por diversas doenças humanas e animais. Atualmente, este patógeno é o maior causador de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade (BANNERMAN & PEACOK, 2007). *S. aureus* é um patógeno bastante agressivo. As manifestações das doenças causadas por este microrganismo podem ser divididas em diferentes tipos: (i) infecções da pele e de tecidos moles, como furúnculos, celulites e impetigo; (ii) infecções de tecidos profundos, como ossos e articulações, válvulas cardíacas, baço e fígado, dentre outros; (iii) infecções pulmonares e do trato urinário e (iv) doenças causadas por toxinas, como, a síndrome da pele escaldada, a síndrome do choque tóxico e a intoxicação alimentar (BANNERMAN & PEACOK, 2007).

Diversos fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e a gravidade das infecções causadas por *S. aureus*. Desta forma, dentre outros fatores, pode-se citar: a coagulase, uma enzima que promove a formação de coágulos de fibrina e a deposição de

fibrina sobre os cocos, protegendo as bactérias revestidas do ataque das células hospedeiras; as citocinas, que incluem as hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , capazes de promover lise celular, principalmente de hemácias do hospedeiro; as nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase, que facilitam a invasão dos tecidos do hospedeiro; o inibidor estafilocócico de complemento (SCIN) e a proteína inibidora de quimiotaxia (CHIPS), que dificultam a resposta imune inata; a leucocidina, que promove a lise celular de leucócitos; as toxinas esfoliativas (ETA e ETB), responsáveis por descamação da pele e choque; as diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEA – SEE, SEG – SER e SEU) que causam intoxicação alimentar; a toxina do choque tóxico 1 (TSST-1), responsável por choque sistêmico, e o biofilme, que promove a aderência do *S. aureus* e proteção contra antibióticos e contra o sistema imune, dificultando o tratamento (DINGES, ORWIN & SCHLIEVERT, 2000; CUCARELLA *et al.*, 2004; CUNHA, CALSOLARI & JÚNIOR, 2007; CHIANG *et al.*, 2008; CHAMBERS & DeLEO, 2009).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) podem originar várias doenças, incluindo principalmente as intoxicações alimentares, resultantes do consumo de alimentos contaminados com quantidade suficiente de SE pré-formada. Os sintomas gastrintestinais normalmente têm um início rápido, de uma a seis horas após a ingestão do alimento, e frequentemente incluem náusea, vômito, diarréia e dor abdominal, acompanhada ou não de febre. Geralmente, a doença é autolimitada e a recuperação é rápida. Os surtos deste tipo de intoxicação alimentar são geralmente associados a alimentos de elevado teor de proteínas, como presunto, frango, salada de batata, salada de ovos e produtos lácteos (JORGENSEN et al., 2005a; RASOOLY & DO, 2009).

O leite é um ótimo substrato para o crescimento de *S. aureus* e muitos produtos lácteos têm sido associados com diversos surtos de infecções alimentares causados por este patógeno, em vários países. Na Noruega, em 2003, ocorreu um surto alimentar associado ao consumo de purê de batata feito com leite cru contaminado por *S. aureus* (JORGENSEN *et al.*, 2005b). Em 2000, no Japão, ocorreu um extenso surto, com 13.420 casos, devido ao consumo de diferentes produtos lácteos preparados com leite em pó desnatado contaminado com SEA (ASAO *et al.*, 2003). Recentemente, na Áustria, aproximadamente 40 crianças passaram mal após a ingestão de leite pasteurizado na escola, sendo confirmada intoxicação alimentar por *S. aureus* (SCHMID *et al.*, 2009). No Brasil, um estudo publicado em 2008 analisou a enterotoxigenicidade de algumas estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de produtos lácteos envolvidos em seis surtos de intoxicação alimentar, confirmando a enterotoxicidade das estirpes (VERAS *et al.*, 2008).

A contaminação dos produtos lácteos com *Staphylococcus* spp. pode ser atribuída à manipulação durante o processo de fabricação do alimento ou ao próprio leite, especialmente o originado de vacas com mastite (SCHMID *et al.*, 2009).

A contaminação de alimentos por microrganismos pode representar ainda outro problema, que é o possível contato do consumidor com estirpes resistentes a antimicrobianos (JAGLIC *et al.*, *in press*).

Nas últimas décadas, tem-se verificado a sucessiva aquisição de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos empregados. O uso indiscriminado de meticilina e outras penicilinas levou à emergência de estirpes de MRSA, havendo algumas estirpes simultaneamente resistentes a mais de 20 agentes antimicrobianos. Adicionando-se a isso, a partir de 1997, passaram a ser isoladas estirpes de MRSA resistentes à vancomicina, o último antibiótico ao qual as estirpes MRSA eram realmente sensíveis, dificultando ainda mais o tratamento e o controle das infecções estafilocócicas (HIRAMATSU *et al.*, 1997; ROBINSON & ENRIGHT, 2003; GILL *et al.*, 2005; CHAMBERS & DeLEO, 2009).

Assim como o *S. aureus*, a *L. monocytogenes* é um dos principais patógenos veiculados por leite e derivados. Este microrganismo é oriundo de diversas fontes na fazenda, sendo também um dos agentes envolvidos na mastite bovina.

#### 2.4 Listeria monocytogenes

O gênero *Listeria* representa um grupo de bactérias estreitamente relacionadas. Essas bactérias têm como características serem bastonetes Gram-positivos, com aproximadamente 0,5 µm de largura e 1-1,5 µm de comprimento, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, não capsulados, com um genoma com baixo conteúdo G+C e apresentando mobilidade entre 10 e 25°C (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; BATT, 2004; LIU, 2006).

Taxonomicamente, o gênero *Listeria* pode ser dividido em oito espécies, *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. seeligeri, L. innocua, L. welshimeri, L. grayi, L. denitrificans* e *L. murrayi.* Dentre estas, somente *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas potencialmente patogênicas e a doença infecciosa causada por estas bactérias é denominada listeriose (LOW & DONACHIE, 1997; BATT, 2004; EUZÉBY, 2009b).

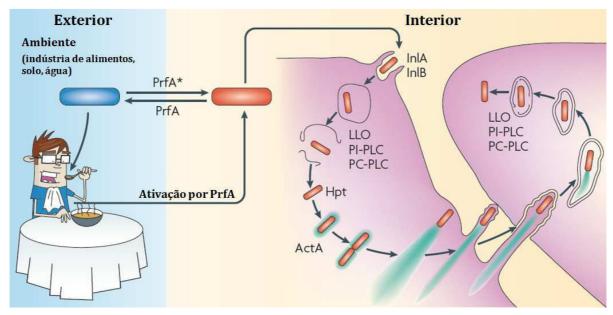
L. ivanovii (previamente identificada como L. monocytogenes sorotipo 5) é um patógeno principalmente animal, afetando raramente humanos. A grande maioria das estirpes isoladas está relacionada a abortos, natimortos e septicemias neonatais em ovelhas e bovinos. A espécie L. monocytogenes pode causar graves infecções localizadas ou generalizadas, tanto em humanos quanto em outros animais, como aves e mamíferos domésticos e silvestres (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; SNAPIR, VAISBEIN & NASSAR, 2006).

O primeiro relato sobre *Listeria* spp. foi feito em 1924, quando Murray, Webb e Swann isolaram a espécie *L. monocytogenes* como o agente etiológico de uma septicemia em coelhos e cobaias de laboratório na Inglaterra. Em humanos, os primeiros casos de listeriose foram registrados em 1929 na Dinamarca. Por muitos anos, o isolamento de *L. monocytogenes* em amostras clínicas foi um evento raro. No entanto, no final da década de 1970 e o início da década de 1980, o número de relatos sobre o isolamento deste microrganismo aumentou significativamente e, a partir de 1983, começou a ocorrer uma série de surtos epidêmicos na América do Norte e na Europa, ficando evidente a importância de *L. monocytogenes* como um patógeno alimentar (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

A espécie *L. monocytogenes* está presente em vários tipos de ambientes, como solos, água, efluentes e alimentos. Este microrganismo é tolerante a condições extremas de pH - como à elevada acidez de diversos alimentos, do suco gástrico e do fagossomo dos macrófagos - e de temperatura, podendo crescer na faixa de 2–45°C. A capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração (2–4°C) é um dos principais fatores que dificultam o controle deste patógeno em alimentos, visto que a refrigeração é uma das principais técnicas aplicadas a fim de se estender a vida de prateleira de diversos alimentos. Além disso, a técnica de preservação de alimentos através do uso de sais e da baixa atividade de água pode não ser efetiva contra *L. monocytogenes*, visto que este microrganismo é capaz de se adaptar e sobreviver em ambientes com alta concentração de sais (ROCOURT & COSSART, 1997; HILL *et al.*, 2002; COTTER & HILL, 2003; SLEATOR, GAHAN & HILL, 2003; LIU *et al.*, 2005).

Após a ingestão de um alimento contaminado por L. monocytogenes, a rota primária de infecção deste patógeno é o epitélio intestinal (Figura 2). Este microrganismo se adere às células hospedeiras através da expressão de proteínas de superfície, chamadas de internalinas InIA e InIB, que atuam promovendo a invasão celular. Uma vez internalizada, a L. monocytogenes secreta a listeriolisina O (LLO), que é uma citolisina formadora de poros (Figura 2). Além da LLO, duas fosfolipases (PI-PLC e PC-PLC) também atuam rompendo o fagossomo. Ao ser liberada no citosol da célula hospedeira, a L. monocytogenes é capaz de se duplicar utilizando nutrientes da célula infectada, que podem ser obtidos através do transportador de hexose-fosfato (Hpt) expresso por este patógeno. Posteriormente, a L. monocytogenes se move pela célula hospedeira em direção às células adjacentes devido à mobilidade obtida através da polimerização de actina, promovida pela proteína indutora de arranjos de actina (ActA), na sua superfície. Após a sua entrada nas células adjacentes, a L. monocytogenes secreta LLO, PI-PLC e PC-PLC, a fim de escapar do vacúolo secundário composto por duas membranas, resultantes da sua disseminação célula à célula. Todos esses fatores de virulência, envolvidos na infecção por L. monocytogenes, são regulados pelo regulador transcricional PrfA. Este regulador mantém os genes de virulência reprimidos

quando no ambiente, ativando-os quando em contato com a célula hospedeira (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LIU, 2006; FREITAG, PORT & MINER, 2009).



**Figura 2** - A ativação dos diversos fatores de virulência de *L. monocytogenes* após a sua ingestão e as etapas de infecção da célula hospedeira, desde a sua internalização até a sua disseminação para células adjacentes. PrfA (proteína reguladora de virulência), PrfA\* (PrfA ativa), InIA (internalina A), InIB (internalina B), LLO (listeriolisina O), PI-PLC (fosfolipase C fosfatidil-inositol) e PC-PLC (fosfolipase C fosfatidil-clorado), Hpt (transportador de hexose-fosfato) e ActA (proteína indutora de arranjos de actina) (FREITAG, PORT & MINER, 2009).

Durante os estágios iniciais da infecção, a listeriose humana geralmente apresenta sintomas não específicos, como, por exemplo, calafrios, fadiga, cefaleia, dores musculares e articulares e gastroenterite. No entanto, sem o tratamento adequado, a infecção pode evoluir para septicemia, meningite, encefalite, aborto e, em alguns casos, morte (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LIU, 2006).

A infecção por *L. monocytogenes* pode acometer todos os tipos de pessoas, contudo, a propensão a causar problemas severos é maior em mulheres grávidas, neonatos, idosos e em indivíduos imunocomprometidos. Mulheres grávidas possuem um risco 20 vezes maior de contrair listeriose do que os demais adultos saudáveis. Estudos revelam que aproximadamente 30% dos casos de listeriose são diagnosticados nessas mulheres, que apresentam um elevado risco de sofrer aborto espontâneo. Além disso, o índice de mortalidade de neonatos infectados é elevado, em torno de 50% (BORTOLUSSI, 2008).

O patógeno alimentar *L. monocytogenes* pode ser encontrado em uma grande variedade de matérias-primas e alimentos processados. Alimentos como leite (cru e

pasteurizado) e produtos lácteos (como manteigas e queijos), diversos produtos cárneos (como carne bovina, carne de porco, salsichas defumadas, linguiças, presunto e frios em geral) e avícolas, rabanete, repolho, marisco e peixe têm sido associados à contaminação por *L. monocytogenes*. Existem relatos de surtos de listeriose causados pela ingestão de alimentos como queijos, cachorros quentes, carne processada e frutos do mar (ROCOURT & COSSART, 1997; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007).

Atualmente, diversos fatores propiciam a contaminação de alimentos por *L. monocytogenes* e a incidência de listeriose. Dentre eles, pode-se citar as modificações recentes nas práticas de processamento e produção de alimentos, a globalização das indústrias de alimentos e a demanda crescente por alimentos com longa vida de prateleira. Além disso, as mudanças nos hábitos alimentares do consumidor, com uma tendência de consumo de alimentos minimamente processados, prontos para o consumo, refrigerados ou congelados, têm contribuído para a alta incidência de listeriose ao longo dos anos. Deve-se considerar também o aumento da expectativa de vida de indivíduos imunocomprometidos e de idosos devido aos avanços no campo da medicina (GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

Nas últimas décadas, tem havido um aumento da importância da *L. monocytogenes* como um patógeno alimentar, visto que a infecção de origem alimentar provocada por este microrganismo é responsável por uma alta taxa de mortalidade, que, em média, se aproxima dos 30%. Este índice ultrapassa os de outros importantes patógenos alimentares, como o da *Salmonella* Enteritidis (com uma mortalidade de 0,38%), os das espécies de *Campylobacter* (0,02 - 0,1%) e *Vibrio* (0,005-0,01%), mostrando a gravidade desta doença (ALTEKRUSE, COHEN & SWERDLOW, 1997; MEAD *et al.*, 1999; LIU, 2006).

Quando comparada a outros patógenos alimentares, *L. monocytogenes* é a responsável pela maior taxa de hospitalização (91%), estando ligada tanto a episódios isolados quanto a surtos alimentares, resultando em aproximadamente 500 mortes por ano nos EUA (MEAD *et al.*, 1999). Na União Européia, a maioria dos países tem apresentado uma incidência anual de casos de listeriose entre dois e dez casos por milhão (SERGELIDIS & ABRAHIM, 2009). Recentemente, ocorreu um grande surto no Canadá e, desde agosto de 2008, já morreram 21 canadenses após a ingestão de produtos cárneos produzidos pela empresa Maple Leaf (CLARK, 2009).

A *L. monocytogenes*, como já mencionado anteriormente, é um dos agentes causadores da mastite bovina. Este patógeno é amplamente difundido nas fazendas, estando presente no solo, nas fezes de animais, na silagem alimentar, que é um dos principais veículos de listeriose em gado, nos animais hospedeiros e no tanque de coleta de leite (NIGHTINGALE, *et al.*, 2004; OLIVEIRA, GUERRA & BERNARDO, 2008). Diante disso, o leite obtido nas fazendas pode ser contaminado com *L. monocytogenes* no momento da ordenha e em etapas posteriores do processamento dos produtos lácteos.

No Brasil, existem alguns registros da presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados. Dentre eles, Catão e Ceballos (2001), ao analisarem a qualidade microbiológica do leite *in natura* e de uma linha de produção (leite recém-pasteurizado e leite ensacado) em Campina Grande-PB, verificaram que, de um total de 75 amostras de leite (45 de leite cru, 15 de leite recém-pasteurizado e 15 de leite ensacado), 33 amostras de leite cru e nove de leite pasteurizado estavam contaminadas com *Listeria* spp., sendo identificadas *L. monocytogenes* em 17 amostras de leite cru e em nove de leite beneficiado (quatro recém-pasteurizadas e cinco ensacadas). Em 1998, Silva, Hofer e Tibana, ao pesquisarem a contaminação em vários tipos de queijos distribuídos no Rio de Janeiro, verificaram que aproximadamente 11% das 103 amostras foram positivas para *L. monocytogenes*, também sendo detectadas as espécies *L. innocua*, *L. grayi* e *L. welshimeri*.

Apesar desses dados evidenciarem a importância dos produtos lácteos na cadeia epidemiológica de transmissão de *L. monocytogenes*, no Brasil, o consumo de leite e de queijos não tem sido associado a surtos de listeriose. Provavelmente, isso ocorre devido ao fato desta doença não estar na Lista de Doenças de Notificação Compulsória (LDNC) e, também, devido à ausência de uma rede de vigilância de alimentos eficiente na pesquisa deste patógeno (CARMO *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2008). No Brasil, a única legislação que exige o controle de *L. monocytogenes* em alimentos processados é a destinada a queijos de média e alta umidade, como mussarela, ricota, meia cura e minas (RDC N° 12 de 02/01/2001- ANVISA).

Quanto à sensibilidade a antimicrobianos, as estirpes de *L. monocytogenes* são naturalmente sensíveis a penicilinas, aminoglicosídeos, trimetoprim, tetraciclina, macrolídeos e vancomicina (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). Contudo, estudos recentes têm relatado a alta taxa de resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes*, inclusive de estirpes isoladas de alimentos, como queijos. Em 2009, Harakeh *et al.* identificaram 30 estirpes de *L. monocytogenes* em um total de 160 amostras de queijos analisadas. Dentre as estirpes, 93,3% foram resistentes à oxacilina, 90% à penicilina, 60% à ampicilina e, surpreendentemente, 26,6% foram resistentes à vancomicina, que é um dos últimos antimicrobianos empregados no tratamento de infecções humanas. Esta resistência a antimicrobianos é uma situação preocupante para a saúde pública e mostra a importância do uso controlado dos antibióticos – a fim de se limitar a emergência de bactérias resistentes a drogas – e a necessidade de novos antimicrobianos efetivos contra essas estirpes.

Diante desse quadro alarmante de resistência a antimicrobianos, aumenta a necessidade de métodos alternativos para o controle e o tratamento de infecções causadas

por *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Uma alternativa que tem se mostrado bastante promissora é o uso de bacteriocinas.

#### 2.5 BACTERIOCINAS

Os peptídeos antimicrobianos sintetizados via ribossomo são amplamente distribuídos na natureza, sendo produzidos por bactérias, plantas e por vários animais (vertebrados e invertebrados). Os peptídeos bioativos produzidos por bactérias são conhecidos como bacteriocinas, classicamente definidas como peptídeos antimicrobianos com capacidade de matar ou inibir o crescimento de outras bactérias geralmente evolutivamente relacionadas à estirpe produtora (ZASLOFF, 2002; COTTER, HILL & ROSS, 2005; NISSEN-MEYER et al., 2009; BASTOS et al., 2009).

As bacteriocinas, de um modo geral, são muito mais potentes do que os peptídeos antimicrobianos produzidos por eucariotos, visto que, enquanto os peptídeos antimicrobianos de eucariotos são ativos em concentrações micromolares, as bacteriocinas atuam em concentrações nanomolares (NISSEN-MEYER *et al.*, 2009). As bacteriocinas podem apresentar um espectro de ação reduzido, inibindo apenas estirpes de uma mesma espécie, ou um amplo espectro de ação, podendo ter atividade até mesmo sobre espécies pertencentes a outros gêneros (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

As estirpes produtoras de bacteriocinas apresentam um sistema de imunidade que confere proteção contra a sua própria bacteriocina. Cada bacteriocina possui um sistema de imunidade correspondente, que é expresso concomitantemente aos genes estruturais da bacteriocina (HENG et al., 2007; BASTOS et al., 2009).

Uma grande diversidade de bactérias já foi descrita como sendo produtora de bacteriocinas. Segundo Klaenhammer, 99% de todas as espécies de bactérias são capazes de produzir pelo menos um tipo de bacteriocina (KLAENHAMMER, 1988; RILEY & WERTZ, 2002). A ampla difusão de estirpes produtoras de bacteriocinas, principalmente entre as bactérias do ácido láctico (BAL), se dá, em parte, pelo fato dos genes codificadores serem bastante encontrados em plasmídeos e transpósons conjugativos. Contudo, no caso de muitas bacteriocinas, os determinantes genéticos para a sua produção estão presentes no cromossomo (JACK, TAGG & RAY, 1995; COTTER, HILL & ROSS, 2005).

As bacteriocinas formam um grupo muito heterogêneo de proteínas e peptídeos, sendo por isso de difícil classificação. Na literatura, são sugeridas algumas formas de classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas. No entanto, ainda não há um esquema definitivo de classificação. Com base nas características das bacteriocinas produzidas por BAL, as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas

são atualmente divididas em três grandes classes (**Tabela 3**), de acordo com as suas características estruturais e o modo de ação: classe I, classe II e classe III (COTTER, HILL & ROSS, 2005; CEOTTO, 2009; NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

# 2.5.1 CLASSE I OU LANTIBIÓTICOS

A classe I ou lantibióticos é composta por peptídeos pequenos (menores do que 5 kDa) e termoestáveis que contêm ácidos aminados modificados pós-tradução, como lantionina e β-metil-lantionina, entre outros. A lantionina é formada quando uma serina desidratada, Dha (dideidroalanina), é atacada por um grupo sulfidrila de uma cisteína próxima e a β-metil-lantionina é gerada da mesma forma, quando uma dideidrobutirina, Dhb (treonina desidratada), é atacada (McAULIFFE, ROSS & HILL, 2001; COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Para a biossíntese dos lantibióticos, é necessária primeiramente a formação do prépeptídeo, seguindo-se as reações de desidratação e de ligação cruzada, a clivagem do
peptídeo-líder e a sua posterior secreção. Além disto, a célula deve ser imune ao lantibiótico
por ela produzido. Assim sendo, além dos genes estruturais para a formação dos prépeptídeos (*lanA*), são necessários outros genes: que codifiquem as enzimas envolvidas nas
reações de modificação (LanB, LanC/LanM); as proteínas acessórias, incluindo as proteases
responsáveis pela remoção do peptídeo-líder (LanP); as proteínas da superfamília dos
transportadores ABC, envolvidas na secreção do peptídeo (LanT); as proteínas de
regulação (LanR, LanK) e as proteínas responsáveis pelo mecanismo de imunidade da
célula produtora a sua própria bacteriocina (LanI, LanH e LanEFG) (McAULIFFE, ROSS &
HILL, 2001). Recentemente, os lantibióticos foram reagrupados em quatro tipos, A, B, C e D
(HENG et al., 2007; BIERBAUM & SAHL, 2009; CEOTTO, 2009).

Os lantibióticos do tipo A são peptídeos com estrutura mais alongada e flexível, geralmente com mais de 34 resíduos de ácidos aminados, catiônicos e atuam formando poros na membrana plasmática das células sensíveis (**Figura 3**), levando à dissipação do potencial de membrana, ao efluxo de metabólitos intracelulares e à inibição do transporte de ácidos aminados (McAULIFFE, ROSS & HILL, 2001). De acordo com as enzimas de modificação, os lantibióticos do tipo A podem ainda ser classificados nos subtipos AI e AII. Os lantibióticos do subtipo AI apresentam duas enzimas de modificação, LanB e LanC, envolvidas na formação do anel tioéter que confere a estrutura policíclica dos lantibióticos. A nisina é o protótipo deste grupo, que inclui também epidermina, Pep5, epilancina K7 e epicidina 280. O subtipo AII inclui os lantibióticos que apresentam uma enzima bifuncional, LanM, e é representado pela lacticina 481 (BIERBAUM & SAHL, 2009).

**Tabela 3 -** Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas

Classificação	Características	Subclasses	Exemplos (Referências)
Classe I (lantibióticos)	Peptídeos pequenos (< 5 kDa) contendo ácidos aminados pouco comuns,	<b>Tipo A:</b> flexíveis e alongados e que atuam sobre a membrana plasmática	Nukacina ISK-1 (SASHIHARA <i>et al.</i> , 2000)
	como lantionina e β-metil- -lantionina	<b>Tipo B:</b> peptídeos com estrutura globular e que atuam por inibição enzimática da biossíntese da parede celular	Mersacidina (BIERBAUM & SAHL, 2009)
		Tipo C: lantibióticos de dois componentes	Estafilococcina C55 (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998)
		<b>Tipo D:</b> atividade antimicrobiana reduzida, ou sem atividade bactericida	SapT (BIERBAUM & SAHL, 2009)
Classe II Peptídeos pequenos (< 10 kDa), que não		IIa: peptídeos do tipo pediocina	Pediocina PA-1 (MARUGG <i>et al.</i> , 1992)
	apresentam ácidos	IIb: complexo formado por dois peptídeos	Lactococcina G (NISSEN-MEYER et al., 1992)
	aminados modificados	IIc: bacteriocinas cíclicas	Enterocina AS-48 (MAQUEDA et al., 2008)
	Ild: bacteriocinas compostas por um único peptídeo do tipo não pediocina	Aureocina A53 (NETZ et al., 2002)	
		Ile: complexos compostos por três ou mais peptídeos	Aureocina A70 (NETZ et al., 2001)
Classe III	Peptídeos maiores do que	IIIa: bacteriolisinas	Lisostafina (BASTOS <i>et al.</i> , 2009)
	10 kDa e geralmente termolábeis	IIIb: bacteriocinas não líticas	Helveticina J (THOMPSON, COLLINS & MERCER, 1996)

CEOTTO (2009).

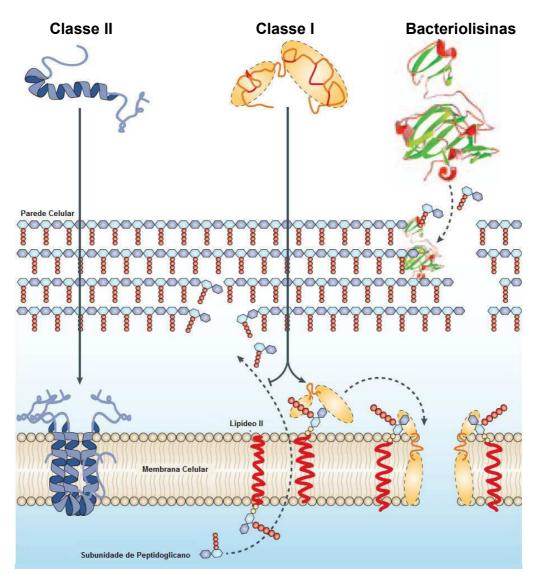


Figura 3 – Modo de ação das bacteriocinas de bactérias Gram-positivas. Algumas bacteriocinas de classe I, como a nisina, podem apresentar dois modos de ação distintos. Elas podem se ligar ao lipídeo II, o transportador de subunidades de peptidoglicano do citoplasma para a parede celular, inibindo a síntese de parede, levando à morte celular. Adicionalmente, também podem utilizar o lipídeo II como um ligante para iniciar o processo de inserção na membrana e a formação de poros, levando também à morte celular. Geralmente, os peptídeos da classe II têm uma estrutura helicoidal anfipática, que lhes permite se inserirem na membrana celular, promovendo despolarização e morte. As bacteriolisinas, bacteriocinas de classe III, como a lisostafina, podem atuar diretamente na parede celular de bactérias Gram-positivas, levando-as à lise celular (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Bierbaum e Sahl (2009) propuseram ainda um terceiro subtipo de lantibióticos do tipo A, incluindo peptídeos que não possuem atividade antimicrobiana ou a possuem de forma reduzida. Contudo, Ceotto (2009) propôs a classificação desses lantibióticos em um novo tipo, lantibióticos do tipo D. Esses lantibióticos conferem outras funções para o hospedeiro, incluindo ação morfogenética, como é o caso de SapT e de SapB.

