

FELIPE MICELI DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADAS DE
ALIMENTOS E ESTUDO DA EFETIVIDADE DE
ESTAFILOCOCCINAS NA BIOPRESERVAÇÃO DE
QUEIJO MINAS FRESCAL COM TEOR REDUZIDO
DE SÓDIO**



**Monografia apresentada ao
Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes, como pré-requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia
e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2016**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Maria do Carmo de Freire Bastos e coorientação da Dr^a Olinda Cabral da Silva Santos

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

F224c Farias, Felipe Miceli de
Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos e estudo da efetividade de estafilococinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio / Felipe Miceli de Farias. -- Rio de Janeiro, 2016.
92 f.

Orientador: Maria do Carmo de Freire Bastos.
Coorientador: Olinda Cabral da Silva Santos.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Bacteriocinas. 3. Microbiologia de alimentos. 4. Queijo. I. Bastos, Maria do Carmo de Freire, orient. II. Santos, Olinda Cabral da Silva, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: Felipe Miceli de Farias

DRE: 113080230

BANCA EXAMINADORA: Prof. Marco Antônio Lemos Miguel (Presidente)
Profª. Hilana Ceotto Vigoder
Profª. Ana Maria Mazotto de Almeida
Profª. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: “Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos e estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio”

Local: Sala E-044, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes /CCS/ UFRJ

Data e hora de início: 07 de dezembro de 2016 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 07 de dezembro de 2016.

NOTA

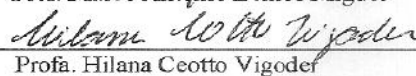
10,0

Banca Examinadora:



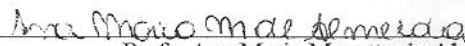
Prof. Marco Antônio Lemos Miguel

10,0



Profª. Hilana Ceotto Vigoder

10,0



Profª. Ana Maria Mazotto de Almeida

Profª. Raquel Regina Bonelli

Aluno:



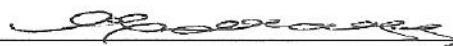
Felipe Miceli de Farias

Orientador:



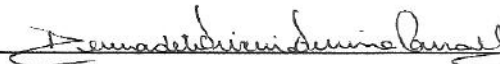
Profª. Maria do Carmo de Freire Bastos

Co-orientador:



Dra. Olinda Cabral da Silva Santos

Coordenador
de TCC



Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Claudomir Firmino de Farias
(*in memoriam*)
meu pai, meu amigo, por ter sacrificado tudo para
que eu e os meus irmãos pudéssemos ter a melhor
educação possível. Mesmo o seu jeito turrão e estoico
não tirou o brilho da pessoa fantástica que você foi.
Nunca conseguirei agradecer por tudo o que o senhor fez.

AGRADECIMENTOS

“Devemos agradecer às pessoas que nos fazem felizes... São elas os jardineiros encantadores que fazem nossas almas florescerem.”

(Proust)

“A gratidão é a memória do coração”.

(Autor desconhecido)

Começo este texto com duas frases que sempre surgem na minha cabeça quando penso na palavra “gratidão”. Venho aqui, por meio deste texto, deixar uma mensagem para as pessoas que me ajudaram, direta e indiretamente, a formar o ser humano e o profissional que sou hoje. Já adianto que não conseguirei agradecer a todos os envolvidos nestas poucas páginas, mas saibam que vocês foram, são e serão fundamentais na minha jornada.

Primeiramente, agradeço a minha família: à minha mãe Luzia, ao meu pai Claudomir, aos meus irmãos Cláudio e Paulo, às minhas tias-avós Lina e Luiza, à minha avó Gilda, ao meu dindo-avô Marcos, à minha dinda Marisa e ao meu tio Urbano. Só vocês sabem o quanto tiveram que sacrificar para que eu pudesse chegar aonde eu cheguei hoje. Foram muitas broncas, brigas, risadas, conselhos, viagens, conquistas e momentos felizes juntos. Vocês me ensinaram valores que eu não poderia adquirir em nenhum outro lugar. Palavras não são e nunca serão o suficiente para expressar o que eu sinto por vocês.