Os lantibióticos do tipo B são peptídeos globulares, com mais de 19 resíduos de ácidos aminados, e que, diferentemente do tipo A, não formam poros na membrana. Eles atuam inibindo a atividade de enzimas essenciais, como as envolvidas na biossíntese de parede celular. Os lantibióticos mesarcidina, cinamicina, duramicina e actagardina são exemplos deste grupo (SAHL, JACK & BIERBAUM, 1995; COTTER, HILL & ROSS, 2005; BIERBAUM & SAHL, 2009).

Já os lantibióticos do tipo C são bacteriocinas compostas por dois peptídeos que possuem pouca ou nenhuma atividade quando isolados. Porém, quando juntos, atuam em sinergismo, resultando em uma alta atividade antimicrobiana. Os membros mais bem estudados deste grupo são a lacticina 3147 e a estafilococcina C55 (HENG *et al.*, 2007; O' CONNOR *et al.*, 2007; BASTOS *et al.*, 2009).

#### 2.5.2 **CLASSE II**

A classe II é composta por pequenos peptídeos (menores do que 10 kDa) termoestáveis que, diferentemente dos lantibióticos, não apresentam ácidos aminados modificados pós-tradução (lantionina ou β-metil-lantionina, entre outros) em sua estrutura. Para a biossíntese das bacteriocinas da classe II, são necessários pelo menos quatro genes que codificam: o peptídeo-líder, a proteína de imunidade, um transportador do tipo ABC (responsável por processar e/ou secretar a bacteriocina) e a proteína acessória. Em alguns casos, estão presentes também genes codificadores de proteínas envolvidas em regulação (DRIDER *et al.*, 2006; NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

Os peptídeos da classe II interagem com receptores de membrana e a sua estrutura helicoidal anfipática lhes permite se inserirem na membrana plasmática das células-alvo (**Figura 3**), promovendo assim a formação de poros, a despolarização da membrana e a morte celular (ENNAHAR *et al.*, 2000; DRIDER *et al.*, 2006). De acordo com suas características, esses peptídeos podem ser divididos em cinco grupos (DIEP & NES, 2002; COTTER, HILL & ROSS, 2005):

As bacteriocinas da subclasse IIa, ou bacteriocinas do tipo pediocina, apresentam um espectro de ação reduzido e são caracterizadas pela alta atividade específica contra *L. monocytogenes*. Os peptídeos deste grupo contêm entre 37 e 58 ácidos aminados e apresentam na região amino-terminal a sequência-consenso YGNGVXCXXXXVXC, onde X é qualquer aminoácido. A pediocina PA-1 é a bacteriocina mais bem caracterizada desta subclasse, sendo o protótipo do grupo. As bacteriocinas leuconocina A e mesentericina Y105 são outros exemplos da subclasse IIa (DRIDER *et al.*, 2006; HENG *et al.*, 2007; YI *et al.*, 2010).

A subclasse IIb é caracterizada por ser formada por bacteriocinas compostas por dois peptídeos, que podem ser classificados em tipo E e tipo S. Fazem parte do tipo E as bacteriocinas compostas por dois peptídeos que são ativos individualmente, mas têm a sua atividade amplificada quando combinados. Este grupo inclui, entre outras, a termofilina 13 e a lactacina F. Já as bacteriocinas do tipo S só têm atividade quando ambos os peptídeos estão presentes, não sendo ativos individualmente. A lactococina G e a plantaricina A são exemplos deste grupo (COTTER, HILL & ROSS, 2005; HENG et al., 2007).

A subclasse IIc é composta por peptídeos cíclicos que possuem as regiões amino e carboxi-terminais covalentemente ligadas. Todas as bacteriocinas cíclicas cujo modo de ação foi estudado atuam através da permeabilização da membrana das células sensíveis e dissipação do potencial de membrana, resultando em morte celular. A enterocina AS-48, produzida por *Enterococcus faecalis*, foi a primeira bacteriocina cíclica identificada e é a melhor caracterizada até o momento (COBOS *et al.*, 2001; COTTER, HILL & ROSS, 2005; NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

A subclasse IId compreende bacteriocinas compostas por um único peptídeo linear do tipo não pediocina. As bacteriocinas aureocina A53, lactococcina A e divergicina A são exemplos desta subclasse (COTTER, HILL & ROSS, 2005; NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

Ceotto (2009) sugere ainda uma quinta subclasse (subclasse IIe) formada por bacteriocinas compostas por três ou mais peptídeos do tipo não pediocina. Um exemplo deste grupo é a aureocina A70, composta por quatro peptídeos diferentes (NETZ *et al.*, 2001).

#### 2.5.3 CLASSE III

A classe III é composta por peptídeos maiores do que 10 kDa, geralmente termolábeis. De acordo com o modo de ação essas bacteriocinas podem ser subdivididas em dois grupos: IIIa e IIIb (HENG *et al.*, 2007).

As bacteriocinas de subclasse IIIa, ou bacteriolisinas, apresentam um mecanismo de ação diferente das demais bacteriocinas, pois atuam diretamente na parede celular de bactérias Gram-positivas, levando-as à lise celular (**Figura 3**). As bactérias produtoras de bacteriolisinas nem sempre apresentam genes de imunidade específica, podendo apresentar modificações na parede celular que conferem resistência à bacteriolisina produzida. O protótipo deste grupo é a lisostafina, que atua hidrolisando ligações cruzadas da peptidoglicano (NILSEN, NES & HOLO, 2003; COTTER, ROSS & HILL, 2005; HENG *et al.*, 2007).

As bacteriocinas da subclasse IIIb são caracterizadas por promoverem a morte celular das células sensíveis de forma não lítica. A ação dessas bacteriocinas envolve a dissipação do potencial de membrana, levando ao extravasamento de ATP e, por consequência, à morte celular (HENG et al., 2007).

#### 2.5.4 ESTAFILOCOCCINAS

O primeiro relato da ação inibitória de substâncias antimicrobianas do tipo bacteriocina entre bactérias Gram-positivas foi em 1885, quando Babes observou a inibição de *Staphylococcus* spp. por outra estirpe de *Staphylococcus* spp. em meio sólido. Contudo, o termo estafilococcinas surgiu anos depois, em 1946, quando Fredericq observou que certas estirpes de *Staphylococcus* spp. produziam substâncias capazes de inibir o crescimento de estirpes do mesmo gênero e de outras bactérias Gram-positivas, porém, não apresentando atividade sobre bactérias Gram-negativas. A partir de então, iniciaram-se as buscas por novas estafilococcinas (JACK, TAGG & RAY, 1995; BASTOS *et al.*, 2009). A **Tabela 4** mostra algumas bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp.

**Tabela 4** - Bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp.

Bacteriocina	Estirpe produtora	Classe	Massa molecular	Elemento codificador	Referências
Pep5	S. epidermidis 5	I	3,48 kDa	pED503 (20 kb)	ERSFELD-DRESSEN,
					SAHL & BRANDIS, 1984
Epicidina 280	S. epidermidis BN280	- 1	3 kDa	pCH01 (> 40 kb)	HEIDRICH et al., 1998
Epidermina	S. epidermidis Tü3298	1	2,16 kDa	pTü32 (54 kb)	ALLGAIER et al., 1986
Epilancina K7	S. epidermidis K7	1	3 kDa	Cromossomo	VAN DE KAMP et al., 1995
Nukacina ISK-1	S. warneri ISK-1	- 1	2,96 kDa	pPI-1 (30,2 kb)	ASO et al., 2005
Nukacina 3299	S. simulans 3299	1	3,0 kDa	pRJ97 (> 25 kb)	CEOTTO, 2009
Estafilococcina C55α /	S. aureus C55	1	3,33 kDa /	pETB (32 kb)	NAVARATNA, SAHL
С55β			2,99 kDa		& TAGG, 1998
Estafilococcina Bsa	S. aureus CA*	I	2,089 kDa	Cromossomo	DALY et al., 2010
Aureocina A53	S. aureus A53	Ш	6,02 kDa	pRJ9 (10,4 kb)	NETZ et al., 2002
Aureocina A70	S. aureus A70	Ш	quatro peptídeos	pRJ6 (7,9 kb)	NETZ et al., 2001
			variando entre 2,9 e		
			3,08 kDa		

<sup>\*</sup>CA – adquiridos na comunidade

#### 2.5.4.1 ESTAFILOCOCCINAS PRODUZIDAS POR SCN

As bacteriocinas produzidas por SCN mais bem caracterizadas são lantibióticos. Atualmente, a espécie de SCN mais estudada quanto à produção de bacteriocinas é *S. epidermidis*. Dentre as bacteriocinas produzidas por esta espécie, as principais são a Pep5, a epidermina, a epicidina 280 e a epilancina K7. Além das bacteriocinas produzidas por *S. epidermidis*, já foram descritas bacteriocinas produzidas por outros SCN, como a nukacina ISK-1 e a nukacina 3299, sendo esta última estudada em nosso laboratório.

#### Pep5

A Pep5, inicialmente obtida a partir da estirpe *S. epidermidis* 5, é um lantibiótico do tipo A, com 3.488 Da de massa molecular, codificado pelo plasmídeo de 20 kb, pED503. Este plasmídeo contém o grupamento genético *pepIAPBC*, com os genes: *pepT*, que codifica o transportador ABC; *pepI*, codificador da proteína de imunidade à bacteriocina produzida; *pepA*, o gene estrutural, que codifica o pré-lantibiótico; *pepP*, que codifica a proteína envolvida no processamento proteolítico e os genes *pepB* e *pepC*, envolvidos nas modificações pós-tradução (SAHL, JACK & BIERBAUM, 1995; BASTOS *et al.*, 2009).

# Epicidina 280

A epicidina 280 é um lantibiótico do tipo A, com 30 ácidos aminados e massa molecular de 3,13 kDa, produzido por *S. epidermidis* BN280. O operon *ecilAPBC*, responsável pela biossíntese da epicidina 280, está localizado em um plasmídeo maior do que 40 kb, pCH01. Neste operon, não foi encontrado um gene codificador de transportador ABC, no entanto, existe a possibilidade de haver um outro gene, fora deste operon, relacionado à exportação desta bacteriocina. A análise de similaridade entre as sequências de ácidos aminados da epicidina 280 e da Pep5 revelou 75% de similaridade e 54,9% de identidade. Além disto, a imunidade cruzada entre as estirpes produtoras das duas bacteriocinas revelou que os peptídeos de imunidade são funcionalmente relacionados (HEIDRICH *et al.*, 1998; BASTOS *et al.*, 2009).

## **Epidermina**

A epidermina é um lantibiótico de 2.164,6 Da de massa molecular, produzido por *S. epidermidis* Tü3298. Os 11 genes envolvidos na biossíntese da epidermina estão organizados em cinco unidades transcricionais presentes no plasmídeo pTü32 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 de ligações do tipo tioéter e *epiD*, que catalisa a descarboxilação oxidativa da cisteína carboxi-terminal do pré-peptídeo. A segunda unidade transcricional é composta por um único gene, o *epiT*, que possui homologia com transportadores ABC; no entanto, por apresentar duas deleções no seu quadro de leitura, não codifica uma proteína ativa. O gene *epiH* e o operon *epiF*, *-E* e *-G* formam a terceira e quarta unidades de transcrição e parecem estar envolvidos no transporte da bacteriocina e na imunidade da célula produtora. No quinto operon, estão os genes *epiP*, que codifica uma serina-protease envolvida no processamento do peptídeo-líder, e *epiQ*, que codifica uma proteína reguladora, responsável por ativar a transcrição de *epiABCD*, *epiFEG*, *epiT* e *epiH* (PESCHEL & GÖTZ, 1996; SAHL & BIERBAUM, 1998; BASTOS *et al.*, 2009).

#### Epilancina K7

A epilancina K7, produzida pela estirpe *S. epidermidis* K7, também é um lantibiótico do tipo A. Este lantibiótico é composto por 31 ácidos aminados, com massa molecular de aproximadamente 3 kDa. Diferentemente das bacteriocinas anteriormente citadas, a epilancina K7 é codificada por genes localizados no cromossomo. O gene estrutural *elkA* codifica um pré-peptídeo de 55 ácidos aminados, contendo na região amino-terminal o peptídeo-líder e, na região carboxi-terminal, o peptídeo de 31 ácidos aminados, que sofrerá modificações pós-tradução e originará a epilancina K7. A jusante e a montante do gene *elkA*, estão, respectivamente, os genes *elkP*, provavelmente envolvido no processamento do peptídeo-líder, e *elkT*, provavelmente responsável pelo transporte da bacteriocina (VAN DE KAMP *et al.*, 1995; BASTOS *et al.*, 2009).

## Nukacina ISK-1

A nukacina ISK-1 é um lantibiótico do tipo A produzido por *S. warneri* ISK-1. Este peptídeo possui 27 ácidos aminados e peso molecular de 2,96 kDa (SASHIHARA *et al.*, 2000). Os genes responsáveis pela produção da nukacina ISK-1 estão presentes no plasmídeo pPI-1 de 30,2 kb. São no mínimo oito os genes responsáveis pela biossíntese da nukacina ISK-1: o gene estrutural, *nukA*; o gene *nukM*, que codifica a enzima responsável pelas modificações pós-tradução; o gene *nukT*, que codifica o transportador ABC, envolvido no processamento e na secreção da bacteriocina; os genes *nukFEG*, que codificam o transportador ABC envolvido na imunidade da célula produtora à bacteriocina; o gene *nukH*, que provavelmente codifica uma proteína acessória que contribui, com o transportador ABC, para a imunidade e a *orf1*, que codifica uma proteína que possui homologia com proteínas de regulação, embora a sua função ainda não tenha sido elucidada (ASO *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2009).

#### Nukacina 3299

A nukacina 3299 é uma bacteriocina produzida pela estirpe *S. simulans* 3299, isolada de gado com mastite. Esta bacteriocina apresenta um amplo espectro de ação, inibindo, por exemplo, *Streptococcus* spp. envolvidos em mastite bovina (NASCIMENTO *et al.*, 2005). A nukacina 3299 possui peso molecular de aproximadamente 3,0 kDa e os genes envolvidos na biossíntese desta bacteriocina estão localizados no plasmídeo pRJ97. A análise da sequência desses genes sugere que esta bacteriocina seja um lantibiótico idêntico à nukacina ISK-1 (BASTOS *et al.*, 2009; CEOTTO *et al.*, 2009).

#### 2.5.4.2 ESTAFILOCOCCINAS PRODUZIDAS POR S. aureus

Já foram identificadas algumas bacteriocinas produzidas por *S. aureus*, porém as melhor caracterizadas são a estafilococcina C55 e as aureocinas A70 e A53, sendo as duas últimas estudadas em nosso laboratório.

## Estafilococcina C55

A estirpe S. aureus C55, produtora de bacteriocina, possui um plasmídeo de 32 kb que codifica dois peptídeos, C55 $\alpha$  e C55 $\beta$ . Estudos mostraram que as estafilococcinas C55 $\alpha$  e C55 $\beta$  são lantibióticos, com massa molecular de 3.339 e 2.993 Da, respectivamente, que atuam sinergicamente inibindo estirpes de S. aureus e de Micrococcus luteus. A análise genética de um fragmento do plasmídeo codificador desta bacteriocina revelou a presença de quatro ORFs:  $sac\alpha$  e  $sac\beta$ , que codificam os genes estruturais; sacM1 e sacM2, que codificam duas proteínas hipotéticas, provavelmente envolvidas em modificações pós-tradução dos peptídeos  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente; e sacT, que codifica uma proteína de 720 ácidos aminados com homologia com genes que codificam transportadores do tipo ABC (NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998 e 1999; BASTOS et al., 2009). Recentemente, O'Connor et al. (2007) verificaram que os peptídeos C55 $\alpha$  e C55 $\beta$  apresentam alta similaridade com os peptídeos LtnA1 e LtnA2 que compõem a lacticina 3147. Além disso, os determinantes genéticos para a biossíntese destas duas bacteriocinas estão organizados de forma idêntica.

### Aureocina A53

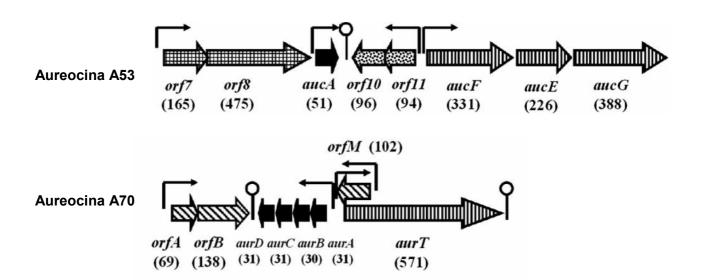
A aureocina A53 é uma bacteriocina da subclasse IId produzida por *S. aureus* A53, isolado de leite comercial. Esta bacteriocina é codificada por um plasmídeo de 10,4 kb, denominado pRJ9 (GIAMBIAGI-DeMARVAL *et al.*, 1990; NISSEN-MEYER *et al.*, 2009).

Esta bacteriocina é um peptídeo altamente catiônico e hidrofóbico com massa molecular de 6.021,5 Da, contendo 51 resíduos de ácidos aminados e rico em triptofano. Estudos sugerem que os resíduos de triptofano são importantes para a ligação da bacteriocina à membrana celular. Esta interação da aureocina A53 com a membrana citoplasmática das células sensíveis promove o efluxo de componentes vitais, a dissipação do potencial de membrana e, por consequência, inibe a biossíntese de macromoléculas celulares, como DNA, polissacarídeos e proteínas (NETZ et al., 2002; NETZ, BASTOS & SAHL, 2002; BASTOS et al., 2009).

A aureocina A53 difere de outras bacteriocinas por apresentar alta estabilidade em ambientes com valores de pH extremamente ácidos e com temperaturas altas, por ser

resistente a enzimas proteolíticas e por possuir uma conformação rígida em meio aquoso, sendo considerada uma bacteriocina atípica (NETZ *et al.*, 2002).

O plasmídeo pRJ9, codificador da aureocina A53, foi completamente sequenciado e desta forma foram identificadas 14 ORFs. Algumas ORFs identificadas próximas ao gene estrutural da aureocina A53 (aucA) apresentaram similaridade com genes tipicamente encontrados em organizações genéticas envolvidas na biossíntese de bacteriocinas (Figura 4). Três deles, aucE, aucF e aucG, constituem um operon e seus produtos possuem similaridade com transportadores do tipo ABC, estando envolvidos na imunidade parcial à aureocina A53. Como nenhum outro transportador foi encontrado no grupamento genético da aureocina A53, acredita-se que o operon aucEFG também esteja envolvido na secreção desta bacteriocina. Duas ORFs, orf10 e orf11, localizadas entre o gene aucA e o operon aucEFG, codificam proteínas de 96 ácidos aminados e 94 ácidos aminados, respectivamente, com funções ainda desconhecidas. A montante do gene aucA, foram identificadas duas ORFs, orf7 e orf8, que parecem não ser essenciais para a produção da aureocina A53 (NETZ et al., 2002; NASCIMENTO, 2004; BASTOS et al., 2009).



**Figura 4 -** Representação esquemática dos genes envolvidos na biossíntese das aureocinas A70 e A53. Os genes estruturais estão representados pelas setas pretas. Os números indicam o número de ácidos aminados dos polipeptídeos correspondentes. Os promotores estão indicados por setas finas e os terminadores de transcrição por grampos. Os genes que apresentam a mesma função estão representados com a mesma textura (BASTOS *et al.*, 2009).

### Aureocina A70

A aureocina A70 é uma bacteriocina da subclasse Ile produzida pela estirpe *S. aureus* A70, isolada de leite comercial. Esta bacteriocina apresenta um amplo espectro de ação, inibindo bactérias Gram-positivas de diversos gêneros como *Staphylococcus, Micrococcus, Corynebacterium, Paenibacillus, Lactobacillus, Leuconostoc* e *Listeria*, incluindo *L. monocytogenes* (OLIVEIRA *et al.*, 1998a; GAMON *et al.*, 1999; CEOTTO, 2009).

Os determinantes genéticos para a produção da aureocina A70 estão presentes no plasmídeo de 7,9 kb, pRJ6. Análises genéticas mostraram que pelo menos duas unidades transcricionais estão envolvidas na biossíntese da bacteriocina. O primeiro operon, *aurABCD*, é composto por quatro genes, que representam os genes estruturais da aureocina A70 (**Figura 4**). Este operon codifica quatro peptídeos pequenos (30-31 resíduos de ácidos aminados), altamente catiônicos e hidrofóbicos. A determinação da massa molecular dos peptídeos purificados revelou que estes peptídeos não são processados (NETZ *et al.*, 2001).

A aureocina A70 é a única bacteriocina de quatro componentes descrita na literatura. Ao se avaliar a atividade inibitória de cada um dos peptídeos isoladamente em meio sólido, verificou-se que, contra as estirpes de *S. aureus* e *L. innocua* empregadas como indicadoras, só havia atividade antimicrobiana quando todos os quatro peptídeos estavam combinados (25 μg de cada). Entretanto, ao se empregar uma estirpe de *M. luteus* como indicadora, verificou-se que os peptídeos AurA, AurB e AurC, testados individualmente (60 μg), exibiram atividades diferentes (AurA>AurB>AurC). Já o peptídeo AurD não apresentou atividade antimicrobiana. Contudo, verificou-se que a combinação dos quatro peptídeos resultou em uma maior atividade inibitória (BASTOS *et al.*, 2009).

A segunda unidade transcricional contém apenas um gene, o *aurT*, que codifica uma proteína similar ao transportador do tipo ABC envolvido na exportação da Pep5. No pRJ6, também foi identificado um segundo provável operon, que parece conter duas ORFs: a *orfA*, que codifica uma proteína com similaridade com proteínas envolvidas em regulação, e a *orfB*, que codifica uma proteína com características semelhantes às das proteínas associadas com imunidade (NETZ *et al.*, 2001). Outro gene hipotético, *orfM*, foi encontrado próximo aos genes estruturais da aureocina A70. No entanto, não foi detectada homologia entre a OrfM e outras proteínas presentes em bancos de dados (BASTOS *et al.*, 2009).

A aureocina A70 e as suas variantes parecem ser as bacteriocinas mais frequentemente produzidas por estirpes de *S. aureus* produtoras de bacteriocinas, já tendo sido identificada a

sua produção em estirpes de *S. aureus* de diferentes origens, como leite comercial, pacientes e gado saudável e com mastite bovina (GIAMBIAGI-DeMARVAL *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1998a e 1998b; GAMON *et al.*, 1999). A produção de aureocina A70 também já foi detectada em estirpes de SCN (NASCIMENTO *et al.*, 2005). A alta disseminação desta aureocina ocorre, provavelmente, devido à capacidade do plasmídeo pRJ6 ser mobilizado por plasmídeos conjugativos de *Staphylococcus* spp. (COELHO *et al.*, 2009).

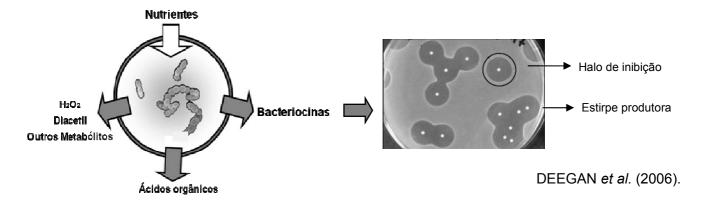
#### 2.6 BACTERIOCINAS COMO BIOPRESERVATIVOS DE ALIMENTOS

A maior parte dos alimentos de origem vegetal e animal se deteriora com facilidade, perdendo a qualidade e, por consequência, reduzindo a vida de prateleira do produto. Essa perda é dependente de vários fatores, dentre eles, a composição, o tipo de processamento e de armazenamento do alimento. A principal forma de deterioração dos alimentos é a microbiológica. A contaminação dos alimentos é responsável por grandes perdas econômicas para a indústria alimentícia. A ingestão de alimentos contaminados por patógenos pode causar diversos tipos de infecções e intoxicações alimentares, resultando em alto custo financeiro, devido, principalmente, ao tratamento contra essas enfermidades. Nos EUA, estima-se que os custos relativos a esses surtos estejam na ordem de bilhões de dólares por ano (CLEVELAND et al., 2001; GRAM et al., 2002, CDC, 2009).

Mesmo com tantos avanços tecnológicos, ainda existe um grande debate acerca dos métodos mais adequados para a preservação de alimentos, não somente nos países em desenvolvimento, mas também nos países desenvolvidos. Além da segurança e da necessidade de se prolongar a vida de prateleira dos alimentos, nos últimos anos, tem-se verificado, por parte dos consumidores, um grande aumento na demanda por alimentos minimamente processados, com as características organolépticas preservadas e prontos para consumo. Adicionalmente, devido à elevada quantidade de aditivos químicos adicionados a diversos tipos de alimentos, os consumidores têm dado preferência a alimentos mais naturais (CLEVELAND et al., 2001; COTTER, HILL & ROSS, 2005; GÁLVEZ et al., 2008).

Diante da grande necessidade de um método alternativo, que seja natural, seguro e eficaz, para a preservação de alimentos e da atividade antimicrobiana das bacteriocinas, estas surgem como um potencial biopreservativo a ser empregado na indústria alimentícia.

Apesar de estarem envolvidos na decomposição de alimentos, os microrganismos têm sido empregados empiricamente há milhares de anos para a fermentação. A fermentação é a técnica mais antiga de conservação de alimentos, sendo utilizada até hoje para estender a vida de prateleira e preservar o valor nutricional de alimentos e bebidas. Os microrganismos mais amplamente utilizados para a fermentação são as BAL, que produzem diversos metabólitos (**Figura 5**). Muitos desses metabólitos atuam como biopreservativos, como, por exemplo, os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogênio, o diacetil, a acetoína e as bacteriocinas (ROSS, MORGAN & HILL, 2002; DEEGAN *et al.*, 2006; GÁLVEZ *et al.*, 2007).



**Figura 5** – As BAL produzem diversos metabólitos antimicrobianos durante a fermentação, tendo as bacteriocinas grande atividade inibitória.

Devido a sua atividade antimicrobiana, as bacteriocinas já foram por muitas vezes confundidas com antibióticos na literatura, o que poderia impedir o seu uso em alimentos. Contudo, as bacteriocinas se diferenciam dos antibióticos em diversos aspectos, como a via de síntese, o modo de ação, o espectro antimicrobiano e a toxicidade (CLEVELAND *et al.*, 2001). A **Tabela 5** mostra as principais diferenças entre bacteriocinas e os antibióticos.

**Tabela 5** – Algumas diferenças entre as bacteriocinas e os antibióticos

Características	Bacteriocinas	Antibióticos	
Aplicação	Alimentos e Clínica	Clínica somente	
Síntese	Ribossômica	Metabólito secundário	
Atividade	Espectro variável	Espectro variável	
Imunidade da célula hospedeira	Sim	Não	
Modo de ação	Formação de poros e algumas atuam sobre a biossíntese de parede celular	Membrana, parede celular e alvos intracelulares	
Toxicidade / efeito colateral	Não	Sim	

CLEVELAND et al. (2001) Modificado.

As bacteriocinas são consumidas há muitos anos devido a sua produção pelas BAL durante a fermentação de alimentos, como queijos, iogurtes e bebidas. Por esta razão, essas bacteriocinas podem ser consideradas ingredientes naturais de alimentos (CLEVELAND *et al.*, 2001; ROSS, MORGAN & HILL, 2002; DEEGAN *et al.*, 2006).

As bacteriocinas possuem uma série de propriedades que as tornam potencialmente aplicáveis como biopreservativos de alimentos. As bacteriocinas são substâncias GRAS. Essas substâncias proteicas são inativadas pelas enzimas digestivas, não interferindo na microbiota anfibiôntica intestinal. As bacteriocinas possuem atividade altamente específica, não sendo tóxicas para células eucarióticas, e podem apresentar um espectro antimicrobiano relativamente amplo, inibindo tanto bactérias patogênicas quanto deteriorantes de alimentos. Em geral, as bacteriocinas são estáveis em diferentes valores de pH, podendo ser aplicadas em diferentes tipos de alimentos, além de serem relativamente termoestáveis, sendo capazes de resistir ao processamento térmico, muito empregado nas indústrias alimentícias (GÁLVEZ et al., 2007; GÁLVEZ et al., 2008; SETTANNI & CORSETTI, 2008).

Os diversos estudos realizados nos últimos anos mostram que a aplicação de bacteriocinas na preservação de alimentos pode trazer muitos benefícios para a indústria alimentícia, assim como para os consumidores. Dentre os benefícios, pode-se citar: (i) estender a vida de prateleira de alimentos; (ii) proporcionar uma proteção extra durante condições de abuso de temperatura; (iii) reduzir o risco de transmissão de agentes patogênicos de origem alimentar através da cadeia alimentar; (iv) reduzir as perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos; (v) minimizar a aplicação de conservantes químicos; (vi) permitir a aplicação de tratamentos térmicos menos severos, conservando-se as propriedades nutricionais e

organolépticas, sem comprometer a segurança dos alimentos; (vii) permitir a propaganda de alimentos mais saudáveis (menos ácidos, com um menor teor de sal e com um maior teor de água) e (viii) satisfazer as exigências das indústrias e dos consumidores (GÁLVEZ et al., 2007).

As bacteriocinas têm mostrado potencial aplicação como biopreservativos em diversos tipos de alimentos, como carnes, laticínios, enlatados, peixes, bebidas alcoólicas, sucos, saladas, produtos à base de ovos e vegetais fermentados (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

A primeira proposta para o uso de bacteriocinas em alimentos ocorreu em 1951. Já em 1953, a nisina, primeira bacteriocina comercializada, foi liberada na Inglaterra, sendo, posteriormente, aprovada em cerca de 50 países. Notavelmente, em 1969, a nisina recebeu o "status" de segura para uso em alimentos pela "Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Commitee on Food Additives". Em 1983, esta bacteriocina foi adicionada à lista europeia de aditivos de alimentos e, em 1988, foi aprovada pela "US Food and Drug Agency" para o uso em queijos processados e pasteurizados. A **Tabela 6** mostra alguns alimentos onde a nisina é aplicada e a quantidade máxima permitida em alguns países (COTTER, HILL & ROSS, 2005; DEEGAN *et al.*, 2006).

A nisina é comercializada com o nome de Nisaplin® (Danisco), produzida através do cultivo de *Lactococcus lactis* em leite desnatado. Cada grama de Nisaplin® contém aproximadamente 2,5% de nisina e cada 1 µg de nisina pura equivale a 40 UI (Unidades Internacionais). O Nisaplin® é um produto extremamente estável e mantém sua atividade por pelo menos dois anos quando estocado à temperatura abaixo de 25°C, em ambiente seco e sem luz (COTTER, HILL & ROSS, 2005; BARROS, 2009).

**Tabela 6** – Exemplos da aplicação de nisina em alguns países

País	Alimento onde a nisina é permitida	Máximo (UI/g)
Argentina	Queijo processado	500
Austrália	Queijo, queijo processado, tomate enlatado	Sem limite
Brasil	Queijos, vegetais enlatados e salsichas	500
França	Queijo processado	Sem limite
Itália	Queijo	500
Reino Unido	Queijo, coalhada, alimento enlatado	Sem limite
EUA	Queijo pasteurizado processado	10.000

UI - Unidade Internacional

Adaptado CLEVELAND et al. (2001).

No Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde (Portaria nº 6/1990), para ser utilizada em produtos à base de queijos fundidos e em queijos fundidos, em uma dose máxima de 12,5 mg/kg. A mesma dose de nisina foi liberada pelo DETEN (Departamento de Técnicas Normativas) do Ministério da Saúde para requeijão (Portaria nº 34/1992) e queijo pasteurizado (Portaria nº 29/1996). Em 1998, foi autorizada, pela Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento, a utilização do produto comercial Nisaplin® para o emprego em superfícies externas de embutidos, mais especificamente em salsichas (VISALEGIS, 2009).

A nisina é um lantibiótico do tipo AI produzido por *L. lactis*. Este peptídeo possui peso molecular de 3.353 Da e 34 ácidos aminados, apresentando uma lantionina e quatro β-metil-lantioninas em sua estrutura (**Figura 6**). Esta bacteriocina já se mostrou efetiva em diversos sistemas alimentares, inibindo o crescimento de várias bactérias Gram-positivas, incluindo importantes patógenos alimentares, como a *L. monocytogenes*. Esta bacteriocina é frequentemente empregada em produtos lácteos e em alimentos enlatados, sendo efetiva na proteção contra organismos formadores de esporos termorresistentes, como microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, tendo particular importância na prevenção de contaminação por *C. botulinum* (COTTER, HILL & ROSS, 2005; CHEIGH & PYUN, 2005; DEEGAN *et al.*, 2006).

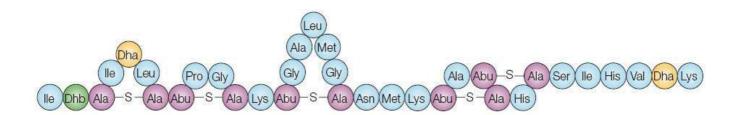


Figura 6 – Estrutura da nisina.

(Ala-S-Ala, lantionina; Abu-S-Ala, β-metil-lantionina; Dha, dideidroalanina; Dhb, dideidrobutirina).

COTTER, HILL & ROSS (2005).

O sucesso da comercialização da nisina estimulou várias pesquisas na área de bacteriocinas. Na literatura, já foram descritas diversas bacteriocinas com potencial aplicação como biopreservativo, mas, até o momento, nenhuma repetiu o sucesso da nisina. A **Tabela 7** mostra exemplos de algumas bacteriocinas já patenteadas com potencial aplicação em alimentos.

Tabela 7 – Exemplos de bacteriocinas patenteadas com potencial aplicação em alimentos

US Patente	Título da Patente	Aplicação
7.001.632 (21/02/2006)	Compostos antilistéria para uso em produtos alimentares	Nisina, pediocina, ácido láctico e antioxidante para a inibição de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos com alta atividade de água, incluindo carnes cruas e cozidas, queijos e similares.
6.207.411 (27/03/2001)	Bacteriocina lacticina 3147	Propriedades da lacticina 3147 e sua atividade durante a produção de queijo tipo "cheddar".
5.817.362 (06/10/1998)	Método para a inibição de bactérias utilizando uma nova bacteriocina de <i>Lactococcus</i> spp.	Método para a inibição de bactérias Gram-positivas em alimentos utilizando-se uma nova bacteriocina produzida por <i>L. lactis</i> NRRL-B-18535.
5.753.614 (19/05/1998)	Compostos com nisina para potencializar bactericidas de amplo espectro	Combinação de nisina, agente quelante e surfactante para inibir microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos em carnes, ovos, queijos e peixe; uso como biopreservativo.
5.445.835 (29/08/1995)	Método para a produção de iogurte contendo pediocina PA-1	Produção de um iogurte com maior tempo de prateleira contendo bacteriocina produzida por <i>P. acidilactici</i> .
5.219.603 (15/06/1993)	Composição para estender a vida de prateleira de carnes processadas	Uso da bacteriocina produzida por <i>P. acidilactici</i> e propionato para inibir o crescimento microbiano de carne crua e processada.
5.186.962 (16/02/1993)	Composição e método para a inibição de microrganismos patogênicos e de deteriorantes de alimentos	Aplicação de uma BAL para inibir o crescimento de patógenos alimentares.

CLEVELAND et al. (2001); USPTO (2009).

A pediocina PA-1, uma bacteriocina de 44 ácidos aminados produzida por *Pediococcus* acidilactici, também é aplicada como um biopreservativo de alimentos. Esta bacteriocina é comercializada com o nome de ALTA<sup>TM</sup> 2431, sendo um aditivo alimentar empregado para estender a vida de prateleira de uma série de alimentos, especialmente de produtos cárneos prontos para consumo, e para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* (RODRÍGUEZ, MARTÍNEZ & KOK, 2002).

Embora nenhuma outra bacteriocina seja comercializada, muitos estudos têm demonstrado o potencial de aplicação de diversas bacteriocinas na indústria de alimentos. Dentre as estafilococcinas caracterizadas em nosso laboratório, as aureocinas A70 e A53 apresentam potencial de aplicação biotecnológica na preservação de alimentos. Estas bacteriocinas possuem uma alta atividade contra L. monocytogenes e não demandam meios muito ricos para sua produção, o que diminuiria os custos de produção em larga escala. As aureocinas A70 e A53 são termoestáveis à temperatura ambiente, assim como em altas temperaturas (80°C por 15 min e 100°C por 5 min), não havendo diminuição detectável nas suas atividades antimicrobianas sob estas condições. Os genes envolvidos na biossíntese destas duas bacteriocinas apresentam uma organização simples, o que pode facilitar a clonagem e a expressão desses genes em estirpes bacterianas utilizadas como culturas iniciadoras em processos fermentativos para a preparação de alimentos. Desta forma, as aureocinas A70 e A53 poderiam ser produzidas in situ, descartando-se a necessidade da adição destes peptídeos ao produto final. Estudos preliminares realizados com a aureocina A53 demonstraram que os genes para sua biossíntese podem ser expressos de forma heteróloga em estirpes de lactobacilos (NASCIMENTO, 2004; BASTOS et al., 2009).

Em geral, a procura por novas bacteriocinas com potencial aplicação como biopreservativo de alimentos segue o seguinte esquema: primeiramente as bactérias são isoladas do alimento cru ou do produto industrializado; em seguida, as bactérias são testadas quanto à produção de bacteriocinas; as bacteriocinas são posteriormente caracterizadas (estrutura, regulação, produção, modo de ação e estabilidade) e, finalmente, a produção é analisada em um sistema alimentar (desta forma, as bacteriocinas são aplicadas *in situ*) (COTTER, HILL & ROSS, 2005; SETTANNI & CORSETTI, 2008).

As bacteriocinas podem ser aplicadas nos alimentos de diferentes formas. O alimento pode ser suplementado com a bacteriocina produzida *ex situ*, ou inoculado com a estirpe produtora sob condições que favoreçam a produção de bacteriocina *in situ*. No primeiro caso, a preparação de bacteriocina, obtida através do cultivo da estirpe produtora sob condições

adequadas em um fermentador de escala industrial, pode ser purificada ou parcialmente purificada e concentrada. Contudo, neste caso, é necessária a sua aprovação legal como um biopreservativo. A produção *ex situ* também pode ser obtida na forma de um concentrado cru, a partir do cultivo da estirpe produtora em um substrato do alimento (como o leite, por exemplo). A preparação obtida pode ser incorporada ao alimento como um aditivo ou ingrediente de forma legal, desde que seus componentes tenham função reconhecida no alimento, como, por exemplo, aumento da concentração de proteínas e melhora na textura (SCHILLINGER, GEISEN & HOLZAPFEL, 1996; GÁLVEZ *et al.*, 2007).

As bacteriocinas produzidas ex situ também podem ser aplicadas na forma de preparações imobilizadas, onde a bacteriocina purificada é ligada a um substrato, que atua como uma reserva e como um difusor de moléculas de bacteriocina para o alimento. Esse substrato pode também proteger a bacteriocina da inativação enzimática ou devida à interação com componentes do alimento. Diversos métodos têm sido propostos para a imobilização de bacteriocinas, como a incorporação a filmes compostos por alginato de cálcio, polissacarídeos, polímeros e proteínas. Na maioria dos casos, a bacteriocina imobilizada é aplicada na superfície do alimento processado para inibir a posterior contaminação e a proliferação de bactérias não desejadas. O mais recente avanço nesta área é o desenvolvimento de embalagens com antimicrobianos adsorvidos. Sendo assim, os filmes contendo antimicrobianos podem melhorar a qualidade e a segurança e prolongar a vida de prateleira dos alimentos (GUERRA et al., 2005; GÁLVEZ et al., 2007; PINTADO, FERREIRA & SOUSA, 2009).

A produção de bacteriocina *in situ* fornece várias vantagens sob os pontos de vista legal e financeiro quando comparada à produção *ex situ*. No entanto, o uso de culturas bacteriocinogênicas necessita de uma seleção cuidadosa de estirpes que sejam bem adaptadas ao alimento. As bactérias produtoras de bacteriocinas podem ser aplicadas no alimento diretamente como cultura iniciadora; como uma cocultura, em combinação com uma cultura iniciadora; ou como uma cultura protetora, aplicada principalmente em alimentos não fermentados (DEEGAN *et al.*, 2006; GÁLVEZ *et al.*, 2007; GÁLVEZ *et al.*, 2008).

A seguir, estão alguns exemplos das diferentes formas de aplicação de bacteriocinas em alimentos.

### 2.6.1 Adição de bacteriocinas como ingredientes ou aditivos de alimentos

O Nisaplin® é um exemplo da adição de bacteriocinas como ingrediente de alimentos. A preparação desta bacteriocina é obtida a partir da fermentação de leite pela estirpe *L. lactis*, produtora da nisina, sendo efetiva como um aditivo para a prevenção de decomposição e para o aumento da vida de prateleira de vários alimentos (CHEN & HOOVER, 2003).

Os produtos líquidos à base de ovos são geralmente processados em altas temperaturas para a eliminação de *Salmonella* spp. No entanto, algumas bactérias formadoras de esporos, termorresistentes e capazes de crescer a baixas temperaturas, como *Bacillus cereus*, são patógenos alimentares que podem resistir ao processamento térmico. Isto mostra que a indústria de produtos à base de ovos tem a necessidade de um preservativo que controle o crescimento dessas bactérias e que aumente a vida de prateleira desses produtos. No "International Egg Forum 2007", um especialista da Danisco apresentou um trabalho mostrando que a adição do Nisaplin® a ovos processados aumenta consideravelmente a vida de prateleira deste produto (DELVES-BROUGHTON, 2007).

A lacticina 3147 é uma bacteriocina com potencial aplicação como um biopreservativo. Para se analisar a atividade desta bacteriocina contra *L. monocytogenes* Scott A e *B. cereus* em iogurte, queijo "cottage" e sopa, uma preparação de lacticina 3147 foi obtida a partir da fermentação de soro de leite reconstituído, pela estirpe *L. lactis* DPC3147. O resultado mostrou o potencial desta bacteriocina em eliminar microrganismos patogênicos nesses produtos. A preparação de lacticina 3147 também foi testada em leite infantil, que é de particular importância, visto que as crianças são mais vulneráveis à listeriose. Assim, eles viram que no controle, sem bacteriocina, houve um aumento de 700% na contagem de células viáveis em um período de 3 h, enquanto que a adição da bacteriocina resultou em 99% de morte de *L. monocytogenes*, após o mesmo período (DEEGAN *et al.*, 2006).

O crescimento de bactérias indesejáveis em sucos de frutas e vegetais durante a estocagem pode causar decomposição do alimento devido, principalmente, à produção de metabólitos que alteram a viscosidade e o sabor. Diante deste problema, foi analisada a estabilidade da enterocina AS-48 em sucos de frutas e vegetais. Para isto, a enterocina AS-48 foi primeiramente concentrada e posteriormente aplicada em vários sucos. Desta forma, foi visto que, em sucos vegetais, a bacteriocina se manteve estável nas primeiras 24-48 h. Já nos sucos de frutas (maçã, uva, kiwi, laranja, pera e melancia), ela se manteve estável por no mínimo 15 dias, ainda sendo detectada atividade após 30 dias. Já nos sucos comercializados, a

estabilidade da enterocina AS-48 não se alterou após 120 dias sob refrigeração, contudo, a bacteriocina foi inativada em altas temperaturas. Foi visto que, a 15°C, a enterocina AS-48 reduziu significativamente o número de células viáveis de *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. aureus*. Os resultados deste estudo mostraram assim a capacidade da enterocina AS-48 como um biopreservativo (GRANDE *et al.*, 2005).

Bizani e colaboradores (2008), a fim de avaliarem o potencial uso da cereína 8A, uma bacteriocina produzida por *B. cereus*, como um aditivo para a biopreservação de produtos lácteos, adicionaram a bacteriocina semipurificada a leite UHT e a queijo tipo minas. Desta forma, verificaram que a adição de 160 UA/ml de cereína 8A ao leite UHT foi capaz de reduzir o número de células viáveis de *L. monocytogenes* em três unidades log por 14 dias a 4°C. Quando a cereína 8A foi adicionada à superfície do queijo, foi verificada uma redução de duas unidades log no número de células viáveis da indicadora durante 30 dias a 4°C.

O Geobacillus stearothermophilus é uma bactéria Gram-positiva formadora de esporos, que sobrevive ao processamento térmico de produtos comercialmente estéreis, como alimentos enlatados, podendo causar deterioração. Diante disto, a bacteriocina enterocina AS-48 foi testada contra esta bactéria em milho e em ervilha enlatados. Foi verificado que 7 mg/g de enterocina AS-48 foram capazes de reduzir o número de células viáveis a um número não detectável por 30 dias a 45°C e o mesmo ocorreu contra os esporos bacterianos, mostrando a atividade biopreservativa desta bacteriocina (VIEDMA et al., 2009a).

# 2.6.2 Adição de culturas bacteriocinogênicas a alimentos

Brillet *et al.* (2004) avaliaram a capacidade da estirpe *Carnobacterium divergens* V41 de produzir bacteriocina *in situ* para a biopreservação de salmão defumado. A estirpe bacteriocinogênica se mostrou eficiente após incubação a vácuo por quatro semanas, reduzindo significativamente o número de células viáveis de *L. monocytogenes*. Um aspecto importante a ser considerado, diante da intenção de se aplicar esta bacteriocina como um biopreservativo de alimentos, é que a estirpe produtora utilizada no estudo foi isolada de salmão (RIHAKOVA *et al.*, 2009)

Recentemente, Dortu *et al.* (2008) avaliaram a atividade de duas estirpes bacteriocinogênicas (*Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 e *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28) contra o crescimento de *L. monocytogenes* em carnes bovina e de frango. Em carne bovina, a

estirpe CWBI-B1365 reduziu significativamente a contagem da indicadora para uma e meia unidades log em sete dias, duas unidades log após 14 dias e para uma quantidade não detectada em 21 dias de estocagem. Já a estirpe CWBI-B28 reduziu a contagem a um nível não detectável já em sete dias de estocagem. Quanto à carne de frango, apesar de não ter sido verificada atividade após o inóculo das duas estirpes isoladamente, as estirpes bacteriocinogênicas apresentaram atividade inibitória contra *L. monocytogenes* quando combinadas.

# 2.6.3 Adição de bacteriocinas combinadas a alimentos

Atualmente, várias combinações de diferentes bacteriocinas têm sido testadas, com o objetivo de se aumentar a atividade antimicrobiana. O uso simultâneo de duas ou mais bacteriocinas pode ser empregado não somente para diminuir as doses de bacteriocinas a serem aplicadas, mas também como uma barreira adicional contra o surgimento de bactérias resistentes (GÁLVEZ et al., 2007).

Alguns estudos já mostraram que o uso combinado de nisina com pediocina AcH ou com leuconocina F10, assim como as lacticinas B ou F com nisina ou pediocina AcH, e lacticina 481 com pediocina AcH, resultou em uma atividade antimicrobiana maior do que a de cada bacteriocina separadamente. A adição simultânea ou sequencial de nisina (50 UA/ml) e curvacina 13 (160 UA/ml) também resultou em um maior efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* (GÁLVEZ et al., 2007).

Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis são um grande problema para as indústrias de cogumelos e mariscos, respectivamente, embalados a vácuo, visto que os esporos destes microrganismos resistem ao processamento térmico e causam a deterioração destes alimentos. Um estudo recente avaliou a atividade das bacteriocinas nisina e pediocina contra esses esporos, verificando que as bacteriocinas, quando combinadas, foram mais efetivas do que isoladamente. A combinação dos dois peptídeos foi capaz de reduzir significativamente a proporção de células viáveis, não sendo as mesmas detectadas após 90 dias nas amostras de cogumelos e mariscos com bacteriocinas (CABO et al., 2009).

### 2.6.4 Aplicação de bacteriocinas adsorvidas a embalagens ativas de alimentos

Embalagens ativas de alimentos são embalagens que, além de protegerem o alimento do ambiente externo, também atuam para estender a vida de prateleira e manter a segurança do alimento. Nos últimos anos, diversos estudos têm sugerido que bacteriocinas sejam incorporadas a filmes de embalagens, a fim de que essas bacteriocinas sejam gradualmente liberadas, inibindo o crescimento de microrganismos durante o armazenamento do alimento (NGUYEN et al., 2008).

Um estudo recente, realizado por pesquisadores brasileiros, desenvolveu e analisou a atividade antimicrobiana de um filme de celulose contendo pediocina comercializada (ALTA® 2351) contra *L. innocua e Salmonella* spp. em presunto fatiado. A embalagem contendo 50% de pediocina resultou na redução de duas unidades log das células viáveis de *L. innocua*, quando comparada ao controle sem bacteriocina, após 15 dias de armazenamento a 12°C, mostrando a potencial aplicação desta embalagem como um biopreservativo de alimentos. Contudo, contra *Salmonella* spp., este filme promoveu uma redução de apenas meia unidade log em relação ao controle, após 12 dias (SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2009).

Jin e Zhang (2008) testaram a aplicação de um polímero de ácido poliláctico (PLA) com nisina como material antimicrobiano para embalar alimentos. A atividade antimicrobiana deste filme foi avaliada contra *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* Enteritidis em meio de cultura, em suco de laranja e em ovo líquido. A combinação PLA e nisina inibiu significativamente o crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura e em ovo líquido. A maior inibição ocorreu em 24 h, sendo verificada uma contagem de *L. monocytogenes* 4,5 log ufc/ml menor do que no controle. A combinação de PLA e nisina reduziu a população celular de *E. coli* O157:H7 em suco de laranja de 7,5 para 3,5 log em 72 h. O filme de PLA com nisina resultou na redução de duas unidades log do crescimento de *S.* Enteritidis no produto à base de ovo, incubado a 24°C. Após 21 dias a 4°C, a população de *S.* Enteritidis em ovo (3,5 log ufc/ml) foi significativamente reduzida em relação à do controle (7 log ufc/ml). A inibição de *E. coli* O157:H7 foi maior em suco de laranja do que em meio líquido. Portanto, os resultados deste trabalho mostraram o potencial de uso deste polímero incorporado com nisina como embalagem bioativa em alimentos.

### 2.6.5 Adição de bacteriocinas a alimentos combinada com outros métodos

A combinação de diferentes métodos de conservação é aplicada para prevenir a contaminação bacteriana ou controlar o crescimento microbiano no alimento. Os métodos de conservação podem atuar sinergicamente, ampliando o espectro de ação, possibilitando a aplicação de menores doses de antimicrobianos e promovendo uma proteção maior do que a obtida por um método isoladamente (DEEGAN *et al.*, 2006; GÁLVEZ *et al.*, 2007).

## Bacteriocinas associadas a quelantes de metal

Os agentes quelantes penetram na membrana externa das bactérias Gram-negativas sequestrando íons Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> que estabilizam os fosfolipídeos de membrana. O efeito da nisina e de grande parte das bacteriocinas contra células Gram-negativas é baixo. No entanto, o crescimento de patógenos Gram-negativos, como a *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp., pode ser controlado através da combinação da bacteriocina com um agente quelante, como EDTA, pirofosfato de sódio, citrato e lactato, que atuam desestruturando a membrana externa e permitindo a penetração da nisina, assim como de outras bacteriocinas (DEEGAN *et al.*, 2006; GÁLVEZ *et al.*, 2007).

Um estudo recente mostrou que a combinação da bacteriocina cereína 8A com EDTA resultou em uma acentuada redução na contagem de células viáveis de *S.* Enteritidis, quando comparada ao tratamento com somente a bacteriocina, mostrando a eficiência da combinação cereína 8A/agente quelante no controle deste patógeno alimentar (LAPPE *et al.*, 2009).

# Bacteriocinas associadas a redutores de nitrito

A redução de nitrito e a adição de bacteriocinas podem trazer muitos benefícios para a indústria de alimentos. Por exemplo, a combinação de nisina com redutores de nitrito pode retardar a formação de toxina botulínica em carnes, aumentar a atividade contra *Leuconostoc mesenteroides* (importante deteriorante de produtos cárneos), *L. monocytogenes* e endósporos de *Clostridium* spp. A adição de redutores de nitrito aumenta a atividade de lactobacilos

bacteriocinogênicos contra *L. monocytogenes* em carne, a atividade da enterocina EJ97 sobre *L. monocytogenes, Bacillus coagulans* e *Bacillus macroides* e da enterocina AS-48 sobre *B. cereus* (GÁLVEZ *et al.*, 2007).

### Bacteriocinas associadas a ácidos orgânicos

A combinação de bacteriocinas com ácidos orgânicos pode resultar em uma maior atividade antimicrobiana. Um exemplo disto é a combinação da pediocina comercializada (ALTA 2341) com acetato de sódio e lactato de sódio contra *L. monocytogenes*, em carne. Esta combinação se mostrou bastante eficiente no controle deste microrganismo após estocagem por 21 dias a 4°C (UHART, RAVISHANKAR & MARKS, 2004). Na produção de queijo tipo ricota, a combinação de nisina com ácido acético e sorbato foi capaz de controlar a contaminação por *L. monocytogenes* por 70 dias a 6°C (DAVIES *et al.*, 1997). Outro exemplo é a combinação da lacticina 3147 com lactato de sódio ou citrato de sódio que se mostrou eficiente no controle de *C. perfringens*, *S.* Enteritidis var. Kentucky e *L. innocua* DPC 1770 em salsicha de carne suína (SCANNELL *et al.*, 2000).

# Bacteriocinas associadas a tratamento térmico

As bacteriocinas também podem ser aplicadas para que se reduza o tratamento térmico sem se comprometer a segurança dos alimentos. Um exemplo é a ação sinérgica de 25 UI/ml de nisina e o aquecimento do alimento a 54°C por 16 min, capaz de reduzir significativamente a presença de *L. monocytogenes* termorresistente no leite (MAISNIER-PATIN, TATINI & RICHARD, 1995). Em um estudo recente, Naim *et al.* (2008) verificaram que a adição de nisina em uma matriz alimentar contendo cenoura permitiu uma redução de 17 vezes no tempo de tratamento térmico necessário para a inativação de esporos de *Clostridium sporogenes* neste alimento.