À minha namorada, Ayla, pelo carinho, pela atenção, por ter aturado meu entusiasmo exacerbado com cada resultado e com cada artigo interessante; por ter prestado atenção, na maioria das vezes, nas minhas ideias mirabolantes de aplicação das bacteriocinas; por estar presente quando eu precisava desabafar, quando eu estava frustrado, cansado e desanimado. Apesar de você ter sido fantástica em tudo o que eu falei, anteriormente, o seu apoio para superar o falecimento do meu querido pai, sem dúvida, foi o mais importante. Sempre lhe falei o quanto eu lhe sou grato, mas palavras jamais serão o suficiente. Agradeço por esses três anos de relacionamento. Você me fez um ser humano melhor.

Aos meus amigos do técnico (Abner, Ayla, Gabriel, Mariana, Matheus e Raquel), do Andaraí (Augusto, Brenno, Carol, Lucas, Paulo, Pedro, Rafael, Ricardo e Tourinho) e do Carrescia (Arthur, Gabriel, Lucas, Pedro e Vitor). Vocês foram fantásticos, conseguiram ver qualidades em mim que eu até hoje duvido que tenha. Vocês foram capazes de diluir os problemas em risadas, de me fazer levar a vida mais leve e de fazer as tardes monótonas virarem momentos a serem lembrados por uma vida.

Em especial, aos meus amigos da graduação (Gabriela, Karinne e Lukas). Vocês fizeram a minha graduação muito mais divertida. Nossas tardes de estudo sempre se transformavam em conversas sobre os assuntos mais estranhos e distantes da matéria que a gente deveria estar estudando. Obrigado por fazerem a maioria dos trabalhos comigo, pois é raro encontrar pessoas que se esmerem sempre em fazer o seu melhor. Vocês são inteligentes, capazes, ótimos profissionais e, com toda a certeza, a pesquisa brasileira ganhará muito.

À minha orientadora, professora Maria do Carmo, agradeço por ter me dado a oportunidade de poder trabalhar, aprender e crescer dentro do Laboratório de Genética Molecular. Agradeço o seu voto de confiança logo ao entrar no laboratório e pelo projeto desafiador que eu executei na monografia. Obrigado por me apresentar ao maravilhoso universo das bacteriocinas e suas aplicações em prol de um mundo melhor. Não poderia deixar de citar o seu papel fundamental no crescimento da minha escrita científica. Levei alguns puxões de orelha, algumas críticas construtivas, mas foram com o objetivo de me tornar um profissional melhor. Ao fim deste trabalho, fica a certeza de que não irei achar em nenhum outro lugar o que eu pude viver no seu laboratório.

À minha coorientadora, Olinda, agradeço por ter tido a paciência de me ensinar e de me reeducar nas técnicas voltadas para a microbiologia. Obrigado por sempre ter sido honesta e transparente comigo. Também agradeço por nunca ter deixado algum erro passar despercebido e impune, pois isso ajudou a formar o profissional que sou hoje, ao final da graduação. Ter tido você como coorientadora, foi uma das gratas surpresas que a vida nos dá de presente. Saiba que seus futuros orientados terão muita sorte.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, Júlio, Marcinha, Ilana, Selda, Hilana, Andreza, Patrícia e Amina - a grande família GenMol. Vocês foram fundamentais nestes anos que passei no laboratório. Júlio, obrigado pelas conversas sobre os mais diversos assuntos, pelo cafezinho depois das 14 h, pelas autoclavações em horários não-programados e por me lembrar de que não existe idade para seguir os seus sonhos. Ilana, obrigado pelas dicas nos experimentos, pela ajuda na redação da monografia e por me lembrar de que no final tudo dá certo. Marcinha, obrigado por adoçar o laboratório com o seu bom humor e os seus doces, por me ajudar nos experimentos com antimicrobianos e por ser um exemplo de esforço e dedicação. Selda, Hilana, Amina, Andreza e Patrícia, obrigado por todas as dicas, todos ensinamentos e todas as palavras de apoio. O sentimento de união que eu encontrei neste grupo é uma joia rara.

Aos docentes que me ensinaram tudo o que eu aprendi ao longo destes anos de estudos. Etapa por etapa, vocês me motivaram, me fizeram ter gosto pelas disciplinas

ministradas, embuíram em mim a vontade de ser um professor e apostaram em mim quando eu nem sabia de que era capaz. Destaco aqui a professora Janaína (Jana), a qual esteve presente em quase toda a minha trajetória no campo da microbiologia e que me abriu as portas de oportunidades tão fantásticas que eu duvidava que tivesse o mérito para tal.