### Bacteriocinas associadas a campo elétrico pulsado

A tecnologia de campo elétrico pulsado (CEP) é um processo onde a inativação microbiana ocorre devido à aplicação de pulsos elétricos em altas voltagens. O efeito do CEP é similar ao da eletroporação bacteriana, mas a alta intensidade deste tratamento causa grande desestruturação na membrana celular. Como a maioria das bacteriocinas atua na membrana citoplasmática, a combinação de bacteriocina e CEP aumenta o efeito bactericida. Além disso, as bacteriocinas podem apresentar atividade adicional contra as bactérias que sobreviveram ao CEP (GÁLVEZ et al., 2007).

Em um estudo recente, a enterocina AS-48 foi testada em combinação com CEP de alta intensidade contra *Lactobacillus diolivorans* 29, uma estirpe produtora de exopolissacarídeo responsável pela deterioração de suco de maçã. Neste trabalho, os autores viram que uma concentração subinibitória da enterocina AS-48, quando combinada com CEP, era responsável por uma alta atividade bactericida, não havendo detecção da bactéria-alvo no suco de maçã, quando armazenado a 4°C e a 22°C, por pelo menos 15 dias (VIEDMA *et al.*, 2009b).

### Bacteriocinas associadas à alta pressão

A aplicação de alta pressão é um método inovador no processamento e na preservação de alimentos. Atualmente, existe uma grande variedade de produtos alimentícios disponíveis no mercado tratados a alta pressão, como, por exemplo, carne de frango pronta para o consumo, presunto fatiado, ostras processadas e sucos de frutas. Durante o processamento, o rompimento das pontes de hidrogênio, das interações eletrostáticas e hidrofóbicas afeta a estrutura e a função das células. A desestruturação da membrana externa facilita a penetração da bacteriocina, tornando-a eficaz contra bactérias Gram-negativas. Assim, a morte celular causada pela alta pressão é intensificada pelo uso de bacteriocinas, as quais também podem prevenir a seleção de células vegetativas resistentes à alta pressão (GÁLVEZ et al., 2007).

Um exemplo é a combinação da lacticina 3147 com o tratamento a alta pressão contra *L. innocua* e *S. aureus* em leite e em soro. Morgan *et al.* (2000) verificaram que a combinação de 250 MPa (que isoladamente resultou em uma redução de duas unidades log das indicadoras) e lacticina 3147 (quando aplicada sozinha promoveu uma redução de uma unidade log) resultou em uma redução de seis unidades log no número de células viáveis destes patógenos. Além

disso, a combinação de lacticina 3147 com uma pressão maior do que 400 MPa resultou em uma atividade antimicrobiana equivalente ao dobro da obtida com a aplicação de 250 MPa e lacticina 3147.

# 2.6.6 Adição de bacteriocinas através da expressão heteróloga em BAL

Muitas bacteriocinas com potencial de uso como biopreservativos de alimentos, como as estafilococcinas e as enterocinas, são produzidas por microrganismos que não possuem o "status" GRAS. Diante disso, alguns pesquisadores têm analisado a produção dessas bacteriocinas através da expressão heteróloga por BAL, especialmente lactococos (LIU *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2009).

A enterocina A é uma bacteriocina produzida por *Enterococcus faecium* e apresenta alta atividade contra *L. monocytogenes*. Recentemente, Liu *et al.* (2008) introduziram os genes para a biossíntese desta bacteriocina em uma estirpe de *L. lactis*. A estirpe transformada, capaz de expressar de forma heteróloga a enterocina A, foi empregada como cultura iniciadora na fermentação de queijo tipo "cottage" e, desta forma, verificou-se a redução na contagem de *L. monocytogenes* neste alimento. Portanto, este trabalho mostrou a potencial aplicação da expressão heteróloga de bacteriocinas por estirpes de BAL.

Apesar de todos os benefícios, há de se salientar que o uso de bacteriocinas como biopreservativo, assim como qualquer outro método preservativo, não deve substituir as boas práticas de higiene e de controle durante a produção dos alimentos. Existem diversas medidas de controle aplicadas à indústria de alimentos para prevenir e minimizar a contaminação bacteriana, o que inclui cuidados na manipulação, sanitização e higiene da matéria-prima, da fábrica, dos produtos e dos funcionários, levando-se em consideração as normas do programa de pontos críticos de controle (HACCP-Hazard Analysis Critical Control Point) (DEEGAN et al., 2006).

# 2.7 OUTRAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS BACTERIOCINAS

As bacteriocinas também podem ser aplicadas no tratamento de diferentes infecções humanas e de animais. A **Tabela 8** mostra o espectro de ação de algumas estafilococcinas contra patógenos humanos e de outros animais (BASTOS *et al.*, 2009).

A nisina, por exemplo, além de ser um biopreservativo de alimentos, pode ser aplicada no tratamento de diferentes infecções, como as causadas por *Streptococcus pneumoniae* multirresistentes a drogas (DIEP & NES, 2002). A nisina tem ação sobre *S. aureus*, podendo ser aplicada no controle da mastite bovina. Com esta finalidade, a nisina é comercializada como agente ativo do "MastOut" (Pfizer). Estudos mostraram que a taxa de cura de vacas infectadas com *S. aureus* tratadas com este produto (28% de 18 vacas) foi significativamente maior do que em vacas não tratadas (0% de 32 vacas) (BARKEMA, SCHUKKEN & ZADOKS, 2006). A nisina é comercializada também como agente ativo do "Wipe-Out", que consiste em lenços contendo nisina (ImmuCell Corporation) para a limpeza das tetas e prevenção da mastite bovina, apresentando ótimos resultados no tratamento deste tipo de infecção (COTTER, HILL & ROSS, 2005).

Além da nisina, a lacticina 3147, associada a seladores de tetos, também tem apresentado grande capacidade de prevenir a mastite bovina. Em um estudo, onde se inoculou *Streptococcus dysgalactiae* nos tetos das vacas, se observou que em 61% dos tetos não tratados houve o desenvolvimento de mastite clínica, enquanto que somente em 6% dos tetos tratados houve infecção (RYAN *et al.*, 1999). A lacticina 3147 também apresenta atividade sobre MRSA, *Enterococcus* resistentes à vancomicina, *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, *Propionibacterium acnes* e *Streptococcus mutans*, podendo ser aplicada no tratamento de infecções causadas por estes patógenos (GALVIN, HILL & ROSS, 1999).

**Tabela 8 –** Espectro de ação de algumas estafilococcinas contra patógenos humanos e de animais

Estafilococcinas	Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas e Micobactérias	
Aureocina A70	L. monocytogenes S. aureus S. agalactiae Corynebacterium spp.	- - - -	
Aureocina A53	L. monocytogenes S. aureus S. agalactiae Corynebacterium spp.	Moraxella bovis - - -	
Estafilococcina C55/BacR1	Enterococcus faecalis S. pneumoniae Streptococcus spp.	Neisseria meningitidis Neisseria gonorrhoeae -	
Bac1829, Estafilococcina C55	S. aureus Streptococcus suis Corynebacterium diphteriae Corynebacterium renale	Haemophilus parassuis Bordetella pertussuis Bordetella bronchiseptica Moraxella bovis	
Bac188	S. aureus E. faecalis S. pneumoniae C. diphteriae	E. coli Salmonella enterica serovar Typhi Shigella dysenteriae Mycobacterium tuberculosis	
Estafilococcina IYS2	S. aureus Streptococcus salivarius, P. acnes L. monocytogenes Actinomyces israeli	- - - -	
Pep5	S. aureus SCN Corynebacterium spp.	- - -	
S. aureus S. epidermidis S. agalactiae Corynebacterium spp.		- - - -	
Galidermina  Staphylococcus spp. Streptococcus spp. Listeria spp. Corynebacterium spp. Clostridium spp.		Neisseria spp. Moraxella spp	
Warnericina RB4	Alicyclobacillus acidoterrestris	-	
Lisostafina	S. aureus S. epidermidis	- -	

BASTOS et al. (2009).

#### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Sabendo-se que diversas estirpes de *Staphylococcus* spp. têm capacidade de produzir bacteriocinas com potencial aplicação biotecnológica e que este gênero é prevalente em casos de mastite bovina, o objetivo inicial do presente trabalho foi identificar novas bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp. isolados de gado com mastite. Por isso, 47 estirpes de *Staphylococcus* spp. foram isoladas e avaliadas quanto à produção de substância antimicrobiana (SAM). Dentre as SAM detectadas, a SAM 4244 foi a que apresentou o espectro de ação mais amplo. Diante disto, o principal objetivo deste trabalho foi caracterizar esta SAM e avaliar o seu potencial de aplicação como um biopreservativo de alimentos.

#### 3.2 ABORDAGENS A SEREM EMPREGADAS NESTE TRABALHO

- ✓ Teste de produção de SAM pelo método de difusão em ágar;
- ✓ Caracterização preliminar das substâncias antimicrobianas produzidas pelas estirpes de Staphylococcus spp. através da análise de sensibilidade a enzimas proteolíticas e ao NaOH;
- ✓ Análise do perfil plasmideal das estirpes produtoras;
- ✓ Análise da presença do operon *aurABCD* (que contém os genes codificadores da aureocina A70), do gene *aucA* (codificador da aureocina A53), do gene *eciA* (codificador da epicidina 280), do gene *pepA* (codificador da Pep5), do gene *epiA* (codificador da epidermina), dos genes *sacαA* e *sacβA* (codificadores da estafilococcina C55), *elkA* (codificador da epilancina K7) e do gene *nukA* (codificador da nukacina ISK-1) nas estirpes produtoras de SAM através das técnicas de PCR e de hibridização DNA/DNA;
- ✓ Análise do espectro de ação das SAM;

- ✓ Identificação em espécie da estirpe *Staphylococcus* spp. 4244 através da análise de rDNA 16S;
- ✓ Análise da cinética de produção da SAM 4244 em diferentes meios de cultura: BHI, GBHI, M17, GM17 e TSB;
- ✓ Avaliação da estabilidade da SAM 4244 em diferentes temperaturas e valores de pH e seu perfil de sensibilidade/resistência a enzimas proteolíticas;
- ✓ Estimativa da massa molecular da SAM 4244;
- ✓ Determinação da cinética de ação da SAM 4244;
- Análise da atividade biopreservativa da SAM 4244 aplicada em leite contaminado com *L. monocytogenes* e com *S. aureus*;
- Determinação da vida de prateleira da SAM 4244 armazenada à temperatura ambiente, a 4°C e a -20°C.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

# 4.1 ESTIRPES BACTERIANAS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM

As 47 estirpes de *Staphylococcus* spp., estudadas quanto à produção de SAM, foram isoladas de diferentes rebanhos de gado bovino e bubalino da região sudeste do Brasil e gentilmente cedidas pela Dra. Maria Aparecida V. P. Brito (EMBRAPA Gado de Leite – Juiz de Fora, MG). Neste trabalho, também foram utilizadas estirpes produtoras de bacteriocinas já conhecidas (**Tabela 9**).

As estirpes bacterianas que foram empregadas como indicadoras na avaliação do espectro de ação das SAM estão relacionadas na **Tabela 10**.

Todas as estirpes anteriormente citadas foram estocadas em meio TSB adicionado de 40% de glicerol (v/v) a -20°C, com exceção das BAL. Estas foram estocadas em meio de leite desnatado [leite desnatado Molico em pó a 3,5% (p/v) e glicerol a 20% (v/v)], a -20°C.

Neste trabalho, foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- Meio BHI: *Brain Heart Infusion* (Difco). O meio BHI foi utilizado em caldo, sólido [acrescido de ágar a 1,5% (p/v)] e semissólido [acrescido de ágar a 0,7% (p/v)] para os testes de produção de SAM.
- Meio TSB: *Trypticase Soy Broth* (Difco). O meio TSB foi utilizado em caldo, sólido [acrescido de ágar a 1,5% (p/v)] e semissólido [acrescido de ágar a 0,7% (p/v)] para os testes de produção de SAM e de estabilidade.
- Meio Lactobacilli MRS: *Man Rogosa Sharpe* (Difco). Este meio foi utilizado para o crescimento das BAL, empregadas no estudo do espectro de ação das SAM. O meio MRS foi utilizado em caldo, sólido [acrescido de ágar a 1,5% (p/v)] e semissólido [acrescido de ágar a 0,7% (p/v)].
  - Meio M17 (Difco): foi utilizado em caldo para os testes de produção de SAM.
- Meio GM17 [M17 (Difco) suplementado com 5% (p/v) de glicose (Reagen)]: foi utilizado em caldo para os testes de produção de SAM.
- Meio GBHI [BHI (Difco) suplementado com 5% (p/v) de glicose(Reagen)]: foi utilizado em caldo para os testes de produção de SAM.

**Tabela 9** – Estirpes de *Staphylococcus* spp. previamente estudadas, empregadas neste trabalho

ESTIRPES	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
S. aureus A53	Produtora da aureocina A53	GIAMBIAGI-DeMARVAL et al., 1990
S. aureus A70	Produtora da aureocina A70	GIAMBIAGI-DeMARVAL et al., 1990
S. aureus A70 Bac <sup>-</sup>	Curada do plasmídeo pRJ6 (codificador da aureocina A70)	GIAMBIAGI-DeMARVAL et al., 1990
S. aureus C55	Produtora da estafilococcina C55	NAVARATNA, SAHL & TAGG, 1998
S.epidermidis Tü3298	Produtora da epidermina	ALLGAIER et al., 1986
S. epidermidis K7	Produtora da epilancina K7	VAN DE KAMP et al., 1995
S. epidermidis 5	Produtora da Pep5	ERSFELD-DRESSEN, SAHL & BRANDIS, 1984
S. epidermidis BN280	Produtora da epicidina 280	HEIDRICH et al., 1998
S. simulans 3299	Produtora da nukacina 3299	NASCIMENTO et al., 2005
S. aureus MB32	Estirpe hospedeira dos plasmídeos de 15; 7,9 e 2,5 kb	CEOTTO et al., 2009
S. aureus MB196	Estirpe hospedeira dos plasmídeos de 27; 10,4; 4,4 e 1,2 kb	CEOTTO et al., 2009

**Tabela 10** – Estirpes bacterianas empregadas como indicadoras no estudo sobre o espectro de ação das SAM

ESTIRPES INDICADORAS	REFERÊNCIA
Lactococcus lactis subsp. cremoris	1
L. lactis NZ 9000	1
L. lactis 2084	1
Lactobacillus sakei DSM 20017	1
L. casei ATCC 398	1
Bacillus cereus	INCQS <sup>1</sup>
Bacillus licheniformis ATCC 12759	INCQS
Bacillus coagulans UH	2
Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953	1
Corynebacterium fimi NCTC 7547	1
Micrococcus luteus ATCC 4698	1
Kocuria rhizophila ATCC 9341	1
Enterococcus faecium E89	1
Enterococcus faecalis 2758	1
Enterococcus spp. CL5184, CL5241, CL5244, CL5866, CL6174, CL6179, CL6258, SS1273, SS1274, 3062-95, 3129-97, 4047-96 e 4078-96	3
L. monocytogenes ATCC 19117	INCQS
L. monocytogenes 11/LM	1
L. monocytogenes L1/L2a	1
L. monocytogenes 7898	1
L. innocua 397	1
L. innocua ATCC 33090	INCQS
<i>Listeria</i> spp. L <sub>1,</sub> L <sub>2</sub> , L <sub>13</sub> , L <sub>16</sub> , L <sub>18</sub> , L <sub>21</sub> , L <sub>23</sub> , L <sub>25</sub> , L <sub>26</sub> , L <sub>28</sub> , A <sub>5</sub> , A <sub>7</sub> , A <sub>8</sub> , A <sub>10</sub> , A <sub>11</sub> e A <sub>12</sub>	1
Rhodococcus equi ATCC 6939	INCQS
S. aureus ATCC 6538	INCQS
S. aureus A70 Bac <sup>-</sup>	1
Staphylococcus spp. 2S <sub>1</sub> , 2S <sub>2</sub> , 2S <sub>3</sub> , 2S <sub>4</sub> , 2S <sub>5</sub> , 2S <sub>6</sub> , 2H <sub>1</sub> , 2H <sub>2</sub> , 2H <sub>3</sub> , 3S <sub>4</sub> , 3H <sub>1</sub> e 4S <sub>1</sub>	IFRJ <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus</i> spp. 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 30 e 50	1
Streptococcus spp. 5112, 5125, 5445, 5451, 5453, 5454, 5480, 5526, 5747, 5775, 5854 e 5858	1

IFRJ
IFRJ

- 1 Coleção do Laboratório de Genética Molecular, IMPPG, UFRJ
- 2 Coleção do Laboratório de Genética Microbiana, IMPPG, UFRJ
- 3 Coleção do Laboratório de Apoio Biotecnológico, IMPPG, UFRJ

#### 4.2 TESTE DE PRODUÇÃO DE SAM

As estirpes testadas quanto à produção de SAM foram crescidas em 5 ml de meio BHI, a 37°C por 18 h. Em seguida, foram inoculados 5 µl da cultura, sob a forma de pontos, em placas com meio BHI. Após incubação a 37°C por 18 h, as células foram mortas por exposição aos vapores de clorofórmio por 30 min. Posteriormente, a cultura da estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547 (previamente inoculada em BHI líquido e incubada a 37°C por 24 h) foi transferida para tubos com meio BHI semissólido, a uma proporção de 0,3 ml de cultura para cada 3 ml de BHI. A mistura dos tubos foi vertida sobre as placas, que foram incubadas a 37°C por 18 h e, posteriormente, a produção de SAM foi verificada através da medição dos halos de inibição da estirpe indicadora (GIAMBIAGI-DeMARVAL *et al.*, 1990).

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO

O espectro de ação das SAM foi determinado de acordo com o descrito no item 4.2, sendo empregadas como indicadoras as bactérias relacionadas na **Tabela 10.** As BAL empregadas como indicadoras foram previamente inoculadas em meio MRS líquido por 18 h a 37°C. As demais bactérias foram previamente cultivadas em meio BHI líquido por 18 h a 37°C

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ)

(com exceção do *G. stearothermophilus* que foi incubado a 50°C), sendo posteriormente diluídas a 10<sup>-2</sup> em solução salina [NaCl a 0,85% (p/v)] estéril.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

A caracterização bioquímica preliminar foi realizada como no teste da produção de SAM, detalhado anteriormente no item 4.2, sendo que, antes de se verter a estirpe indicadora *C. fimi* NCTC 7547, foram adicionados 40 μl da solução para a qual a sensibilidade da SAM foi analisada, ao redor da região de crescimento da estirpe produtora de SAM. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 4 h e a estirpe indicadora foi vertida, dando continuidade ao procedimento, de acordo com o descrito no teste de produção de SAM. As soluções utilizadas foram as seguintes: protease, pronase, proteinase K, tripsina (Sigma, 1 mg/ml, preparadas em Tris/HCl 50 mM, pH 8,0 - CaCl<sub>2</sub> 10 mM) e NaOH 0,2 N (preparado em água) (GIAMBIAGI-DeMARVAL *et al.*, 1990).

### 4.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL DE Staphylococcus spp.

As estirpes de *Staphylococcus* spp. foram crescidas em 5 ml de meio TSB, a 37°C por 18 h. Posteriormente, foram centrifugadas a 6.500 xg por 5 min para sedimentar as células. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi suspenso em 400 µl de tampão TE 1X (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). As células foram centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após desprezar-se o sobrenadante obtido, as células foram suspensas em 400 µl de tampão de lise [Tris/HCl 40 mM pH 7,8, EDTA 1 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, sacarose 25% (p/v)], sendo adicionados 5 µl de solução de lisostafina (Sigma; 1 mg/ml, preparada em tampão TE 1X) e 10 µl de lisozima (Sigma; 10 mg/ml, preparada em tampão TE 1X). A preparação foi incubada a 37°C por 1 h. Após se verificar a viscosidade, foram adicionados 50 µl de pronase (Sigma; 10 mg/ml, preparada em água) e se incubou a 37°C, por 10 min. Depois, foram adicionados 100 µl de SDS a 10% (p/v). O material foi incubado a 37°C por 10 min e, em seguida, por 5 min a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 60 µl de KCl 4 M. A mistura foi colocada rapidamente no gelo e incubada por aproximadamente 20 min, ou até que ficasse esbranquiçada. A seguir, o material foi centrifugado a 14.700 xg por 20 min, a 4°C. Após se transferir o sobrenadante obtido para outro microtubo, foram adicionados dois volumes de

etanol gelado e, em seguida, as amostras foram incubadas a –20°C por 18 h. Posteriormente, o material foi centrifugado a 14.700 xg por 30 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi desprezado. Após deixar-se o precipitado secar, foram adicionados 50 µl de TE 1X para dissolvê-lo e a preparação de DNA foi estocada a 4°C (GIAMBIAGI-DeMARVAL *et al.*, 1990).

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE Staphylococcus spp.

As estirpes foram crescidas em 5 ml de meio TSB, a 37°C por 18 h. Após centrifugar-se as culturas a 6.500 xg por 5 min, as células foram suspensas em 1 ml de tampão TE 1X. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram suspensas em 900 µl do tampão Tris/HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 7,8, e a suspensão celular foi dividida em dois microtubos, com 450 µl cada. Para Staphylococcus coagulase--negativos, foram adicionados 20 µl de lisozima (10 mg/ml, preparada em TE 1X) e 5 µl de lisostafina (1 mg/ml, preparada em TE 1X). Para S. aureus, foram adicionados 5 µl de lisostafina. As preparações foram incubadas a 37° C por 1 a 2 h, de acordo com a lise observada, verificada através da viscosidade. Após o período de incubação, foram adicionados 15 μl de SDS a 20% (p/v), 55 μl de pronase (Sigma; 10 mg/ml, preparada em Tris/HCl 10 mM, NaCl 10 mM, pH 8,0) e 10 μl de RNAse A (Sigma; 100 mg/ml em solução de Tris/HCl 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,8) e, em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 2 h. Posteriormente, foi feito um tratamento com 600 µl de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (25/24:1, v/v) e, após 15 min, as amostras foram centrifugadas a 6.500 xg por 5 min. A fase superior aquosa foi coletada e tratada com 600 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). Em seguida, foi feita uma nova centrifugação sob as mesmas condições. A fase superior aquosa foi coletada e o tratamento com clorofórmio:álcool isoamílico foi repetido. À fase superior aquosa, foram adicionados 1/9 do volume de acetato de sódio 3 M pH 7,0 e dois volumes de etanol absoluto gelado. Após incubar-se a -20°C por uma noite, a preparação foi centrifugada a 14.700 xg, a 4°C por 30 min, e depois o sobrenadante foi desprezado. O sedimento restante foi dissolvido em 50 µl de acetato de sódio 0,3 M pH 7,0, sendo juntados os materiais dos dois microtubos pertencentes à mesma estirpe. Posteriormente, foram adicionados 250 µl de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA. Após incubação a -20°C por uma noite, o material foi centrifugado a 14.700 xg por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados 300 µl de etanol a 70% (v/v) gelado. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.700 xg por 10 min, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento foi seco e dissolvido em água bidestilada estéril em um volume que permitisse ao DNA entrar totalmente em solução. Antes de se aplicar as amostras em gel de agarose para visualização do DNA, elas foram aquecidas a 55°C por no mínimo 30 min. Posteriormente, as amostras de DNA foram mantidas a 4°C (POTTER *et al.*, 2009).

#### 4.7 DOSAGEM DE DNA

Os DNAs empregados na PCR foram dosados por comparação com o DNA do fago  $\lambda$  digerido com a enzima HindIII. A solução deste DNA foi pré-quantificada, onde cada 10  $\mu$ I da solução possui 1  $\mu$ g de DNA. Ao se submeter este DNA à eletroforese em gel de agarose (EGA), detectam-se sete fragmentos que possuem aproximadamente 480, 190, 130, 90, 50, 40 e 10 ng. Em vista disso, os DNAs a serem dosados foram submetidos à EGA juntamente com o padrão  $\lambda$ - HindIII e foram quantificados por comparação visual com a intensidade das bandas correspondentes aos fragmentos pré-quantificados do padrão.

## 4.8 PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DE GENES ESTRUTURAIS DE ESTAFILOCOCCINAS CONHECIDAS

Para cada reação de PCR, foram adicionados 7,5 ng da preparação de DNA (extraído como descrito no item 4.6), 10  $\mu$ l do tampão 5X de reação de PCR (Promega), 2,5 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfato, MgCl<sub>2</sub> a uma concentração variável, 50 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores empregados (**Tabela 11**), 2,5 U de "Go *Taq* Flex-polymerase" (Promega) e água bidestilada q.s.p 50  $\mu$ l (CEOTTO *et al.*, 2009).

As reações de amplificação de DNA foram feitas no termociclador "Programmed Thermal Controller" (PTC- $100^{TM}$ , MJ Research, USA), com um ciclo nomeado MUPCR (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Este ciclo consiste em uma etapa inicial de desnaturação a 92°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min à temperatura de anelamento [determinada de acordo com a  $t_m$  dos oligonucleotídeos iniciadores empregados para a detecção de cada gene estrutural (**Tabela 11**)], 1 min a 72°C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C.

**Tabela 11** – Oligonucleotídeos iniciadores,  $t_m$  e concentrações de cloreto de magnésio empregados nas PCR para a amplificação dos genes estruturais de diferentes bacteriocinas

Genes Amplificados	Oligonucleotídeos Iniciadores	<i>t</i> <sub>m</sub>	MgCl <sub>2</sub>	Fragmento amplificado	Gene estrutural	Referências	Números de acesso*
aurABCD	<b>P5R</b> : 5' – AAA TAT TAA CAA GAG AAA - 3' <b>P6F</b> : 5' – CCT TAT ACT CGA ATG CTT AG - 3'	42°C	2,5 mM	525 pb	Aureocina A70	NASCIMENTO et al., 2005	AF241888
aucA	aucAF2: 5' – CAT TTA CGA TAT ATC TAA TAA AGA CGC C –3' aucAR2: 5' – GAT AAT CAT AAA ACA AAG AGC CAA AG –3'	52°C	2 mM	381 pb	Aureocina A53	NASCIMENTO et al., 2005	AF447813
nukA	nukAF: 5' – AGG AGG TAA CAA ACA TGG – 3' nukAR: 5' – CCC CTT TTT ATG AAC AAC AAG – 3'	52°C	1,5 mM	195 pb	Nukacina ISK-1	CEOTTO <i>et al.</i> , 2009	NC005207
sacαA e sacβA	C55F: 5' – AGC GTG GTG ATT CTT ATG – 3' C55R: 5' – TCT GAT TTA TTT AGT TCT GGA TA – 3'	47°C	1,5 mM	499 pb	Estafilococcina C55	CEOTTO et al., 2009	NC003265
pepA	Pep5F: 5' – AGA GGA GGT GGT TAT ATA TG– 3' Pep5R: 5' – TGA GTT CCA TGC CCA GTG – 3'	48°C	1,5 mM	427 pb	Pep5	CEOTTO et al., 2009	Z49856
epiA	<b>EpiAF</b> : 5' – GGA GTG TTT AAA ATG GAA GC – 3' <b>EpiAR</b> : 5' – CCT TTT CCC AGT CTA TTT TG – 3'	49°C	2,5 mM	431 pb	Epidermina	CEOTTO et al., 2009	X62386
elkA	<b>K71</b> : 5' – ATG AAT AAC TCA TTA TTC – 3' <b>K72</b> : 5' – ATG GAA AAC AAA AAA G – 3'	42°C	1,5 mM	171 pb	Epilancina K7	NASCIMENTO et al., 2005	U20348
ec <i>iA</i>	Epin1: 5' – CAG GAG GGA TAT ATT ATG G – 3' Epin2: 5' – CAA TCA CTA CTA TTG ACA ATC AC – 3'	42°C	1,5 mM	165 pb	Epicidina 280	NASCIMENTO et al., 2005	Y14023

<sup>\*</sup>Número de Acesso: utilizado para acessar as sequências genéticas no GenBank, empregadas no desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.

#### 4.9 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE (EGA)

Os géis de agarose (Sigma) foram preparados em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, acetato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 7,8) com diferentes concentrações de agarose (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

A visualização dos DNAs obtidos pelos métodos descritos nos itens 4.5 e 4.6 foi feita em gel de agarose a 0,7% (p/v), utilizando-se 2  $\mu$ l de DNA e 1  $\mu$ l de corante para eletroforese [glicerol 50% (v/v); azul de bromofenol 0,02% (p/v); xilenocianol 0,02% (p/v); EDTA 10 mM, pH 7,5].

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR (item 4.8) foram visualizados em gel de agarose a 1,4% (p/v). No gel, foram aplicados 3  $\mu$ l de cada produto obtido por PCR e 1  $\mu$ l de corante para eletroforese de produto de PCR [sacarose 60% (p/v), EDTA 0,1 M; azul de bromofenol 0,02% (p/v), pH 7,5]. Como marcador de tamanho molecular, foi utilizado o "100-bp DNA ladder" (Promega).

As corridas foram realizadas em tampão TAE 1X por aproximadamente 2 h ou 7 h a 70 V.

Após a corrida, os géis foram corados em uma solução de brometo de etídeo (1 μg/ml) por aproximadamente 20 min. Posteriormente, o DNA foi visualizado em um aparelho transiluminador (Vilber Lourmat) de luz ultravioleta (260 nm) e a imagem foi registrada em um sistema de imagens (Vilber Lourmat DP-001-SD).

## 4.10 DETECÇÃO DOS GENES ESTRUTURAIS DAS ESTAFILOCOCCINAS POR HIBRIDIZAÇÃO DNA/DNA

Após a amplificação dos genes estruturais das estafilococcinas, os fragmentos de DNA obtidos por PCR (item 4.8) foram purificados pelo sistema comercial "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up" (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, e empregados como sondas (CEOTTO *et al.*, 2009).

No "Southern blot" para a detecção do operon *aurABCD*, foi empregado o DNA plasmideal das estirpes 4059 e 4231 e o DNA genômico das demais estirpes digerido com *Eco*RI (item 4.11). Já no "Southern blot" para a detecção dos genes *auc*A, *sacα*A e *sacβ*A, *pep*A, *epi*A, *elk*A e *eci*A, foi empregado DNA genômico digerido com *Eco*RI e para a detecção do gene *nuk*A, o DNA genômico utilizado foi previamente digerido com *Hind*III (4.11). 30 μl das amostras de DNA plasmideal e de DNA genômico digerido foram

submetidas à EGA a 0,7 % (conforme o item 4.9). Posteriormente, os géis de agarose foram tratados com uma solução de HCl 0,12 N por 15 min, lavados com água destilada e submetidos a uma solução de desnaturação (NaOH 0,2 M; NaCl 3 M) por 1 h à temperatura ambiente, sob leve agitação. Após lavagem com água destilada, os géis foram tratados duas vezes com uma solução de neutralização (Tris/HCl 0,5 M; NaCl 3 M; pH 7,2) por 2 h, à temperatura ambiente, sendo lavados novamente com água destilada. Em seguida, as amostras de DNA foram transferidas, por capilaridade, com SSC 6X (NaCl 0,9 M; citrato de sódio 90 mM), para membranas de náilon (Hybond-N, GE Healthcare) por 18 h à temperatura ambiente. Após a transferência, a membrana foi lavada com SSC 6X e submetida à secagem a 80°C por 2 h (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

A marcação das sondas e as hibridizações DNA/DNA foram feitas empregando-se o sistema comercial "Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System" (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. A hibridação foi detectada por exposição durante 1 h a um filme de raio X "Hyperfilm" (GE Healthcare), revelado com Dektol (Kodak).

#### 4.11 DIGESTÃO DE DNA COM AS ENZIMAS EcoRI E HindIII

O DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI (Invitrogen) ou HindIII (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. As digestões foram feitas utilizando-se 1  $\mu$ g de DNA genômico (item 4.6) e 20 unidades da enzima em seu respectivo tampão, em um volume final de 40  $\mu$ l, por 12 h a 37°C.

#### 4.12 IDENTIFICAÇÃO EM ESPÉCIE ATRAVÉS DA ANÁLISE DE rDNA 16S

Para a identificação da estirpe de *Staphylococcus* spp. 4244, primeiramente, foram feitas reações de amplificação de rDNA 16S empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores 11F (5' TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3') e 5R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). O ciclo empregado consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 58°C (temperatura de anelamento) e 90 s a 72°C e uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min. Posteriormente, o fragmento amplificado foi sequenciado (na "Norwegian University of Life Sciencies") e sua sequência foi analisada e comparada com outras sequências depositadas no GenBank através do programa BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

#### 4.13 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA SAM 4244 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

A fim de se definir as condições ótimas para a produção da SAM 4244, a estirpe *Staphylococcus* spp. 4244 foi cultivada em diferentes meios de cultura: BHI, GBHI, M17, GM17 e TSB, por 24 h. Primeiramente, a estirpe produtora foi crescida em 3 ml de meio BHI e incubada a 37°C por 18 h. Posteriormente, 1 ml desta cultura foi inoculado em 100 ml de cada um dos meios de cultura e incubado a 37°C, sob agitação a 100 rpm em incubadora de bancada CT-712 (Cientec). Nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 h, foram retiradas alíquotas de 1 ml de cada um dos meios. As alíquotas foram centrifugadas a 6.500 xg por 5 min. Os sobrenadantes obtidos foram esterilizados por tratamento térmico a 80°C por 15 min e a produção da SAM 4244 foi determinada através da titulação da SAM no sobrenadante, de acordo com o descrito no item 4.14.

Posteriormente, o mesmo experimento foi realizado somente em meio BHI, sendo retiradas duas alíquotas de  $800~\mu l$  a cada hora, durante 12~h, e em 24~h. Uma das alíquotas foi utilizada para determinação do crescimento bacteriano, através da leitura de  $DO_{600}$  em um leitor de placas de microdiluição (Biotek – ELX800). A segunda alíquota foi centrifugada e o sobrenadante obtido foi esterilizado e a SAM titulada, conforme descrito acima.

#### 4.14 TITULAÇÃO DA SAM 4244 PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

A atividade da SAM foi determinada através da titulação da SAM, feita da seguinte forma: o sobrenadante/concentrado foi diluído de forma seriada de 1:2 até 1:512 em microtubos contendo 200 μl de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 6,0). Em seguida, 0,3 ml da cultura indicadora *M. luteus* ATCC 4698 (previamente crescida em 3 ml de BHI a 37°C por 24 h), foram inoculados em 3 ml de meio BHI semissólido e a mistura foi vertida em placas contendo 25 ml de meio BHI. Após a solidificação do meio, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro. Em cada poço, foram inoculados 50 μl de cada uma das diluições da SAM. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a leitura dos resultados, foi verificada qual a maior diluição que ainda tinha atividade inibitória contra a estirpe indicadora e foram calculadas as unidades de atividade ou unidades arbitrárias (UA) por ml da seguinte forma: o inverso da maior diluição com atividade inibitória multiplicado por 20. (MALDONADO, RUIZ-BARBA & JÍMÉNEZ-DÍAZ, 2004).

## 4.15 CONCENTRAÇÃO DA SAM 4244 POR PRECIPITAÇÃO DO SOBRENADANTE DA CULTURA COM SULFATO DE AMÔNIO

A estirpe 4244 foi crescida em 5 ml de meio BHI a 37°C por 18 h. Posteriormente, 3 ml do pré-inóculo foram inoculados em 300 ml de meio BHI líquido e incubados a 37°C por 24 h, sob agitação a 100 rpm. Após incubação, a cultura foi centrifugada a 11.400 xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi então submetido à precipitação com 40% (p/v) de sulfato de amônio (Reagen) por 4 h a 4°C, sob agitação. Em seguida, o material foi centrifugado a 11.400 xg, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 8 ml de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 6,0). Posteriormente, o concentrado foi dialisado em membrana de exclusão de 2.000 Da (Sigma-Aldrich) por 3 dias a 4°C, em 1 litro de tampão fosfato de sódio, sendo feita diariamente a troca do tampão. Após este período, o concentrado obtido foi ajustado, com o mesmo tampão, para o volume de 12 ml, obtendo-se assim a substância 25 vezes concentrada. Posteriormente, o material foi esterilizado por tratamento térmico a 80°C por 15 min e a atividade antimicrobiana foi determinada através de titulação, conforme o item 4.14.

#### 4.16 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA SAM 4244

A atividade da SAM 4244 foi determinada sob diferentes condições: na presença de enzimas proteolíticas, em diferentes temperaturas e valores de pH, a fim de se avaliar sua estabilidade e as condições ótimas de atividade (MALDONADO, RUIZ-BARBA & JÍMÉNEZ-DÍAZ, 2004).

#### 4.16.1 Ação de enzimas proteolíticas sobre a atividade da SAM 4244

A sensibilidade da SAM 4244 a enzimas proteolíticas foi determinada empregandoses as enzimas tripsina (Sigma; 10 mg/ml), pronase E (Sigma; 10 mg/ml), proteinase K (Sigma; 10 mg/ml) e pepsina (Sigma; 10 mg/ml) preparadas em Tris/HCl 50 mM - CaCl $_2$  10 mM (pH 7,0). Para isso, 180 µl da SAM concentrada com sulfato de amônio (2.560 UA/ml) foram tratados com 20 µl de cada uma das enzimas proteolíticas por 4 h, a 37°C. Neste teste, foi empregado um controle contendo 180 µl da preparação de SAM concentrada e 20

µl de tampão Tris/HCl 50 mM. Após o tratamento enzimático, a atividade antimicrobiana foi determinada conforme descrito no item 4.14.

#### 4.16.2 Ação do pH sobre a atividade da SAM 4244

Para se avaliar a ação do pH sobre a atividade da SAM 4244, 180 μl da preparação de SAM com atividade de 2.560 UA/ml foram tratados em diferentes valores de pH. O pH da solução foi ajustado com HCl 0,12 N ou 0,2 N e NaOH 0,1 M ou 0,2 M para 3,0, 6,0 (controle), 9,0 e 11,0. Após 4 h à temperatura ambiente, o pH foi reajustado para 6,0 com as mesmas soluções. Em seguida, foi verificada a atividade antimicrobiana de cada uma das amostras como descrito no item 4.14.

#### 4.16.3 Ação da temperatura sobre a estabilidade da SAM 4244

A fim de se verificar a termoestabilidade da SAM 4244, uma preparação da SAM (2.560 UA/ml) foi submetida a tratamentos a 65°C e 80°C, por 15 e 30 min; 100°C, por 5 e 15 min, e 121°C (autoclavação), por 15 min. Após os tratamentos térmicos, foi verificada a atividade antimicrobiana (item 4.14). Como controle, foi empregada a SAM 4244 concentrada submetida somente ao tratamento térmico inicial (80°C por 15 min) para a esterilização do material (item 4.15).

## 4.17 ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR DA SAM 4244 POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE foi feita com o lisado proteico da estirpe 4244 e com o sobrenadante concentrado (item 4.15) tratado, a fim de se estimar a massa molecular da SAM 4244.

#### 4.17.1 Extração de proteínas

A estirpe *Staphylococcus* spp. 4244 foi crescida em 3 ml de meio BHI, a 37°C por 18 h. Posteriormente, 1 ml da cultura foi inoculado em 10 ml de meio BHI. Após incubação a

37°C por 1 h, a cultura foi centrifugada a 6.500 xg por 10 min e o sedimento resultante foi submetido a duas lavagens com 1 ml de tampão TE 1X. Em seguida, o sedimento foi suspenso em 100  $\mu$ l de tampão TE 1X com 5  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml, preparada em TE 1X) e 5  $\mu$ l de lisostafina (1 mg/ml, preparada em TE 1X) e incubado a 37°C. Após 2 h de incubação, foram adicionados 100  $\mu$ l do tampão de tratamento [0,7% (v/v) de Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8); 0,04% (p/v) de SDS; 0,2% (v/v) de glicerol; 0,1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,2% (p/v) de "coomassie blue" (Sigma)] e a preparação foi submetida a 100°C por 5 min. Posteriormente, a preparação foi centrifugada por 5 min a 6.500 xg e o sobrenadante foi então coletado em um microtubo estéril e estocado a -20°C (SANTOS et al., 2009).

#### 4.17.2 Tratamento do sobrenadante concentrado

Foram adicionados 100  $\mu$ l do tampão de tratamento a 100  $\mu$ l do sobrenadante concentrado com sulfato de amônio. Posteriormente, a preparação foi submetida a 100°C por 5 min e centrifugada a 6.500 xg por 10 min. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C.

#### 4.17.3 SDS-PAGE

A eletroforese de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida, composto de gel de empilhamento [stacking gel; 4,8% (p/v) de acrilamida bis-acrilamida (29:1); 25% (v/v) de Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8); 0,1% (p/v) de SDS; 0,1 % (p/v) de persulfato de amônio e 0,14% (v/v) de Temed, preparado em água bidestilada estéril] e de separação [7,5% (p/v) de acrilamida bis-acrilamida (29:1); 37,5% (v/v) de Tris/HCl 0,5 M (pH 8,8); 0,1% (p/v) de SDS; 10% (v/v) de glicerol; 0,06% (p/v) de persulfato de amônio e 0,06% (v/v) de Temed, preparado em água bidestilada estéril]. As amostras do material proteico e o padrão de massa molecular ("Protein Ladder – BenchMark"; Invitrogen) foram aplicados em duplicata no gel e submetidos a uma corrente de 25 mA em tampão de corrida [0,3% (p/v) de Trisbase; 1,4 % (p/v) de glicina; 0,1 % (p/v) de SDS, preparado em água bidestilada estéril]. Após 2 h, o gel foi dividido em duas partes.

A primeira parte foi corada com solução corante [12,5% (v/v) da solução estoque contendo: 2% (p/v) de "coomassie blue R250" em água bidestilada estéril; 10% (v/v) de ácido acético; 40% (v/v) de metanol, preparada em água bidestilada] por 18 h, sendo,

posteriormente, tratada com a solução descorante I [50% (v/v) de metanol; 10% (v/v) de ácido acético, preparada em água bidestilada estéril] por 45 min, e com a solução descorante II [5 % (v/v) de metanol; 7% (v/v) ácido acético, preparada em água bidestilada estéril], até que as bandas ficassem bem nítidas no gel (LAEMMLI, 1970).

A segunda parte foi empregada para a verificação de atividade inibitória das amostras. Para isto, o gel foi tratado com 100 ml da solução de Triton X-100 a 1% (v/v; preparada em água destilada estéril) por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação, para a remoção do SDS. Posteriormente, o gel foi lavado três vezes (20 min cada) com água destilada estéril e transferido para uma placa contendo 50 ml de meio BHI. Em seguida, foram vertidos 10 ml de meio BHI semissólido contendo 100 µl da estirpe indicadora *M. luteus* ATCC 4698 (previamente crescida em meio BHI por 18 h a 37°C). Após incubação a 37°C por 24 h, foi avaliada a presença de zona de inibição (BHUNIA *et al.*, 1987).

#### 4.18 ANÁLISE DA CINÉTICA DE AÇÃO DA SAM 4244

Para a determinação da cinética de ação da SAM 4244, a uma cultura em meio TSB contendo aproximadamente 10<sup>7</sup> ufc/ml da estirpe indicadora *L. monocytogenes* ATCC 19117, foram adicionadas 1.000 UA/ml da preparação da SAM 4244 concentrada (item 4.15). Como controle, foi empregada a cultura de *L. monocytogenes* ATCC 19117 sem a adição da SAM, sendo adicionado um volume correspondente de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 6,0). Em seguida, 200 μl de cada uma das culturas, com e sem a adição de SAM 4244, foram inoculados em oito poços de uma placa de microdiluição. A placa de microdiluição foi incubada a 37°C e a cada duas horas, durante 8 h, foram feitas leituras da DO<sub>600</sub> em leitor de placas de microdiluição (Biotek – ELX800). Após cada leitura, foram retirados 200 μl de uma das amostras com bacteriocina e do controle. Posteriormente, foi feita a contagem de unidades formadoras de colônia por ml (ufc/ml), conforme descrito no item 4.19.

#### 4.19 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

Para a determinação de ufc,100  $\mu$ l das amostras foram diluídos de forma seriada em 900  $\mu$ l de salina estéril e 100  $\mu$ l das diluições de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup> foram semeados em placas de

Petri contendo 20 ml de meio TSB. As placas foram então incubadas a 37°C por 24 ou 48 h, para a posterior contagem de colônias.

## 4.20 ANÁLISE DE ATIVIDADE DA SAM 4244 EM LEITE DESNATADO UHT E EM MEIO TSB

A fim de se avaliar a capacidade biopreservativa da SAM 4244, a sua atividade antimicrobiana foi analisada contra *L. monocytogenes* ATCC 19117 e *S. aureus* A70 Bac<sup>-</sup> (estirpe A70, isolada de leite comercializado, curada do plasmídeo bacteriocinogênico) em leite desnatado UHT (Elegê). Neste experimento, uma amostra de 5 ml de leite foi inoculada com 10<sup>7</sup> ufc/ml de *L. monocytogenes* ATCC 19117 e uma segunda amostra com *S. aureus* A70 Bac<sup>-</sup>, sendo, posteriormente, adicionadas 1.000 UA/ml da SAM 4244 concentrada a cada uma das amostras. Concomitantemente, foram feitos os controles de crescimento das estirpes indicadoras em leite, sendo adicionado igual volume de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 6,0) em substituição à SAM 4244. As amostras e os controles foram incubados a 37°C e, nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h, foram feitas as contagens do número de células viáveis, conforme descrito no item 4.19. Paralelamente, este mesmo procedimento foi feito empregando-se meio TSB, com o objetivo de se comparar a atividade da SAM 4244 em meio de cultura e em leite (BIZANI *et al.*, 2008, modificado).

#### 4.21 DETERMINAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA SAM 4244

A fim de se determinar a vida de prateleira da SAM 4244, o sobrenadante concentrado (conforme descrito no item 4.15) foi distribuído em alíquotas de 2 ml e armazenado a -20°C, 4°C e à temperatura ambiente. A atividade antimicrobiana das amostras estocadas a 4°C e à temperatura ambiente foi avaliada semanalmente (conforme descrito no item 4.14), durante seis meses. A atividade das amostras armazenadas a -20°C foi verificada a cada mês, durante um ano e meio.

#### 5. RESULTADOS

### 5.1 TESTE DE PRODUÇÃO DE SAM

As 47 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de gados com mastite de diferentes rebanhos foram analisadas quanto à produção de SAM, de acordo com o método descrito no item 4.2. Dentre estas 47 estirpes, 26 (55,3%) apresentaram atividade inibitória contra a estirpe indicadora, *C. fimi* (dados não mostrados). No entanto, somente as SAM produzidas pelas estirpes 4059, 4231, 4244, 5409 e 5580 apresentaram halos de inibição maiores do que 20 mm de diâmetro (**Tabela 12**), sendo selecionadas para os estudos posteriores.

**Tabela 12** – Atividade das SAM produzidas por estirpes isoladas de gado com mastite contra a indicadora *C. fimi*.

Estirpes	Halos de inibição* (desvio padrão)
4059	35,0 ( <u>+</u> 2,0)
4231	35,5 ( <u>+</u> 2,3)
4244	28,0 ( <u>+</u> 0,3)
5409	29,5 ( <u>+</u> 1,1)
5580	28,0 ( <u>+</u> 1,7)

<sup>\*</sup> Diâmetro dos halos de inibição em milímetros.

Estes resultados foram obtidos a partir da média de três experimentos independentes.

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS SAM

Todas as SAM foram resistentes ao hidróxido de sódio.

Quanto à sensibilidade a enzimas proteolíticas, todas as SAM foram sensíveis a pelo menos uma das enzimas empregadas, com exceção da SAM produzida pela estirpe 4244 (**Tabela 13**). A SAM 4231 apresentou um perfil de sensibilidade igual ao da aureocina A70, sendo sensível a todas as enzimas proteolíticas testadas. A SAM 4244 se mostrou resistente a todas as enzimas proteolíticas empregadas.

<b>Tabela 13</b> – Perfil de sensibilidade das SAM a e	enzimas proteolíticas e ao hidróxido de sódio.
--	--

	Tratamento com				
Estirpes	Protease	Pronase	Tripsina	Proteinase K	NaOH
4059	Resistente	Resistente	Sensível	Sensível	Resistente
4231	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente
4244	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
5409	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível	Resistente
5580	Resistente	Sensível	Resistente	Resistente	Resistente
A70 <sup>1</sup>	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente

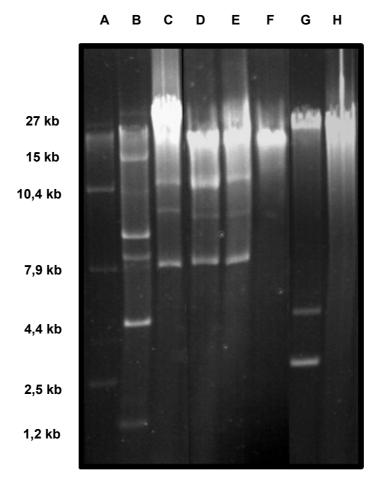
<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>A estirpe A70, produtora da aureocina A70, foi empregada como controle de sensibilidade neste experimento.

Estes resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.

#### 5.3 PERFIL PLASMIDEAL DAS ESTIRPES PRODUTORAS DE SAM

Após a extração de DNA plasmideal e a EGA a 0,7% (itens 4.5 e 4.9), foi feita uma análise do perfil plasmideal das cinco estirpes produtoras de SAM. Desta forma, pôde-se verificar que as estirpes 4244 e 5580 não apresentaram plasmídeos. As estirpes 4059 e 4231 apresentaram três formas plasmideais e a estirpe 5409, duas formas plasmideais (**Figura 7**).

Utilizando-se como padrão as estirpes MB32 (com plasmídeos de 15 kb, 7,9 kb e 2,5 kb) e MB196 (com plasmídeos de 27 kb, 10,4 kb, 4,4 kb e 1,2 kb), foi feita uma estimativa do tamanho molecular das formas plasmideais visualizadas. Desta forma, pôde-se verificar que as estirpes 4059 e 4231 apresentam formas plasmideais com tamanhos de aproximadamente 14,0; 12,0 e 8,0 kb, similares aos das formas do plasmídeo pRJ6 da estirpe A70. Já a estirpe 5409 possui duas formas plasmideais de 3,4 e 5,5 kb.



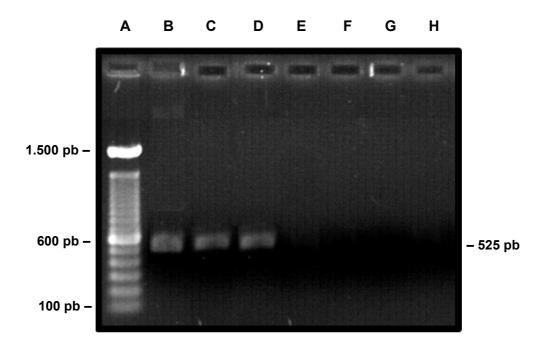
**Figura 7 –** Perfil de DNA plasmideal das estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de SAM, determinado através de EGA a 0,7% (p/v) por 7 h a 70 V. As colunas A e B correspondem às estirpes MB32 e MB196, cujos plasmídeos foram empregados como padrão de tamanho molecular. Coluna C, estirpe A70; D, 4059; E, 4231; F, 4244; G, 5409; H, 5580.

# 5.4 AMPLIFICAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE ESTAFILOCOCCINAS CONHECIDAS

A técnica de PCR (descrita no item 4.7) foi empregada a fim de se verificar se as estirpes de *Staphylococcus* spp. 4059, 4231, 4244, 5409 e 5580 possuem os genes codificadores de algumas estafilococcinas já descritas na literatura.

Ao se empregar os oligonucleotídeos iniciadores P5R e P6F, verificou-se amplificação nas estirpes 4059 e 4231, porém não houve amplificação nas demais estirpes. A detecção do fragmento de cerca de 525 pb (**Figura 8**) nestas duas estirpes indica a presença do operon *aurABCD*, que possui os genes codificadores da aureocina A70.

Nas demais PCR, onde foram empregados diferentes oligonucleotídeos iniciadores responsáveis pela amplificação dos genes *aucA*, *nukA*, *sacαA* e *sacβA*, *pepA*, *epiA*, *elkA* e *eciA*, houve amplificação apenas nos controles positivos (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que estes genes não estão presentes nas estirpes 4059, 4231, 4244, 5409 e 5580.



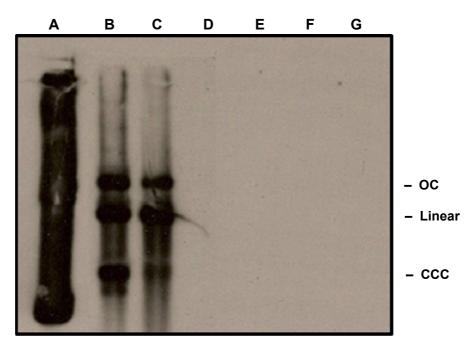
**Figura 8** – Análise dos produtos de amplificação do operon *aurABCD* através de EGA a 1,4% (p/v), por 2 h a 50 V. A coluna A corresponde ao padrão "100-bp DNA ladder"; B, estirpe A70, empregada como controle positivo; C, 4059; D, 4231; E, 4244; F, 5409; G, 5580; H, *S. aureus* A53 (produtora da aureocina A53; controle negativo).

## 5.5 HIBRIDIZAÇÃO DNA/DNA PARA A DETECÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE ESTAFILOCOCCINAS CONHECIDAS

A hibridização DNA/DNA (item 4.10) foi empregada a fim de se confirmar a presença/ausência dos genes estruturais de oito estafilococcinas já descritas na literatura nas estirpes de *Staphylococcus* spp. 4059, 4231, 4244, 5409 e 5580.