Ainda falando sobre docentes, não posso deixar de citar a professora Maria Teresa, o professor Adriano Gomes e o professor Marco Miguel, os quais foram sempre muito solícitos e muito gentis comigo. Vocês nunca disseram que as minhas ideias eram absurdas e sempre me trataram como igual. Por isso e muito mais, o meu muito obrigado.

Agradeço a Deus por tudo que pude viver, pelas pessoas que encontrei e pelos desafios que enfrentei. Como futuro microbiologista e imunologista, não posso deixar de citar a célebre frase de Louis Pasteur: “Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.

Agradeço ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, pelas análises de espectrometria de massas realizadas.

Agradeço ao CNPq e à FAPERJ, pela bolsa de Iniciação Científica e pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço de coração a todos os envolvidos.

EPÍGRAFE

On facing up to adversity

*I learned there are troubles
Of more than one kind.
Some come from ahead
And some come from behind.*

*But I've bought a big bat.
I'm all ready, you see.
Now my troubles are going
To have troubles with me!*

Doctor Seuss

"Nós somos aquilo que fazemos repetidamente.
Excelência, então, não é um modo de agir, mas
um **hábito**."

Aristóteles

*Slow down, you crazy child
You're so ambitious for a juvenile
But then if you're so smart, then tell me
Why are you still so afraid?
Where's the fire, what's the hurry about?
You'd better cool it off before you burn it out
You've got so much to do
And only so many hours in a day
(...)
Slow down, you're doing fine
You can't be everything you want to be
Before your time
Although it's so romantic on the borderline tonight
Tonight,
Too bad but it's the life you lead
You're so ahead of yourself that you forgot what you need
Though you can see when you're wrong, you know
You can't always see when you're right. you're right
(...)*

Billy Joel (Vienna)

RESUMO

FELIPE MICELI DE FARIAS

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS DE ALIMENTOS E ESTUDO DA EFETIVIDADE DE ESTAFILOCOCCINAS NA BIOPRESERVAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL COM TEOR REDUZIDO DE SÓDIO

Orientador: Maria do Carmo de Freire Bastos
Coorientador: Olinda Cabral da Silva Santos

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os contaminantes microbiológicos são os principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, destacando-se entre eles *Staphylococcus aureus*. Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por procariotos e que têm atividade inibitória contra outros procariotos. Algumas bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp., as estafilococcinas, têm a capacidade de inibir diversos patógenos humanos e animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de estafilococcinas contra estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, visando-se à utilização industrial desses peptídeos na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio. Para isso, 15 estirpes bacterianas, previamente isoladas de alimentos, foram identificadas ao nível de espécie por testes bioquímicos. Apenas seis estirpes foram identificadas como *S. aureus*. A identificação das estirpes foi confirmada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Estas estirpes foram submetidas aos testes de detecção dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, de produção de biofilme e de sensibilidade a antimicrobianos. Nestes testes, três estirpes foram positivas para a presença dos genes codificadores da SEA e da SEB e as seis estirpes foram positivas para a presença do gene codificador da SEH; todas as estirpes foram classificadas como produtoras moderadas de biofilme e três das seis estirpes se enquadraram na categoria de microrganismos multirresistentes. A sensibilidade destas estirpes frente a 12 estafilococcinas foi avaliada pelo método de difusão em ágar e quatro estafilococcinas foram selecionadas para os testes subsequentes: aureocina A53, lisostafina, hycina 3682 e Pep5. Estes peptídeos foram parcialmente purificados através do método de precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguida de cromatografia de troca catiônica, e submetidas ao teste de modo de ação, para a verificação de atividade bactericida ou bacteriostática. Os resultados obtidos contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos mostraram atividade bacteriolítica da aureocina A53, da lisostafina e da Pep5, e a redução de crescimento das estirpes de *S. aureus* pela hycina 3682. A atividade antimicrobiana de três estafilococcinas foi, então, testada frente às estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 na concentração de 10^6 UFC/g, em matriz de queijo com diferentes concentrações de