Ao se empregar a sonda para a detecção do operon *aurABCD*, foi observada a hibridização com o DNA das estirpes 4059 e 4231, confirmando o resultado da PCR. Além disso, verificou-se que a hibridização ocorreu na região correspondente às três formas plasmideais encontradas nas duas estirpes (**Figura 9**). Quanto às estirpes 4244, 5409 e 5580, não houve hibridização, mostrando que estas estirpes não possuem os genes estruturais para a produção da aureocina A70.

Quando foram utilizadas sondas para a detecção dos genes estruturais das estafilococcinas aureocina A53 (aucA), nukacina ISK-1 (nukA) estafilococcina C55 (sacαA e sacβA), pep5 (pepA), epidermina (epiA), epilancina K7 (elkA) e epicidina 280 (eciA), não houve hibridização com os DNAs testados, somente com os controles positivos (dados não mostrados). Estes resultados confirmaram os resultados obtidos pela PCR, ou seja, a ausência dos genes pesquisados.



**Figura 9** – Hibridização DNA/DNA, empregando-se sonda para a detecção do operon *aurABCD*. A coluna A corresponde à estirpe A70, empregada como controle positivo; B, 4059; C, 4231; D, 4244; E, 5409; F, 5580 e G, *S. aureus* A53 (controle negativo). OC, círculo aberto; CCC, círculo covalentemente fechado.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO DAS SAM

Inicialmente, foi feita a determinação do espectro de ação das cinco estirpes produtoras de SAM contra treze estirpes indicadoras, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus, Lactococcus, Micrococcus, Listeria* e *Enterococcus* (**Tabela 14**). Através deste teste, verificou-se que as SAM produzidas pelas estirpes 4059 e 4231 foram capazes de inibir todas as estirpes empregadas como indicadoras, exceto as estirpes do gênero *Enterococcus*. A SAM 5409 inibiu a maioria das indicadoras, exceto *L. monocytogenes* 11/LM, *L. innocua* ATCC 33090 e as duas estirpes do gênero *Enterococcus*. Já a SAM produzida pela estirpe 5580 inibiu as indicadoras: *L. casei* ATCC 398, *L. lactis* subsp. *cremoris, L. lactis* NZ 9000, *L. lactis* 2084, *L. sakei* DSM 20017, *M. luteus* ATCC 4698, *L. monocytogenes* 7898 e *E. faecium* E89.

**Tabela 14** – Espectro de ação das estirpes produtoras de SAM

	Estirpes produtoras				
Estirpes Indicadoras	4059	4231	4244	5409	5580
Lactobacillus casei ATCC 398	28	26	30	31	15
Lactobacillus sakei DSM 20017	22	23	33	28	19
Lactococcus lactis subsp. cremoris	23	18	30	26	28
Lactococcus lactis NZ 9000	21	20	30	24	23
Lactococcus lactis 2084	23	20	30	26	27
Micrococcus luteus ATCC 4698	21	23	38	14	24
Listeria monocytogenes 11/LM	24	26	30	_	_
Listeria monocytogenes L1/L2a	24	22	29	33	_
Listeria monocytogenes 7898	21	22	26	18	15 <sup>t</sup>
Listeria innocua 397	28	26	30	25	_
Listeria innocua ATCC 33090	24	23	30	_	_
Enterococcus faecium E89	_	_	31	_	22 <sup>cr</sup>
Enterococcus faecalis 2758	-	-	29	_	-

Os números representam o diâmetro dos halos de inibição em milímetros.

Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

cr colônias resistentes no halo de inibição; t halo de inibição turvo; -, ausência de inibição.

Dentre as cinco SAM, a 4244 foi a que apresentou o espectro de ação mais amplo, inibindo todas as estirpes indicadoras empregadas inicialmente (**Tabela 14**). Posteriormente, a atividade da SAM 4244 foi avaliada contra outras 99 estirpes de diferentes gêneros (**Tabela 15**), verificando-se que esta SAM foi capaz de inibir as estirpes de *B. coagulans*, *G. stearothermophilus*, *Kocuria rhizophila* e *Rhodococcus equi*, além de inibir todas as estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de alimentos e de *Streptococcus* spp. e a maioria das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de saladas, empregadas como indicadoras. A SAM 4244 também apresentou atividade antimicrobiana contra todas as estirpes de *Enterococcus* spp. testadas, incluindo algumas resistentes à vancomicina (VRE). Contudo, a SAM 4244 não apresentou atividade inibitória contra *B. cereus* e *B. licheniformis*, nem contra as estirpes de bactérias Gram-negativas de diferentes gêneros empregadas neste teste. Diante do amplo espectro de ação da SAM 4244, esta substância foi selecionada para os estudos posteriores.

Tabela 15 – Espectro de ação da SAM 4244

Estirpes Indicad	doras Halos de Inibição (desvio-padrão
Bacillus cereus	-
Bacillus licheniformis ATCC 12	2759 -
Bacillus coagulans UH	21 (1,7)
Geobacillus stearothermophilu	us ATCC 7953 25 (1,5)
Kocuria rhizophila ATCC 9341	38 (2,3)
Rhodococcus equi ATCC 693	9 32 (0,7)
Staphylococcus aureus ATCC	6538 31 (0,5)
Listeria monocytogenes ATCC	2 19117 32 (1,7)
Listeria spp. L <sub>1</sub>	24 (1,5)
Listeria spp. L <sub>2</sub>	37(0,5)
Listeria spp. L <sub>13</sub>	24 (0,6)
<i>Listeria</i> spp. L <sub>16</sub>	28 (1,8)
Listeria spp. L <sub>18</sub> Listeria spp. L <sub>21</sub>	25 (0,5)
Listeria spp. L <sub>21</sub>	25 (2,0)
Listeria spp. L <sub>23</sub>	22 (1,5)
Listeria spp. L <sub>25</sub>	24 (1,3)
Listeria spp. L <sub>26</sub>	27(1,1)
Listeria spp. L <sub>28</sub>	30 (1,5)

-	Estirpes Indicadoras	Halos de Inibição (desvio-padrão)
Alimentos	Listeria spp. A <sub>5</sub>	25 (1,1)
	Listeria spp. A <sub>7</sub>	25 (0,5)
	Listeria spp. A <sub>8</sub>	26 (1,7)
	Listeria spp. A <sub>10</sub>	24 (1,5)
	Listeria spp. A <sub>11</sub>	28 (0,5)
	Listeria spp. A <sub>12</sub>	32 (2,0)
•	Staphylococcus spp. 2	34 (1,5)
	Staphylococcus spp. 3	34 (1,1)
	Staphylococcus spp. 4	27 (0,5)
	Staphylococcus spp. 6	31 (1,7)
	Staphylococcus spp. 7	32 (2,0)
	Staphylococcus spp. 9	31 (1,5)
	Staphylococcus spp. 10	30 (1,1)
	Staphylococcus spp. 11	32 (0,5)
	Staphylococcus spp. 12	33 (1,5)
æ	Staphylococcus spp. 13	29 (1,7)
Mastite Bovina	Staphylococcus spp. 14	33 (2,0)
te B	Staphylococcus spp. 15	35 (1,1)
<b>l</b> asti	Staphylococcus spp. 16	32 (0,5)
_	Staphylococcus spp. 17	32 (1,5)
	Staphylococcus spp. 18	36 (0,7)
	Staphylococcus spp. 19	34 (1,1)
	Staphylococcus spp. 23	34 (0,5)
	Staphylococcus spp. 24	32 (0,5)
	Staphylococcus spp. 25	34 (1,5)
	Staphylococcus spp. 26	27 (1,1)
	Staphylococcus spp. 30	30 (0,6)
	Staphylococcus spp. 50	31 (1,5)
	Staphylococcus spp. 2S <sub>1</sub>	31 (2,0)
	Staphylococcus spp. 2S <sub>2</sub>	25 (0,5)
qa	Staphylococcus spp. 2S <sub>3</sub>	24 (1,1)
Salada	Staphylococcus spp. 2S <sub>4</sub>	27 (1,5)
•	Staphylococcus spp. 2S <sub>5</sub>	29 (1,1)
_	Staphylococcus spp. 2S <sub>6</sub>	31 (1,7)

-	Estirpes Indicadoras	Halos de Inibição (desvio-padrão)
_	Staphylococcus spp. 2H <sub>1</sub>	29 (0,5)
	Staphylococcus spp. 2H <sub>2</sub>	30 (1,5)
	Staphylococcus spp. 2H <sub>3</sub>	29 (0,6)
	Staphylococcus spp. 3S <sub>4</sub>	23 (1,1)
	Staphylococcus spp. 3H <sub>1</sub>	19 (0,6)
	Staphylococcus spp. 4S <sub>1</sub>	24 (0,5)
	Staphylococcus spp. 4H <sub>4</sub>	27 (1,5)
	Staphylococcus spp. 5S <sub>1</sub>	30 (0,5)
	Staphylococcus spp. 5S <sub>2</sub>	25 (0,6)
	Staphylococcus spp. 5H <sub>1</sub>	27 (1,7)
lada	Staphylococcus spp. 6H <sub>4</sub>	18 (1,5)
Sa	Staphylococcus spp. 6H <sub>10</sub>	26 (1,2)
	Staphylococcus spp. 8S <sub>2</sub>	24 (1,1)
	Staphylococcus spp. 8S <sub>4</sub>	21 (0,6)
	Staphylococcus spp. 8H <sub>4</sub>	22 (1,5)
	Staphylococcus spp. 9S <sub>4</sub>	29 (0,5)
	Staphylococcus spp. 10S <sub>3</sub>	32 (1,1)
	Staphylococcus spp. 10H <sub>2</sub>	27 (0,5)
	Staphylococcus spp. 13S <sub>2</sub>	25 (2,0)
	Staphylococcus spp. 13S <sub>3</sub>	30 (1,1)
-	Staphylococcus spp. 13H₁	30 (1,5)
	Streptococcus spp. 5112	22 (2,0)
	Streptococcus spp. 5125	30 (1,5)
	Streptococcus spp. 5445	35 (1,1)
Bovina	Streptococcus spp. 5451	28 (1,5)
	Streptococcus spp. 5453	31 <sup>CR</sup> (2,3)
Mastite	Streptococcus spp. 5454	27 (1,1)
Š	Streptococcus spp. 5480	28 (0,5)
	Streptococcus spp. 5526	28 (2,0)
	Streptococcus spp. 5747	26 (1,7)
	Streptococcus spp. 5775	19 (1,5)
	Streptococcus spp. 5854	30 (1,0)
-	Streptococcus spp. 5858	25 (0,6)

	Estirpes Indicadoras	Halos de Inibição (desvio-padrão)		
•	Enterococcus spp. CL5184	26 (1,5)		
	Enterococcus spp. CL5241	26 (1,5)		
	Enterococcus spp. CL5244	25 (0,5)		
S)	Enterococcus spp. CL5866	28 (0,5)		
humanas	Enterococcus spp. CL6174	27 (0,5)		
hun	Enterococcus spp. CL6179	30 (1,0)		
Clínicas	Enterococcus spp. CL6258	32 (0,6)		
Clín	Enterococcus spp. SS1273	25 (0,6)		
	Enterococcus spp. SS1274	25 (2,0)		
	Enterococcus spp. 3062-95	25 (0)		
	Enterococcus spp. 3129-97	25 (0,6)		
	Enterococcus spp. 4047-96	27 (1,0)		
_	Enterococcus spp. 4078-96	27 (1,0)		

Os números representam o diâmetro dos halos de inibição em milímetros. Os resultados representam a média e o desvio-padrão de três experimentos independentes..

-, ausência de inibição; <sup>CR</sup>, presença de colônias resistentes no halo de inibição.

### 5.7 IDENTIFICAÇÃO EM ESPÉCIE DA ESTIRPE 4244 ATRAVÉS DA ANÁLISE DE rDNA 16S

A estirpe *Staphylococcus* spp. 4244 foi identificada ao nível de espécie através da análise da sequência de rDNA 16S, que revelou uma similaridade de 99% com *Staphylococcus hyicus*.

#### 5.8 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA SAM 4244 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

A cinética de produção da SAM 4244 foi determinada nos meios BHI, GBHI, M17, GM17 e TSB durante 24 h a 37°C (**Figura 10**). Ao se avaliar a produção nos diferentes meios de cultura, verificou-se que a atividade antimicrobiana foi primeiramente detectada em meio TSB, após 3 h de cultivo, enquanto que nos demais meios foi detectada inicialmente após 4 h. Nos meios GM17, TSB e GBHI, o título máximo de atividade antimicrobiana obtido foi 80 UA/mI, observado após 4 h, 6 h e 24 h de cultivo, respectivamente. Dentre os cinco meios de cultura, a produção de SAM 4244 foi máxima nos meios BHI e M17 (160 UA/mI) após 8 h de cultivo, mantendo-se estável após 24 h. Diante deste resultado, o meio BHI foi o escolhido para a produção da SAM 4244.

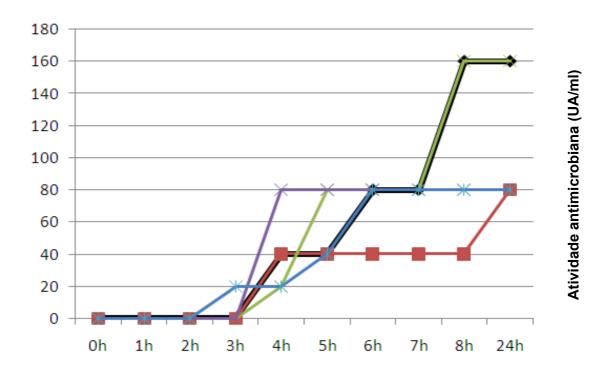


Figura 10 – Cinética de produção da SAM 4244 nos meios BHI (), GBHI ), M17 ), GM17 () e TSB () a 37°C durante 24 h de cultivo da estirpe *Staphylococcus* spp. 4244. Estes resultados representam a média de três experimentos independentes (desvio-padrão igual a zero).

0

## 5.9 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E DE PRODUÇÃO DA SAM 4244 EM MEIO BHI

A cinética de crescimento da estirpe 4244, quando comparada à cinética de produção da SAM, em meio BHI, revelou que a máxima produção desta bacteriocina (8 h; 160 UA/mI) ocorre ainda na fase exponencial de crescimento da estirpe produtora (**Figura 11**). Adicionalmente, verificou-se que, entre 12 e 24 h, a cultura ainda não está em fase estacionária de crescimento, havendo ainda uma elevação na DO<sub>600</sub> após 24 h de cultivo. Paralelamente, a atividade antimicrobiana de 160 UA/mI manteve-se constante entre 8 e 24 h de cultivo, sugerindo que esta SAM seja realmente resistente às enzimas proteolíticas liberadas no meio de cultura, conforme visto anteriormente no item 5.2.

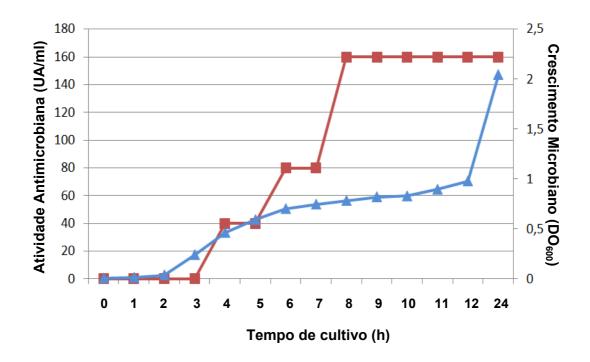
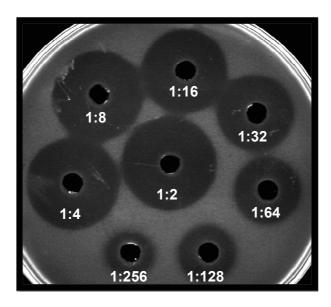


Figura 11 – Cinética de crescimento ( ) e produção da SAM 4244 ( ) em meio BHI durante cultivo da estirpe *Staphylococcus* spp. 4244 a 37°C por 24 h. Os títulos de atividade representam a média de três experimentos independentes com desvio-padrão igual a zero.

## 5.10 CONCENTRAÇÃO DA SAM 4244

Após a concentração do sobrenadante da cultura (160 UA/ml) com sulfato de amônio, foi obtida uma atividade de 5.120 UA/ml da SAM 4244 contra a indicadora *M. luteus* (**Figura 12**).



**Figura 12** — Titulação da SAM 4244 após concentração com sulfato de amônio, utilizando-se *M. luteus* como indicadora. Os números correspondem às diluições seriadas do concentrado.

#### 5.11 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DA SAM 4244

#### 5.11.1 Sensibilidade da SAM 4244 a enzimas proteolíticas

O teste de sensibilidade da SAM 4244 às enzimas proteolíticas mostrou que a SAM 4244 foi resistente à pepsina e à tripsina, mantendo a atividade de 2.560 UA/ml. Após o tratamento com as enzimas pronase E e proteinase K foi verificada uma redução de 75 e de 50%, respectivamente, na atividade da SAM contra a indicadora *M. luteus* (**Tabela 16**).

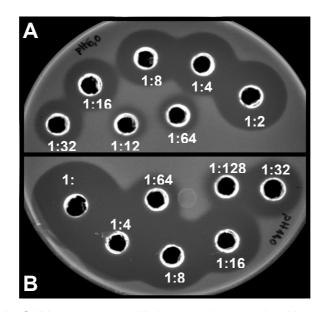
#### 5.11.2 Ação do pH sobre a atividade da SAM 4244

A partir de uma solução da SAM 4244 com atividade de 2.560 UA/ml, verificou-se que a atividade antimicrobiana foi mantida após ser submetida aos valores de pH 3,0; 6,0 (controle); 9,0 e 11,0, por 4 h, mostrando que esta SAM é estável em uma ampla faixa de pH (**Tabela 16**). Vale ressaltar que, nos três experimentos realizados, observou-se um relativo aumento nos halos de inibição das amostras tratadas com pH 9,0 e 11,0 (quando comparadas ao controle), sem, contudo, haver aumento no titulo de atividade antimicrobiana (**Figura 13**).

**Tabela 16** – Estabilidade da SAM 4244 sob ação de diferentes valores de pH, temperaturas e enzimas proteolíticas

T
Atividade (UA/ml)
2.560 UA/ml
640 UA/ml
1.280 UA/ml
2.560 UA/ml
1.280 UA/ml
2.560 UA/ml

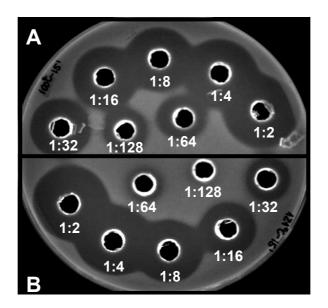
Estes resultados representam a média de três experimentos independentes (desvio-padrão igual a zero).



**Figura 13** – Atividade da SAM 4244 contra *M. luteus* sob ação de pH 6,0 (A) e pH 11,0 (B). Os números correspondem às diluições da SAM 4244.

#### 5.11.3 Ação da temperatura sobre a atividade da SAM 4244

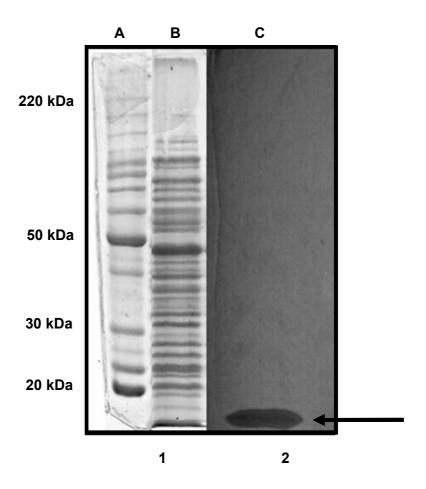
A SAM 4244 manteve a atividade antimicrobiana após ser submetida aos tratamentos a 65°C e a 80°C por 15 e 30 min (**Tabela 16**). Após os tratamentos a 100°C por 5 e 15 min, também não foi verificada perda de atividade da SAM, sendo mantida a atividade de 2.560 UA/ml. Contudo, após 15 min a 121°C, a atividade foi reduzida para 1.280 UA/ml (**Figura 14**). Estes resultados mostraram que a SAM 4244 é altamente termorresistente.



**Figura 14** – Atividade da SAM 4244 contra *M. luteus* após tratamento térmico a 100°C por 15 min (A) e 121°C por 15 min (B). Os números correspondem às diluições da SAM 4244.

#### 5.12 ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR DA SAM 4244

O perfil proteico da estirpe *S. hyicus* 4244 pela SDS-PAGE revelou pelo menos 30 bandas com peso molecular entre 220 e 20 kDa e, no mínimo, três com massa molecular menor do que 20 kDa. Ao se comparar este perfil proteico com a zona de inibição da estirpe indicadora, visualizada no gel testado quanto à atividade antimicrobiana, verificou-se que a zona de inibição correspondia a uma das bandas de peso molecular menor do que 20 kDa (**Figura 15**).



**Figura 15** – Perfil de atividade da SAM em SDS-PAGE. (1) Parte do gel corada com "Coomassie Blue" a fim de se observar o perfil de proteínas da estirpe *S. hyicus* 4244 (coluna B); coluna A, padrão de peso molecular (10 – 220 kDa). (2) Parte do gel com a SAM 4244 concentrada, coberto com BHI semissólido contendo a indicadora *M. luteus*, para a visualização da zona de inibição (seta).

## 5.13 CINÉTICA DE AÇÃO DA SAM 4244

A cinética de ação da SAM 4244 foi analisada a partir de uma cultura de *L. monocytogenes* com 10<sup>7</sup> ufc/ml e DO<sub>600</sub> de 0,1, adicionada de 1.000 UA/ml de SAM 4244. A análise da cinética de crescimento na presença da SAM 4244 mostrou que esta substância foi capaz de reduzir o crescimento da estirpe de *L. monocytogenes* em aproximadamente três unidades log, após 8 h de cultivo, quando comparado ao controle sem a adição da SAM (**Figura 16**). Paralelamente, verificou-se que, enquanto no controle a DO<sub>600</sub> aumentou para 0,5, na amostra com a SAM 4244, a DO<sub>600</sub> foi mantida em aproximadamente 0,1. Estes resultados sugerem que a SAM 4244 seja bacteriostática, visto que não resultou em uma redução no número de células viáveis, e não bacteriolítica, pois não causou lise celular (DO<sub>600</sub> não foi reduzida). Adicionalmente, a atividade bacteriostática foi avaliada através do seguinte teste: um pequeno pedaço de ágar (1 cm²) foi retirado assepticamente de um halo de inibição e inoculado em meio BHI sólido. Desta forma, foi verificado crescimento celular após 18 h de cultivo, confirmando que esta SAM é bacteriostática (dados não mostrados).

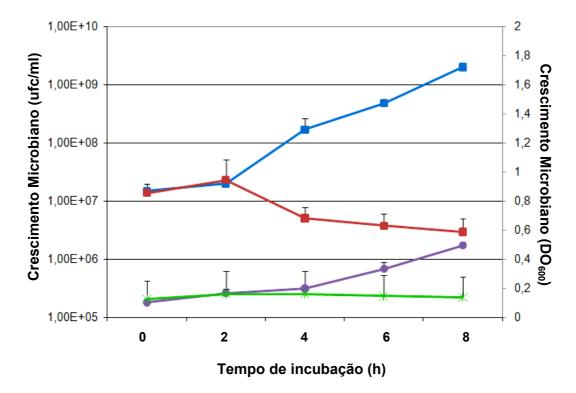


Figura 16 – Cinética de ação da SAM 4244 contra a indicadora *L. monocytogenes* ATCC 19117.

Contagem de células em ucf/ml na presença de 1.000 UA/ml ( ) e na ausência ( ) da SAM 4244 e DO<sub>600</sub> na presença ( ) da SAM 4244 e do controle, sem SAM ).

Os resultados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro representam o desvio-padrão dos experimentos.

#### 5.14 ATIVIDADE DA SAM 4244 EM LEITE DESNATADO UHT E EM MEIO TSB

A fim de se avaliar a potencial aplicação da SAM 4244 como biopreservativo de alimentos, foram adicionadas 1.000 UA/ml desta SAM em amostras de leite UHT desnatado previamente contaminadas com aproximadamente 10<sup>7</sup> ufc/ml de *L. monocytogenes* ATCC 19117 e de *S. aureus* A70 Bac<sup>-</sup> (este microrganismo foi escolhido, pois a estirpe original foi isolada de leite comercial). Paralelamente, este experimento foi realizado em meio TSB.

Nas amostras de leite contaminado com *L. monocytogenes*, verificou-se que, após 8 h de incubação, ocorreu uma elevação do número de células viáveis de 10<sup>7</sup> para aproximadamente 4,0x10<sup>8</sup> ufc/ml. Contudo, nas amostras onde se adicionou a SAM 4244 não foi observado crescimento microbiano, visto que o número de células viáveis se manteve em torno de 10<sup>7</sup> ufc/ml durante as 24 h de incubação (**Figura 17**).

Em meio TSB, sem a adição da SAM 4244, o crescimento da *L. monocytogenes* (2,5x10<sup>9</sup> ufc/ml) foi mais acentuado do que em leite (3,5x10<sup>8</sup> ufc/ml), após 8 h de cultivo. Nas amostras adicionadas da SAM, não houve aumento do número de células viáveis, permanecendo aproximadamente 10<sup>7</sup> ufc/ml ao longo das 24 h de incubação. Desta forma, pôde-se observar que a SAM 4244 possui ação contra a *L. monocytogenes*, não somente em meio de cultura, mas também em leite UHT, sendo capaz de inibir o crescimento microbiano (**Figura 17**).

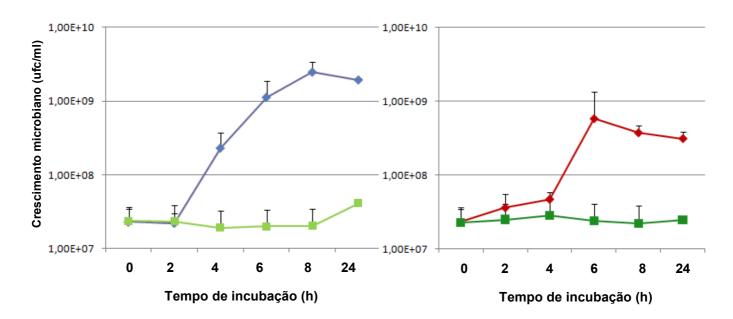
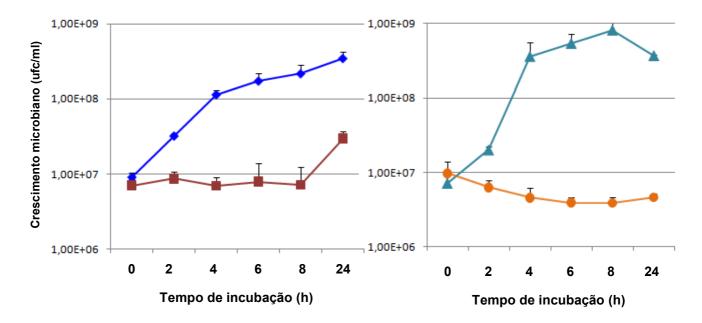


Figura 17 – Atividade da SAM 4244 contra a indicadora *L. monocytogenes* ATCC 19117 em leite UHT desnatado (————) e em meio TSB (—————). Controles de crescimento em leite (—————) e em TSB (—————). Os resultados representam a média de três experimentos independentes. As barras de erro representam o desvio-padrão dos experimentos.

A SAM 4244 apresentou atividade similar contra a estirpe *S. aureus* A70 Bac<sup>-</sup> em meio TSB e em leite UHT. No controle de crescimento em leite, foi verificado um acentuado crescimento após 24 h de incubação (3,5x10<sup>8</sup> ufc/ml). Nas amostras de leite com a SAM 4244, o crescimento microbiano foi inibido durante 8 h de cultivo, mantendo-se abaixo de 10<sup>7</sup> ufc/ml. Contudo, após 24 h, ocorreu uma discreta elevação no número de células viáveis (3x10<sup>7</sup>ufc/ml), que pode estar relacionada a uma concentração insuficiente da SAM aplicada ao alimento.

A SAM 4244 se mostrou mais efetiva contra *S. aureus* A70 Bac<sup>-</sup> em meio TSB, visto que foi capaz de manter a contagem de células viáveis em valores abaixo de 10<sup>7</sup> ufc/ml ao longo das 24 h de cultivo. No controle, o número de células viáveis aumentou para aproximadamente 10<sup>9</sup> ufc/ml, após 8 h de incubação. Contudo, após 24 h, foi verificado um acentuado decréscimo na contagem de células (4x10<sup>8</sup> ufc/ml).



## 5.15 DETERMINAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DA SAM 4244

A atividade da SAM 4244 foi avaliada após estocagem a -20°C, a 4°C e à temperatura ambiente, a fim de se determinar a sua estabilidade por longos períodos. Os resultados obtidos até o momento mostraram que a SAM 4244 foi estável à temperatura ambiente durante cinco meses, havendo uma redução de metade da atividade (2.560 UA/ml) após a 22ª semana de incubação. Contudo, esta SAM se manteve estável, com a atividade de 5.120 UA/ml, por pelo menos seis meses de incubação a 4°C. Quanto à estocagem a -20°C, verificou-se que a SAM 4244 permaneceu completamente ativa por no mínimo um ano e meio.

### 6. DISCUSSÃO

Os microrganismos possuem uma série de mecanismos de defesa, incluindo a produção de antibióticos, metabólitos secundários, toxinas e bacteriocinas. As bacteriocinas já foram encontradas em quase todas as espécies de *Bacteria* examinadas até o momento, e, mais recentemente, também foram encontradas em algumas espécies de *Archaea* (SHAND & LEYVA, 2007). A grande frequência e diversidade de bacteriocinas produzidas por microrganismos têm incentivado muito as pesquisas neste campo, já que há uma grande necessidade de métodos alternativos eficazes para o tratamento de infecções causadas por estirpes bacterianas multirresistentes aos antimicrobianos tradicionais, além da potencial aplicação das bacteriocinas como biopreservativos de alimentos (RILEY & CHAVAN, 2007).

Diante dessa potencial aplicação, alguns laboratórios têm analisado estirpes bacterianas de diferentes origens quanto à produção de bacteriocinas. Em nosso laboratório, as pesquisas nesta área se iniciaram na década de 80, quando GiambiagideMarval *et al.* (1990) identificaram 15 estirpes de *S. aureus* produtoras de SAM, sendo algumas caracterizadas posteriormente como bacteriocinas.

No presente trabalho, foram analisadas, quanto à produção de SAM, 47 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de diferentes rebanhos de gado bovino e bubalino da região sudeste do Brasil. Dentre essas 47 estirpes, 26 (55,3%) apresentaram atividade antimicrobiana contra a indicadora *C. fimi*. No entanto, somente cinco (~11%) apresentaram halos de inibição maiores do que 20 mm. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira *et al.* (1998b) que, ao analisarem 46 estirpes de *S. aureus* isoladas de gado aparentemente saudável, identificaram quatro (8,7%) estirpes produtoras de SAM. Em 2005, Ceotto identificou, dentre 257 estirpes de *S. aureus* isolados de mastite bovina da região sudeste do Brasil, 46 estirpes produtoras de SAM, sendo que 14,8% do total apresentaram halos maiores do que 20 mm. A baixa porcentagem de estirpes produtoras de SAM com atividade inibitória resultando em halos maiores do que 20 mm sobre *C. fimi* contrasta com os resultados obtidos por Nascimento *et al.* (2002) que, ao estudarem 50 estirpes de *S. aureus* isoladas de gado com mastite na Argentina, verificaram que 12 (24%) apresentavam halos de inibição iguais ou maiores do que 20 mm contra a mesma estirpe indicadora.

As cinco SAM escolhidas para serem estudadas neste trabalho foram resistentes ao hidróxido de sódio, mostrando que a ação antimicrobiana não é devido à produção de substâncias de caráter ácido. As SAM 4059, 4231, 5409 e 5580 foram sensíveis a pelo menos uma das enzimas proteolíticas empregadas. Este perfil de sensibilidade mostra que tais SAM têm caráter proteico, sugerindo que sejam bacteriocinas. Contudo, a SAM 4244

apresentou resistência às enzimas proteolíticas empregadas neste teste de sensibilidade preliminar realizado em placa. A fim de se confirmar este resultado, a sensibilidade da SAM 4244 a enzimas proteolíticas foi avaliada através de titulação a partir de difusão em ágar empregando-se a SAM precipitada com sulfato de amônio. Desta forma, foi verificado que a SAM 4244 é parcialmente sensível às enzimas proteinase K e pronase E e resistente à pepsina e à tripsina. Contudo, não se descarta a possibilidade desta SAM ser uma bacteriocina, visto que na literatura há relatos de bacteriocinas atípicas resistentes a enzimas proteolíticas, como, por exemplo, a aureocina A53, caracterizada pelo nosso grupo (NETZ et al., 2002).

Em bactérias Gram-positivas, os genes relacionados à produção de bacteriocinas geralmente estão localizados em plasmídeos (JACK, TAGG & RAY, 1995). Contudo, há várias bacteriocinas cujos determinantes genéticos estão localizados no cromossomo, como, por exemplo, a epicidina 280 (HEIDRICH et al., 1998) e o lantibiótico Smb produzido por Streptococcus mutans (YONEZAWA & KURAMITSU, 2005). Diante do exposto, foi feita uma análise do perfil plasmideal das cinco estirpes produtoras de SAM, sendo verificado que as estirpes 4059 e 4231 apresentaram três formas plasmideais com tamanhos similares aos das formas do plasmídeo pRJ6 da estirpe A70. Na estirpe 5409, foram observadas duas formas plasmideais. Porém, acredita-se que estas duas formas não correspondam a um plasmídeo bacteriocinogênico, uma vez que são muito pequenas para conter todos os genes necessários para a biossíntese de uma bacteriocina. Os plasmídeos codificadores de bacteriocinas descritos em Staphylococcus spp., até o momento, apresentam no mínimo cerca de 8,0 kb de tamanho (GIAMBIAGI-DeMARVAL et al., 1990; GAMON et al., 1999). As estirpes 4244 e 5580 não apresentaram plasmídeos, sugerindo que os genes codificadores dessas SAM estejam localizados no cromossomo.

Com o objetivo de se verificar se as cinco SAM estudadas neste trabalho são diferentes das estafilococcinas descritas até o ano 2009, foram feitas reações de PCR e hibridização DNA/DNA para a detecção dos genes codificadores das bacteriocinas: aureocinas A53 e A70, estafilococcina C55, Pep5, epidermina, epicidina 280, epilancina K7 e nukacina ISK-1. Desta forma, verificou-se a ausência desses genes nas estirpes 4244, 5409 e 5580, sugerindo, portanto, que as SAM produzidas por estas estirpes sejam diferentes das oito estafilococcinas.

Através da PCR, feita com iniciadores específicos para a amplificação do operon aurABCD, verificou-se a amplificação de um fragmento com cerca de 525 pb nas estirpes 4059 e 4231, mostrando que as SAM produzidas por estas estirpes são idênticas ou semelhantes à aureocina A70. Além disto, o perfil plasmideal destas estirpes e a hibridização DNA/DNA para a detecção do operon aurABCD sugeriram que os genes

codificadores destas SAM estejam localizados nos plasmídeos com cerca de 8,0 kb, que é o tamanho aproximado do plasmídeo pRJ6, codificador da aureocina A70 (GIAMBIAGI-DeMARVAL *et al.*, 1990).

Diversos trabalhos em nosso laboratório têm demonstrado a grande disseminação de plasmídeos semelhantes ao pRJ6, codificador da aureocina A70, em diversas estirpes de *S. aureus* isolados de diferentes origens (GIAMBIAGI-DeMARVAL *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1998b; GAMON *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2002; CEOTTO *et al.*, 2009). Em 2005, Nascimento *et al.* descreveram pela primeira vez este tipo de plasmídeo em SCN. Provavelmente, a disseminação de plasmídeos semelhantes ao pRJ6 entre estirpes de *Staphylococcus* spp. é devida a sua capacidade de serem mobilizáveis por plasmídeos conjugativos (OLIVEIRA *et al.*, 1998a; COELHO *et al.*, 2009).

Ao se investigar o espectro de ação das cinco estirpes produtoras de SAM contra 13 bactérias de diferentes gêneros, verificou-se que as SAM 4059, 4231, 5409 e 5580 apresentaram um amplo espectro de ação, inibindo a maioria das bactérias empregadas como indicadoras. A SAM 4244 se destacou dentre as demais, visto que inibiu todas as 13 estirpes empregadas na determinação preliminar do espectro de ação. Diante do seu amplo espectro de ação e a ausência de similaridade com outras estafilococcinas, a SAM 4244 foi selecionada para os estudos posteriores.

A atividade da SAM 4244 foi então avaliada contra outras 99 estirpes indicadoras. A SAM 4244 apresentou uma destacada atividade contra microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Além de inibir diferentes estirpes do gênero *Listeria* isoladas de alimentos, como linguiça e alface, também foi capaz de inibir as quatro estirpes de *L. monocytogenes* empregadas como indicadoras. Adicionalmente, esta SAM inibiu *B. coagulans*, *G. stearothermophilus* e 27 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de saladas de diferentes restaurantes no Rio de Janeiro.

B. coagulans é um microrganismo de relevância para a indústria de sucos de fruta, devido a sua capacidade de resistir ao pH ácido e promover a deterioração do produto (BEVILACQUA et al., 2009). Em 2006, Lucas et al. avaliaram a atividade da enterocina AS-48 contra B. coagulans em suco de abacaxi e observaram que a adição desta bacteriocina foi capaz de reduzir significativamente a contagem de células viáveis após 24 h de incubação. G. stearothermophilus também é de grande importância para as indústrias de alimentos devido a sua capacidade de resistir ao tratamento térmico ao qual os produtos comercialmente estéreis são submetidos, sendo capaz de promover a deterioração desses alimentos (HEAD et al., 2008). Até o presente momento, nosso grupo desconhece relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana de outra estafilococcina contra este deteriorante

de alimento. Contudo, já foi visto que a enterocina AS-48 também apresenta atividade antimicrobiana contra duas estirpes de *G. stearothermophilus* (VIEDMA *et al.*, 2009a).

Além da atividade contra bactérias de importância para as indústrias de alimentos, a SAM 4244 possui também ação antimicrobiana contra microrganismos de importância clínica, como *S. aureus, Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e *Streptococcus* spp., apresentando, inclusive, atividade contra *Enterococcus* resistentes à vancomicina. Os VRE têm emergido recentemente como importantes patógenos nosocomiais e, até momento, as possibilidades de tratamento das infecções por eles causadas são bastante limitadas (RATHE *et al.*, 2010). Recentemente, uma comparação das atividades das bacteriocinas nisina e lacticina 3147 feita contra VRE mostrou que esta última foi significativamente potente contra este patógeno (PIPER *et al.*, 2009).

A SAM 4244 não foi capaz de inibir as estirpes de bactérias Gram-negativas empregadas como indicadoras, visto que, em geral, as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas possuem alta atividade contra estirpes evolutivamente relacionadas, não apresentando geralmente atividade contra bactérias Gram-negativas (RILEY & CHAVAN, 2007). Contudo, estas bacteriocinas podem ser ativas contra estirpes Gram-negativas através da sua combinação com outras tecnologias antimicrobianas (ARAKAWA et al., 2009).

Através da análise da cinética de produção da SAM 4244 durante 24 h a 37°C, foi observado que a máxima atividade antimicrobiana ocorreu em 8 h de cultivo nos meio BHI e M17, mantendo-se estável após 24 h de cultivo. Diferentemente de muitas estafilococcinas e de outras bacteriocinas descritas na literatura (NASCIMENTO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2009), a máxima atividade antimicrobiana da SAM 4244 não coincidiu com o período entre o final da fase exponencial de crescimento e o início da fase estacionária, visto que entre 8 e 24 h de cultivo foi detectado um acentuado crescimento microbiano da estirpe produtora (**Figura 11**).

Neste trabalho, foi visto ainda que a estirpe produtora da SAM 4244 é pertencente à espécie *S. hyicus*. Até o momento, não há na literatura a descrição de nenhuma bacteriocina já caracterizada produzida por esta espécie de *Staphylococcus*. O único relado anterior sobre atividade antimicrobiana de *S. hyicus* foi publicado em 1985, quando Balusek e Hájek, ao avaliarem a atividade antagonística de 1.014 estirpes de SCP de diferentes origens, identificaram 52 estirpes produtoras de SAM, em um total de 136 estirpes de *S. hyicus* subsp. *hyicus* testadas. Balusek e Hájek (1985) verificaram também que dentre as estirpes de *S. hyicus*, 45 produziram SAM com atividade bacteriostática. Resultado similar foi visto através da cinética de ação da SAM 4244, que revelou que esta SAM semipurificada é bacteriostática e não bacteriolítica contra *L. monocytogenes*. O efeito bacteriostático já foi

reportado para outras bacteriocinas, como a nukacina ISK-1 (ASADUZZAMAN *et al.*, 2009) e a plantaricina C19 (ATRIH *et al.*, 2001).

Uma mesma bacteriocina podem atuar de forma bactericida ou bacteriostática, visto que alguns fatores, como: a dose de bacteriocina empregada, o grau de purificação, a fase de crescimento da estirpe indicadora e as condições do experimento, podem interferir na cinética de ação de uma determinada bacteriocina (DERAZ et al., 2007). Além disso, o modo de ação de uma mesma bacteriocina pode ser distinto contra diferentes estirpes indicadoras. Um exemplo disto é o lantibiótico MU1140, que é bactericida contra *S. aureus* multirresistentes a drogas e *Streptococcus pneumoniae* e bacteriostático contra *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (GHOBRIAL, DERENDORF & HILLMAN, 2009). Outro exemplo é a vibriocina AVP10, que apresenta ação bactericida contra a indicadora *Vibrio anguillarum* AVS9 e bacteriostática contra *E. coli* (ZAI, AHMAD & RASOOL, 2009).

A SAM 4244 apresentou alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (3,0 – 11,0), permanecendo completamente ativa após os tratamentos em diferentes valores de pH por 4 h. A estabilidade em uma ampla faixa de pH confere à SAM 4244 uma significativa vantagem, inclusive sobre a nisina. Embora a nisina seja extensivamente aplicada como um biopreservativo de alimentos, a sua estabilidade e solubilidade se reduzem significativamente em valores de pH neutros e básicos (ROLLEMA *et al.*, 1995; HATA, TANAKA & OHMOMO, 2010). Além disso, a alta estabilidade da SAM 4244 em diferentes valores de pH possibilita a sua aplicação em diferentes tipos de alimentos.

A SAM 4244 também apresentou uma alta termoestabilidade, mantendo completa atividade inclusive após fervura por 15 min. Mesmo após autoclavação (121°C por 15 min), a SAM 4244 manteve 50% de sua atividade, resultado semelhante ao apresentado pela nukacina 3299 (CEOTTO, 2009). Porém, algumas bacteriocinas descritas, como a pediocina ST44AM, são completamente resistentes à autoclavação (TODOROV & DICKS, 2009), enquanto outras, como a Bac 14, produzida por *B. subtilis*, perdem completamente a sua atividade após serem submetidas ao mesmo tratamento (HAMMAMI *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a SAM 4244 se manteve completamente ativa à temperatura ambiente por cinco meses. Quando estocada a 4°C e a -20°C, esta SAM manteve 100% de atividade por pelo menos seis meses e um ano e meio, respectivamente. Portanto, esta SAM apresenta alta estabilidade, podendo ser estocada por longos períodos. Outras bacteriocinas apresentam menor estabilidade, como a paracina 1.7, produzida por *Lactobacillus paracasei* HD1.7, que começa a perder atividade após quatro meses a 4°C (GE *et al.*, 2009). Contudo, será necessário avaliar a estabilidade da SAM 4244 após a sua purificação.

A estimativa da massa molecular da SAM 4244, através da SDS-PAGE, revelou que esta substância é menor do que 20 kDa. As principais estafilococcinas já caracterizadas apresentam massas moleculares entre 2,0 e 3,5 kDa, com exceção da aureocina A53 e da lisostafina, que possuem aproximadamente 6,0 kDa e 27 kDa, respectivamente (BASTOS *et al.*, 2009). Posteriormente, a SDS-PAGE será feita empregando-se um padrão de peso molecular com bandas entre 50 e 2 kDa, a fim de se obter uma estimativa mais precisa da massa molecular, sendo necessária também a estimativa a partir da SAM purificada, visto que, com a amostra concentrada, pode ocorrer uma maior agregação das moléculas, resultando em um peso molecular maior do que o real.

As características da SAM 4244 apresentadas neste trabalho sugerem que esta SAM possa pertencer à classe I ou II das bacteriocinas. Contudo, a alta termorresistência e a estabilidade em diferentes valores de pH indicam uma maior possibilidade da SAM 4244 ser um lantibiótico.

L. monocytogenes e S. aureus são importantes patógenos associados a produtos lácteos, estando, muitas vezes, envolvidos em surtos alimentares (CDC, 2009). A aplicação da SAM 4244 em leite e em meio TSB mostrou que esta substância antimicrobiana foi capaz de inibir de forma eficiente o crescimento destes dois patógenos, tanto em meio TSB quanto em leite, durante 24 h de estocagem a 37°C, mostrando mais uma vez que a SAM 4244 tem grande potencial de aplicação como um biopreservativo de alimentos.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Dentre as cinco estirpes produtoras de SAM, duas (4059 e 4231) produziram SAM semelhantes à aureocina A70.
- ✓ As SAM 4244, 5409 e 5580 não são similares as estafilococcinas: aureocinas A53 e A70, estafilococcina C55, Pep5, epidermina, epicidina 280, epilancina K7 e nukacina ISK-1.
- ✓ A SAM 4244 apresentou um amplo espectro de ação, inibindo o crescimento de importantes patógenos alimentares, como *L. monocytogenes* e *S. aureus*, e de microrganismos deteriorantes de alimentos, como *G. stearothermophillus*, além de inibir patógenos de importância clínica, como VRE.
- ✓ A SAM 4244 apresenta características favoráveis a sua aplicação em alimentos, como alta termoestabilidade, atividade em ampla faixa de pH e resistência parcial ou total a enzimas proteolíticas.
- ✓ A SAM 4244 apresenta uma longa vida de prateleira, mantendo-se completamente ativa a -20°C por pelo menos um ano e meio e a 4°C por pelo menos seis meses de armazenamento.
- ✓ A aplicação da SAM 4244 em leite revelou que esta substância foi efetiva contra L. monocytogenes e S. aureus nesta matriz alimentar, mostrando o potencial de aplicação da SAM 4244 como um biopreservativo de alimentos.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Purificar a SAM 4244.
- Determinar a massa molecular da SAM 4244 através de espectrometria de massa, além de se proceder ao sequenciamento dos seus ácidos aminados.
- Empregar mais estirpes bacterianas isoladas de alimentos para a determinação do espectro de ação da SAM 4244.
- Avaliar a atividade da SAM 4244 contra *Listeria monocytogenes* em leite durante o armazenamento a 4°C.
- Avaliar a potencial aplicação da SAM 4244 como biopreservativo de alimento em outras matrizes alimentares.
- Analisar o efeito combinado da SAM 4244 com outras bacteriocinas e com outros métodos antimicrobianos.
- Estudar a organização genética dos genes envolvidos na biossíntese da SAM 4244.
- Após a identificação dos seus determinantes genéticos, iniciar os estudos para a expressão heteróloga da SAM 4244 em um microrganismo com *status* "GRAS", objetivando sua produção em larga escala e aplicação como biopreservativo de alimentos.

## 9. REFERÊNCIAS

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C. E. S. R.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONN, I. C. F.; SILVA, D. A. & LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Appl. Environ. Microbiol., 73(12): 3845–3849, 2007.

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

ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L. & SWERDLOW, D. L. **Emerging foodborne diseases**. Emerg. Infect. Dis., 3:285–293, 1997.

ANDREW, S. M.; MOYES, K. M.; BORMB, A. A.; FOX, L. K.; LESLIE, K. E.; HOGAN, J. S.; OLIVER, S. P.; SCHUKKEN, Y. H.; OWENS, W. E. & NORMAN, C. Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. Vet. Microbiol., 134: 150–156, 2009.

ARAKAWA, K.; KAWAI, Y.; IIOKA, H.; TANIOKA, M.; NISHIMURA, J.; KITAZAWA, H.; TSURUMI, K. & SAITO, T. Effects of gassericins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. J. Dairy Sci., 92(6): 2365-2372, 2009.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F. & SOUZA, G. N. **Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58(3): 440-446, 2006.

ASADUZZAMAN, S. M.; NAGAO, J.; IIDA, H.; ZENDO, T.; NAKAYAMA, J. & SONOMOTO, K. **Nukacin ISK-1, a bacteriostatic lantibiotic**. Antimicrob. Agents Chemother., 53(8): 3595-3598, 2009.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H. & KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol. Infect., 130: 33–40, 2003.

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.

ATRIH, A.; REKHIF, N.; MOIR, A. J.; LEBRIHI, A. & LEFEBVRE, G. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. Int. J. Food Microbiol., 68: 93–104, 2001.

BALUSEK, J. & HÁJEK, V. **Antagonistic activities of coagulase-positive staphylococci.** J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 29(2): 147-154, 1985.

BANNERMAN, T. L. & PEACOCK, S. J. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> ed., Washington, DC, ASM Press., p. 390-411, Edited by Murray, P.R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. & Yolken, R. H., 2007.

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

BARKEMA, H. W.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J. & ZADOKS, R. N. Invited review: the role of contagious disease in udder health. J. Dairy Sci., 92(10): 4717–4729, 2009.

BARROS, J. R. Aplicação de nisina em tripa natural para o controle de microrganismos deteriorantes em salsicha. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto de Mauá de Tecnologia, 2009.

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

BATT, C. A. **Introduction**. Encyclopedia of food microbiology. In: Edited by Robinson, R. K.; Batt, C. A. & Patel, P. D. San Diego, CA: Academic Press, p. 1195-1198, 2004.

BEVILACQUA, A.; COSTA, C.; CORBO, M. R. & SINIGAGLIA, M. Effects of the high pressure of homogenization on some spoiling micro-organisms, representative of fruit juice microflora, inoculated in saline solution. Lett. Appl. Microbiol., 48(2): 261-267, 2009.

BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C. & RAY, B. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Ind. Microbiol., 2: 319-322, 1987.

BIERBAUM, G. & SAHL, H.-G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. Curr. Pharm. Biotechnol., 10 (1): 2-18, 2009.

BIZANI, D.; MORRISSY, J. A.; DOMINGUEZ, A. P. & BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. Int. J. Food Microbiol., 121(2): 229-233, 2008.

BORTOLUSSI, R. Listeriosis: a primer. CMAJ, 179(8):795-797, 2008.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J., 164(2): 116-128, 2002.

BRADLEY, A. & GREEN, M. J. Clinical mastitis in six Somerset dairy herds. Vet. Rec., 148: 683–686, 2001.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento**. Instrução Normativa 51. Brasília, 55 p., 2002.

BRILLET, A.; PILET, M.-F.; PREVOST, H.; BOUTTEFROY, A. & LEROI, F. **Biodiversity of** *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin producing *Carnobacterium* strains and application in cold-sterile salmon. J. Appl. Microbiol., 97: 1029–1037, 2004.

BRITO, M. A. V. P. & BRITO, J. R. F. **Qualidade do leite**. In: MADALENA, F. H.; MATOS, L. L. & HOLANDA, E. V. J. Produção de leite e sociedade. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001, p. 61-74. Disponível em: <a href="http://www.fernandomadalena.com/site\_arquivos/903.pdf">http://www.fernandomadalena.com/site\_arquivos/903.pdf</a>>. Acesso em 10 out. 2009.

BRITO, M. A. V. P. & LANGE, C. C. **Resíduos de antibióticos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. Comunicado técnico, 44: 1-44, 2005.

BRITO, J. R. F.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O.; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A. C. S. & LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 74(15): 4954–4961, 2008.

CABO, M. L.; TORRES, B.; HERRERA, J. J.; BERNÁRDEZ, M. & PASTORIZA, L. Application of nisin and pediocin against resistance and germination of *Bacillus* spores in sous vide products. J. Food Prot., 72(3): 515-23, 2009.

CARMO, G. M. I; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, M. G.; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S. & CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999–2004. Bol. Eletrôn. Epidemiol. 5(6): 1–7, 2005.

CARNEIRO, A. V.; STOCK, L. A.; OLIVEIRA, V. M.; ZOCCAL, R.; CARVALHO, G. R.; MARTINS, P. C. & YAMAGUCHI, L. C. T. **Mastite Clínica: prevalência e custo de tratamento em rebanho leiteiro.** Anais do XX Congresso Latinoamericano de Produção Animal, 2007.

CATÃO, R. M. R. & CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(3): 281-287, 2001.

CDC. **Annual listing of foodborne disease outbreaks, United States – 2007.** Disponível em: <a href="http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak">http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak</a> data.htm>. Acesso em 10 out. 2009.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponivel em: <a href="http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfectionsg.htm">http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfectionsg.htm</a>> Acesso em: 13 nov. 2009.

CEOTTO, H. Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de bacteriocinas envolvidas em mastite bovina na Região Sudeste do Brasil. Dissertação de Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (UFRJ), 2005.

CEOTTO, H. Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus* spp. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (UFRJ). 181 p., 2009.

CEOTTO, H.; NASCIMENTO, J. S.; BRITO, M. A. V. P. & BASTOS, M. C. F. **Bacteriocin production** by *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis in Brazil. Res. Microbiol., 160(8): 592-599, 2009.

CHAMBERS, H. F. & DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat. Rev. Microbiol., 7(9): 629-641, 2009.

CHEN, H. & HOOVER, D. G. **Bacteriocins and their food applications.** Comp. Rev. Food Sci. Food Safety, 2: 82–100, 2003.

CHEIGH, C. I. & PYUN, Y. R. **Nisin biosynthesis and its properties**. Biotechnol. Lett., 27(21): 1641-1648, 2005.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S. & TSEN, H. Y. **PCR** detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus* aureus isolates from food-poisoning cases in Taiwan. Int. J. Food Microbiol., 121: 66–73, 2008.

CLARK, M. *Listeria* Blog: surveillance & analysis on *Listeria* news and outbreaks. Disponível em: < http://www.listeriablog.com/articles/listeria-resources/>. Acesso em: 20 jan. 2010.

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.

COBOS, E. S.; FILIMONOV, V. V.; GÁLVEZ, A.; MAQUEDA, M.; VALDÍVIA, E.; MARTÍNEZ, J. C. & MATEO, P. L. **AS-48:** a circular protein with an extremely stable globular structure. FEBS Lett., 505: 379-382, 2001.

COELHO, M. L. V.; CEOTTO, H.; MADUREIRA, D. J.; NES, I. F. & BASTOS, M. C. F. **Mobilization functions of the bacteriocinogenic plasmid pRJ6 of** *Staphylococcus aureus*. J. Microbiol., 47(3): 327-336, 2009.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. Rev. Educ. Continuada, São Paulo, 1(1): 3-9, 1998.

COSTA, E. O. **Uso de antimicrobianos na mastite**. In: Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 442-455, 2002.

COSTA, E. 2009. **Mastite: os seus prejuízos em números**. Revista Balde Branco. Disponível em: <a href="http://www.bichoonline.com.br/artigo.aspx?ida=285">http://www.bichoonline.com.br/artigo.aspx?ida=285</a>>. Acesso em: 12 out. 2009.

COTTER, P. D. & HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(3): 429–453, 2003.

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

CUCARELLA, C.; TORMO, M. A.; UBEDA, C.; TROTONDA, M. P.; MONZON, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J. R. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun., 72: 2177–2185, 2004.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O.; JÚNIOR, J. P. A. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. Microbiol. Immunol., 51(4): 381–390, 2007.

DALY, K. M.; UPTON, M.; SANDIFORD, S. K.; DRAPER, L. A.; WESCOMBE, P. A.; JACK, R. W.; O'CONNOR, P. M.; ROSSNEY, A.; GÖTZ, F.; HILL, C.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P. & TAGG, J. R. **Production of the Bsa lantibiotic by community-acquired** *Staphylococcus aureus* **strains**. J. Bacteriol., 92(4): 1131-1142.

DAVIES, E. A.; BEVIS, H. E. & DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol., 24: 343–346, 1997.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C. & ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. Int. Dairy J., 16: 1058–1071, 2006.

DELVES-BROUGHTON. **Use of Nisaplin®** as a preservative in pasteurised liquid egg products. 2007. Disponível em: <a href="http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/use-nisaplin-preservative-pasteurised\_822.htm">http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/use-nisaplin-preservative-pasteurised\_822.htm</a>. Acesso em 20 nov. 2009.

DERAZ, S. F.; KARLSSON, E. N.; KHALIL, A. A. & MATTIASSON, B. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 34(5): 373-379, 2007.

DIEP, D. B. & NES, I. F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. Curr. Drug Targets, 3: 107–122, 2002.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M. & SCHLIEVERT, P. M. **Exotoxins of** *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev., 13(1): 16–34, 2000.

DORTU, C.; HUCH, M.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. & THONART, P. **Anti-listerial activity of bacteriocin-producing** *Lactobacillus curvatus* **CWBI-B28** and *Lactobacillus sakei* **CWBI-B1365** on raw beef and poultry meat. Lett. Appl. Microbiol., 47(6): 581-586, 2008.

DPA - Dairy Partners Americas. Programa DPA - **Boas práticas na fazenda**. 2007. Disponível em: <a href="http://www.dpamericas.com.br/">http://www.dpamericas.com.br/</a>. Acesso em: 21 jun. 2009.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L. M. & PRÉVOST, H. **The continuing story of class Ila bacteriocins**. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70(2): 564–582, 2006.

EBRINGER, L.; FERENČÍK, M. & KRAJČOVIČ, J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products – Review. Folia Microbiol. 53(5): 378–394, 2008.

EMBRAPA Gado de Leite. **Sistema de produção de leite**. 2003. Disponível em: <a href="http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/Leit

EMBRAPA Gado de Leite. **Principais indicadores leite e derivados: boletim eletrônico mensal**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v. 2, n. 15, 10 set. 2009. Disponível em: <a href="http://www.cileite.com.br/publicacoes/arquivos/2009\_09\_Indicadores\_leite.pdf">http://www.cileite.com.br/publicacoes/arquivos/2009\_09\_Indicadores\_leite.pdf</a>>. Acesso em: 10 out. 2009.

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

ERSFELD-DRESSEN, H.; SAHL, H.-G. & BRANDIS, H. **Plasmid involvement in production of and immunity to the staphylococcin-like peptide Pep 5.** J. Gen. Microbiol., 130 (11): 3029–3035, 1984. ESSLEMONT, R. J. & KOSSAIBATI, M. A. **Culling in 50 dairy herds in England**. Vet. Rec., 140: 36–39, 1997.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - **Genus** *Staphylococcus*. Disponível em: <a href="http://www.bacterio.cict.fr/l/staphylococcus.html">http://www.bacterio.cict.fr/l/staphylococcus.html</a>>. Acesso em: 8 set. 2009a.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - **Genus** *Listeria*. Disponível em: <a href="http://www.bacterio.cict.fr/l/listeria.html">http://www.bacterio.cict.fr/l/listeria.html</a> >. Acesso em: 19 out. 2009b.

FRANK, K. L.; DEL POZO, J. L. & PATEL, R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. Clin. Microbiol. Rev., 21(1): 111-133, 2008.

FREITAG, N. E.; PORT, G. C. & MINER, M. D. *Listeria monocytogenes -* from saprophyte to intracellular pathogen. Nat. Rev. Microbiol., 7: 623-628, 2009.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L. & OMAR, N. B. **Bacteriocin-based strategies for food biopreservation**. Int. J. Food. Microbiol., 120 (1-2): 51-70, 2007.

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H., VALDIVIA, E. & OMAR, N. B. **Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria**. Crit. Rev. Biotechnol., 28: 125–152, 2008.

GALVIN, M; HILL, C. & ROSS, R. P. Lacticin 3147 displays activity in buffer against grampositive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. Lett. Appl. Microbiol., 28 (5): 355–358, 1999.

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.

GANDHI, M. & CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. Int. J. Food Microbiol., 113: 1–15, 2007.

GE, J.; PING, W.; SONG, G.; DU, C.; LING, H.; SUN, X. & GAO, Y. Paracin 1.7, a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HD1.7 isolated from Chinese cabbage sauerkraut, a traditional Chinese fermented vegetable food. Wei Sheng Wu Xue Bao., 49(5): 609-616, 2009.

GHOBRIAL, O. G.; DERENDORF, H. & HILLMAN, J. D. **Pharmacodynamic activity of the lantibiotic MU1140.** Int. J. Antimicrob. Agents, 33(1): 70-74, 2009.

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, S. R.; FOUTS, D. E.; ARCHER, G. L.; MONGODIN, E. F.; DEBOY, R. T.; RAVEL, J.; PAULSEN, I. T.; KOLONAY, J. F.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DODSON, R. J.; DAUGHERTY, S. C.; MADUPU, R.; ANGIUOLI, S. V.; DURKIN, A. S.; HAFT, D. H.; VAMATHEVAN, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; LEE, C.; DIMITROV, G.; JIANG, L.; QIN, H.; WEIDMAN, J.; TRAN, K.; KANG, K.; HANCE, I. R.; NELSON, K. E. & FRASER, C. M. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. J. Bacteriol., 187(7): 2426–2438, 2005.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J. B.; CHRISTENSEN, A. B. & GIVSKOV, M. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol., 78: 79–97, 2002.

GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; VALVIDIA, E.; ABRIOUEL, H.; MAQUEDA, M.; BEN OMAR, N.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M. & GÁLVEZ, A. **Stability of enterocin AS-48 in fruit and vegetable juices**. J. Food Prot., 68: 2085–2094, 2005.

GUERRA, N. P.; MACIAS, C. L.; AGRASAR, A. T. & CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin as biopreservative agent. Lett. Appl. Microbiol., 40: 106–110, 2005.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, B.; REBAI, A. & NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. Lett. Appl. Microbiol., 48(2): 253-260, 2009.

HARAKEH, S.; SALEH, I.; ZOUHAIRI, O.; BAYDOUN, E.; BARBOUR, E. & ALWAN, N. **Antimicrobial resistance of** *Listeria monocytogenes* **isolated from dairy-based food products**. Sci. Total Environ., 407: 4022–4027, 2009.

HATA, T.; TANAKA, R. & OHMOMO S. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. Int. J. Food Microbiol., 137(1): 94-99, 2010.

HAUG, A.; HØSTMARK, A. T. & HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. Lipids Health Dis., 6(25): 1-16, 2007.

HEAD, D. S.; CENKOWSKI, S.; HOLLEY, R. & BLANK, G. Effects of superheated steam on *Geobacillus stearothermophilus* spore viability. J. Appl. Microbiol., 104(4): 1213-1220, 2008.

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, 45–92. Edited by Riley, M. A. & Chavan, M. A., New York, Springer, 2007.

HILL, C.; COTTER, P. D.; SLEATOR, R. D. & GAHAN, C. G. M. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. Int. Dairy J., 12(2–3): 273–283, 2002.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T. & TENOVER, F. C. **Methicillin-resistant** *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother., 40: 135–136, 1997.

HUANG, Y.; LUO, Y.; ZHAI, Z.; ZHANG, H.; YANG, C.; TIAN, H.; LI, Z.; FENG, J.; LIU, H. & HAO, Y. Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. Food Control, 20(11): 1030-1035, 2009.

HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. & HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. J. Dairy Res., 75: 113–120, 2008.

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.

JAGLIC, Z.; MICHU, E.; HOLASOVA, M.; VLKOVA, H.; BABAK, V.; KOLAR, M.; BARDON, J. & SCHLEGELOVA, J. Epidemiology and characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates from humans, raw bovine milk and a dairy plant. Epidemiol. Infect., 1-11. *In press*.

JIN, T. & ZHANG, H. Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. Food Microbiol. Safety, 73 (3): 127–134, 2008.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; HOGA, H. R. & RORVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol., 99: 158–166, 2005a.

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S. & LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. FEMS Microbiol. Lett., 252: 267–272, 2005b.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie, 70: 337–349, 1988.

KLUYTMANS, J.; BELKUM, A. & VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin. Microbiol. Rev., 10(3): 505–520, 1997.

KOSSAIBATI, M. A. & ESSLEMONT, R. J. The costs of production diseases in dairy herds in England. Vet. J., 154(1): 41–51, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680–685, 1970.

LAMMERS, A.; VORSTENBOSCH, V. C. J.; ERKENS, H. F. & SMITH, H. E. **The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells**. Vet. Microbiol., 80: 255–265, 2001.

LAPPE, R.; MOTTA, A. S.; SANT'ANNA, V. & BRANDELLI, A. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. Int. J. Food Microbiol., 15:135(3): 312-316, 2009.

LeJEUNE, J. T. & RAJALA-SCHULTZ, P. J. **Unpasteurized milk: a continued public health threat**. Clin. Infect. Dis., 48: 93–100, 2009.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J. Med. Microbiol., 55: 645–659, 2006.

LIU, D.; LAWRENCE, M.; AUSTIN, F. W. & AINSWORTH, A. J. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. FEMS Microbiol. Lett., 243: 373–378, 2005.

LIU, L; O'CONNER, P.; COTTER, P.D.; HILL, C. & ROSS, R.P. Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. J. Appl. Microbiol., 104: 1059–1066, 2008.

LOW, J. C. & DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet. J., 153: 9–29, 1997.

LUCAS, R.; GRANDE, M. A.; ABRIOUEL, H.; MAQUEDA, M.; BEN OMAR, N.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M. & GÁLVEZ, A. **Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit** *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. Food Chem. Toxicol., 44(10): 1774–1781, 2006.

LYON, B. R. & SKURRAY, R. **Antimicrobíal resistance of** *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol. Rev., 51: 88-134, 1987.

MAISNIER-PATIN, S.; TATINI, S.R. & RICHARD, J. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in milk. Lait, 75: 81–91, 1995.

MALDONADO, A.; RUIZ-BARBA, J. L. & JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. Arch. Microbiol., 181(1): 8-16, 2004.

MAQUEDA, M.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; FERNÁNDEZ, M.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-BUENO, M. **Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria.** FEMS Microbiol. Rev., 32(1): 2-22, 2008.

MARUGG, J. D.; GONZALEZ, C. F.; KUNKA, B. S.; LEDEBOER, A. M.; PUCCI, M. J.; TOONEM, M.Y.; WALKER, S. A.; ZOETMMULDER, L. C. & VANDENBERGH, P. A. Cloning, expression, and nucleotide sequence genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Appl. Environ. Microbiol., 58: 2360-2367, 1992.

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

McCARRON, D. A. & HEANEY, R. P. Estimated healthcare savings associated with adequate dairy food intake. Am. J. Hypertens., 17: 88–97, 2004.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S. & SHAPIRO, C. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis., 5: 607–625, 1999.

MORGAN, S, M.; ROSS, R.P.; BERESFORD, T. & HILL, C. Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. J. Appl. Microbiol., 88: 414–420, 2000.

NAIM. F.; ZAREIFARD, M. R.; ZHU, S.; HUIZING, R. H.; GRABOWSKI, S. & MARCOTTE, M. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: from kinetics to process validation. Food Microbiol., 26(5): 491-496, 2008.

NASCIMENTO, J. S. Análise da produção de bacteriocinas por estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos e estudo do papel da *orf12*, da *orf13* e da *orf14* na expressão da aureocina A53. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (UFRJ). 193 p., 2004.

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

NASCIMENTO, J. S.; ABRANTES, J.; GIAMBIAGI-DeMARVAL, M. & BASTOS, M. C. F. The influence of growth conditions on the production of bacteriocins by strains of *Staphylococcus aureus*. World J. Microbiol. Biotechnol., 20: 941-947, 2004.

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

NAVARATNA, M. A.; SAHL, H.-G. & TAGG, J. R. Two-component anti-Staphylococcus aureus lantibiotic activity produced by Staphylococcus aureus C55. Appl. Environ. Microbiol., 64 (12): 4803–4808, 1998.

NAVARATNA, M. A.; SAHL, H.-G. & TAGG, J. R. Identification of genes encoding two component lantibiotic production in *Staphylococcus aureus* C55 and other phage II *S. aureus* strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene. Infect. Immun., 67 (8): 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 characterisation of aureocin A70, a multipeptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. J. Mol. Biol., 311: 939-949, 2001.

NETZ, D. J.; 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.

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

NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J. & DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. Food Microbiol., 25(3):471-478, 2008.

NIGHTINGALE, K. K.; SCHUKKEN, Y. H.; NIGHTINGALE, C. R.; FORTES, E. D.; HO, A. J.; HER, Z.; GROHN, Y. T.; MCDONOUGH, P. L. & WIEDMANN, M. **Ecology and transmission of** *Listeria monocytogenes infecting ruminants and in the farm environment*. Appl. Environ. Microbiol., 70(8): 4458–4467, 2004.

NILSEN, T.; NES, I. F. & HOLO, H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl. Environ. Microbiol., 69 (5): 2975–2984, 2003.

NISSEN-MEYER, J.; HOLO, H.; HÅVARSTEIN, L. S.; SLETTEN, K. & NES, I. F. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J. Bacteriol., 174(17): 5686-5692, 1992.

NISSEN-MEYER, J.; ROGNE, P.; OPPEGÅRD, C.; HAUGEN, H.S. & KRISTIANSEN, P.E. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Curr. Pharm. Biotechnol., 10(1): 19-37, 2009.

NYS, S.; VAN MERODE, T.; BARTELDS, A. I. & STOBBERINGH, E. E. Urinary tract infections in general practice patients: diagnostic tests versus bacteriological culture. J. Antimicrob. Chemother., 57: 955–958, 2006.

OCHOA-ZARZOSA, A.; LOEZA-LARA, P. D.; TORRES-RODRIGUEZ, F.; LOEZA-ANGELES, H.; MASCOT-CHIQUITO, N.; SANCHEZ-BACA, S. & LOPEZ-MEZA, J. E. **Antimicrobial susceptibility and invasive ability of** *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. Antonie van Leeuwenhoek, 94: 199–206, 2008.

O'CONNOR, E. B.; COTTER, P. D.; O'CONNOR, P.; O'SULLIVAN, O.; TAGG, J. R.; ROSS, R. P. & HILL, C. Relatedness between the two-component lantibiotics lacticin 3147 and staphylococcin C55 based on structure, genetics and biological activity. BMC Microbiol., 2: 7–24, 2007.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M. & ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodborne Pathog. Dis., 2(2): 115-129, 2005.

OLIVEIRA S. S.; NASCIMENTO, J. S.; PÓVOA, D. C.; ARAÚJO, S. A.; GAMON, M. R. & BASTOS, M. C. F. Genetic analysis of the bacteriocin-encoding plasmids pRJ6 and pRJ9 of *Staphylococcus aureus* by transposon mutagenesis and cloning of genes involved in bacteriocin production. J. Appl. Microbiol., 85: 972–984, 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, M.; GUERRA, M. & BERNARDO, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in silages assessed by fluorescent *in situ* hybridization. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 60(1): 267-269, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. Nat. Rev. Microbiol., 7(8): 555-657, 2009.

PESCHEL, A. & GÖTZ, F. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, *-E*, and *- G* involved in epidermin immunity. J. Bacteriol., 178 (2): 531–536, 1996.

PIETTE, A. & VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet. Microbiol., 134: 45–54, 2009.

PINTADO, C. M.; FERREIRA, M. A. & SOUSA, I. **Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control** *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 72(9): 1891-1896, 2009.

PIPER, C.; DRAPER, L. A.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P. & HILL, C. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. J. Antimicrob. Chemother., 64(3): 546–551, 2009.

POTTER, A.; CEOTTO, H.; GIAMBIAGI-DeMARVAL, M.; SANTOS, K. R. N.; NES, I. F. & BASTOS, M. C. F. The gene *bap*, involved in biofilm production is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. J. Microbiol., 47(3): 319-326, 2009.

PYÖRÄLÄ, S. & TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. Vet. Microbiol., 134: 3–8, 2009.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K. & CARTER, G. R. **Mastitis.** In: Clinical Veterinary Microbiology, New York, Mosby, p. 327–344, 2000.

RASOOLY, R. & DO, P. M. In vitro cell-based assay for activity analysis of staphylococcal enterotoxin A in food. Immunol. Med. Microbiol., 56(2): 172-178, 2009.

RATHE, M.; KRISTENSEN, L.; ELLERMANN-ERIKSEN, S.; THOMSEN, M. K. & SCHUMACHER H. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. APMIS, 118(1): 66-73, 2010.

RAWOOL, D. B.; MALIK, S. V.; SHAKUNTALA, I.; SAHARE, A. M. & BARBUDDHE, S. B. **Detection** of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. Int. J. Food Microbiol., 113(2): 201-207, 2007.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF, J. R. W.; GOMES, J. F.; SCHARAMM, R. C.; MARTINS, P. R. & BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Agrociência, 9(3): 287–290, 2003.

RIHAKOVA, J.; BELGUESMIA, Y.; PETIT, V. W.; PILET, M. F.; PRÉVOST, H.; DOUSSET, X. & DRIDER, D. Divercin V41 from gene characterization to food applications: 1998-2008, a decade of solved and unsolved questions. Lett. Appl. Microbiol., 48(1): 1-7, 2009.

RILEY, A. & WERTZ, J. E. **Bacteriocins: evolution, ecology and application**. Annu. Rev. Microbiol., 56: 117–137, 2002.

RILEY, M. A. & CHAVAN, M. A. **Introduction**. In: Bacteriocins: Ecology and Evolution, New York, Springer, p. 45–92, Edited by Riley, M. A. & Chavan, M. A., 2007.

ROBINSON, D. A. & ENRIGHT, M. C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 47(12): 3926–3934, 2003.

ROCOURT, J. & COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: Food microbiology - fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington DC, p. 337–352, Edited by Doyle, M. P. Beuchat L. R. & Montville, T. J., 1997.

RODRÍGUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, M. I. & KOK, J. **Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 42(2): 91–121, 2002.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D. & RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect. Dis. Clin. N. Am. 23: 73–98, 2009.

ROLLEMA, H. S.; KUIPERS, O. P.; BOTH, P.; DE VOS, W. M. & SIEZEN, R. J. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. Appl. Environ. Microbiol., 61(8): 2873-2878, 1995.

ROSENSTEIN, R. & GÖTZ, F. Genomic differences between the food-grade *Staphylococcus* carnosus and pathogenic staphylococcal species. Int. J. Med. Microbiol., 300(2-3): 104-108, 2010.

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

RUEGG, P. Premiums, production and pails of discarded milk. How much money does mastitis cost you? Resources Milk Money, 3: 50-56, 2005.

RYAN, M. P.; FLYNN, J.; HILL, C.; ROSS, R. P. & MEANEY, W. J. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. J. Dairy Sci., 82: 2108–2114, 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 uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 52: 41–79, 1998.

SAID, K. B.; ZHU, G. & ZHAO, X. Organ- and host-specific clonal groups of *Staphylococcus* aureus from human infections and bovine mastitis revealed by the clumping factor **A** gene. Foodborne Pathog. Dis., 7(2): 1-9, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, Cold Spring Habor, 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, 2009.

SANTOS, O. C. S.; LAPORT, M. S.; TEIXEIRA, L. M.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; IORIO, N. L. P. & SANTOS, K. R. N. Reliable identification of clinically prevalent species and subspecies of staphylococci by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 64(1): 1-5, 2009.

SASHIHARA, T.; KIMURA, H.; HIGUCHI, T.; ADACHI, A.; MATSUSAKI, H.; SONOMOTO, K. & ISHIZAKI, A. A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64 (11): 2420-2428, 2000.

SAWANT, A.; SORDILLO, L. M. & JAYARAO, B. M. **A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania**. J. Dairy Sci., 88: 2991–2999, 2005.

SCANNELL, A. G.; ROSS, R. P.; HILL, C. & ARENDT, E. K. An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. J. Food Prot., 63: 370–375, 2000.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção de queijos. In: Simpósio internacional sobre qualidade do leite. Curitiba: CIETEP/FIEP, p. 21-26, 2000.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R. & HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Technol., 71: 58–64, 1996.

SCHMID, D.; FRETZ, R.; WINTER, P.; MANN, M.; HÖGER, G.; STÖGER, A.; RUPPITSCH, W.; LADSTÄTTER, J.; MAYER, N.; MARTIN, A. & ALLERBERGER, F. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. Wien Klin Wochenschr, 121: 125–131, 2009.

SCHUKKEN, Y. H.; GONZALEZ, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOME, F. L.; BENNETT, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J. & ZADOKS, R. N. **CNS mastitis: Nothing to worry about?** Vet. Microbiol., 134: 9–14, 2009.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C. & BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet. Res., 3(5): 475-491, 2003.

SERGELIDIS, D. & ABRAHIM, A. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. Food Control, 20: 1–10, 2009.

SETTANNI, L. & CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int. J. Food Microbiol., 121: 123–138, 2008.

SHAND, R. F. & LEYVA, K. J. Peptide and protein antibiotics from the domain *Archaea*: halocins and sulfolobicins. In: Bacteriocins: Ecology and Evolution, New York, Springer, p. 93–110, Edited by Riley, M. A. & Chavan, M. A., 2007.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E. & TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. J. Food. Prot., 61(3): 354-356, 1998.

SIMEONI, D.; RIZZOTTI, L.; COCCONCELLI, P.; GAZZOLA, S.; DELLAGLIO, F. & TORRIANI, S. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. Food Microbiol., 25: 196–201, 2008.

SLEATOR, R. D.; GAHAN, C. G. M. & HILL, C. **A postgenomic appraisal of osmotolerance in** *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 69: 1–9, 2003.

SNAPIR, Y. M.; VAISBEIN, E. & NASSAR, F. Low virulence but potentially fatal outcome-*Listeria ivanovii*. Eur. J. Intern. Med., 17(4): 286-287, 2006.

SWAMINATHAN, B. & GERNER-SMIDT, P. **The epidemiology of human listeriosis**. Microbes Infect., 9: 1236-1243, 2007.

THOMPSON, J. K.; COLLINS, M. A. & MERCER, W. D. Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. J. Appl. Bacteriol., 80(3): 338-348, 1996.

TODOROV, S. D. & DICKS, L. M. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). Int. J. Food Microbiol., 132(2-3): 117-126, 2009.

TURUTOGLU, H.; HASOKSUZ, M.; OZTURK, D.; YILDIRIM, M. & SAGNAK, S. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. Vet. Res. Commun., 33: 945–956, 2009.

UHART, M.; RAVISHANKAR, S. & MAKS, N. D. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4 degrees C. J. Food Prot., 67: 2296–2301, 2004.

USPTO – **United States Patent and Trademark Office**. Disponível em: <a href="http://www.uspto.gov/patents/index.jsp">http://www.uspto.gov/patents/index.jsp</a>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

VAN DE KAMP, M.; VAN DEN HOOVEN, H. W.; KONINGS, R. N.; BIERBAUM, G.; SAHL, H.-G.; KUIPERS, O. P.; SIEZEN R. J.; DE VOS, W. M.; HILBERS, C. W. & VAN DE VEN, F. J. Elucidation of the primary structure of the lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7.

Cloning and characterisation of the epilancin-K7-encoding gene and NMR analysis of mature epilancin K7. Eur. J. Biochem., 230 (2): 587–600, 1995.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M., BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J. & KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microb. Rev., 14(3): 584-640, 2001.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; B.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R. & JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. Int. J. Infect. Dis., 12: 410-415, 2008.

VIEDMA, P. M.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; LÓPEZ, R. L.; VALDIVIA, E. & GÁLVEZ, A. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. Food Microbiol., 26(3): 289-293, 2009a.

VIEDMA, P. M.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ A. S.; OMAR, N. B.; LÓPEZ, R. L.; VALDIVIA, E.; BELLOSO, O. M. & GÁLVEZ, A. Effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against the spoilage bacterium *Lactobacillus diolivorans* in apple juice. Food Microbiol., 26(5): 491-496, 2009b.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N. & O'KENNEDY, K. R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. Trends Biotechnol., 27(8): 486-493, 2009.

VISALEGIS - **Legislação em Vigilância Sanitária**. Disponível em: <a href="http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/home.php">http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/home.php</a>>. Acesso em: 13 nov. 2009.

VON EIFF, C.; PETERS, G. & HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect. Dis., 2(11): 677–685, 2002.

YI, H.; ZHANG, L.; TUO, Y.; HAN, X. & DU, M. A novel method for rapid detection of class Ila bacteriocin-producing lactic acid bacteria. Food Control, 21: 426–430, 2010.

YONEZAWA, H & KURAMITSU, H. K. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. Antimicrob. Agents Chemother., 49(2): 541-548, 2005.

ZAI, A. S.; AHMAD, S. & RASOOL, S. A. Bacteriocin production by indigenous marine catfish associated *Vibrio* spp. Pak. J. Pharm. Sci., 22(2): 162-167, 2009.

ZHAO, X. & LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. J. Anim. Sci., 86(13 Suppl. 1): 57-65, 2008.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 415(24): 389-395, 2002. 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.