sódio (sem redução, com 25% de redução e com 50% de redução), a fim de se avaliar a sua capacidade biopreservativa neste tipo de alimento, mantido sob refrigeração a 4 °C, por 21 dias. Os resultados obtidos nos lotes contendo apenas uma estafilococcina se mostraram muito promissores, pois, a adição da aureocina A53 e a da Pep5 resultou, geralmente, em uma redução de, aproximadamente, 99% e 95% da contagem de células viáveis das estirpes-alvo, respectivamente, ao fim do experimento. Já para a lisostafina, a sua utilização resultou na redução de 99,99% da contagem de células viáveis das estirpes-alvo. Em relação ao uso das estafilococcinas combinadas, a ação da aureocina A53 com a Pep5 resultou na redução adicional de mais 1 unidade-log de UFC/g, quando comparada com a utilização de ambas as bacteriocinas, separadamente. As ações combinadas da lisostafina com a aureocina A53 e da lisostafina com a Pep5 resultaram em uma queda da população bacteriana, geralmente, similar à causada pela ação isolada da lisostafina. Os resultados demonstraram a potencial aplicação destas estafilococcinas na indústria de alimentos, como biopreservativos de laticíneos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, bacteriocina, estafilococcina, queijo Minas frescal

ABSTRACT

FELIPE MICELI DE FARIAS

CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM FOOD AND STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF STAPHYLOCOCCINS IN BIOPRESERVATION OF MINAS FRESCAL CHEESE WITH REDUCED SODIUM CONTENT

Advisor: Maria do Carmo de Freire Bastos

Co-advisor: Olinda Cabral da Silva Santos

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Microbiological contaminants are the major causative agents of foodborne illnesses, especially *Staphylococcus aureus*. Bacteriocins are antimicrobial peptides or proteins ribosomally synthesized by prokaryotes that have inhibitory activity against other prokaryotes. Some bacteriocins produced by *Staphylococcus* spp., referred to as staphylococcins, have the ability to inhibit several human and animal pathogens. The objective of this study was to evaluate the staphylococcin antimicrobial activity against *S. aureus* strains isolated from food, aiming at their industrial application in biopreservation of Minas frescal cheese with a reduced sodium content. Therefore, 15 bacterial strains, isolated from foods in previous studies, were identified to the species level by biochemical tests. Only six strains were identified as *S. aureus*. The identification of the strains was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. These strains were screened for genes encoding staphylococcal enterotoxins, biofilm formation and antimicrobial susceptibility. Three strains proved to be positive for the presence of the genes encoding SEA and SEB, and all six strains, for the presence of the SEH-encoding gene. All strains were classified as moderate biofilm producers and three strains proved to be multiresistant microorganisms. The sensitivity of these strains to 12 staphylococcins was tested by the agar diffusion method. Four staphylococcins were then selected for subsequent tests: aureocin A53, lysostaphin, hyicin 3682 and Pep5. These peptides were partially purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation followed by cation exchange chromatography. The mode of action of each bacteriocin was tested against all *S. aureus* strains, aiming to investigate if they have either a bactericidal or a bacteriostatic activity. Aureocin A53, lysostaphin and Pep5 proved to exhibit a bacteriolytic activity, whereas hyicin 3682 only reduced the growth of the *S. aureus* strains. The antimicrobial activity of the staphylococcins was then tested against *S. aureus* Q1 and QJ3 in cheese matrices with different concentrations of sodium (control, a 25% reduction, and a 50% reduction) in order to evaluate their role in biopreservation of this type of food, kept under refrigeration at 4 °C, for 21 days. The results observed in samples containing a single staphylococcin were very promising, as aureocin A53 and Pep5 reduced approximately 99%

and 95% of the viable cell counts, respectively. Lysostaphin caused a 99.99% reduction of the viable cell counts. The combined action of aureocin A53 and Pep5 resulted in a further reduction of one log-unit CFU/g when compared with the reduction caused by the use of either one separately. The combined action of either lysostaphin and aureocin A53 or lysostaphin and Pep5 generally resulted in a reduction similar to that observed when lysostaphin was employed singly. These results demonstrated the feasibility of implementing the use of these staphylococcins in dairy industry as food biopreservatives.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, bacteriocin, staphylococcins, Minas frescal cheese

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Percentual de surtos por tipo de alimento no período de 2000-2016.....	4
Figura 2. Percentual de surtos por agente etiológico no período de 2000-2016.....	5
Figura 3. Etapas de desenvolvimento do biofilme.....	11
Figura 4. Modo de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas.....	18
Figura 5. <i>Amplicons</i> obtidos por reação de PCR para a identificação de genes codificadores de enterotoxinas no genoma das estirpes de <i>S. aureus</i> e observados após a eletroforese em gel de agarose a 1,4% (p/v) em tampão TAE, por 30 min a 70 V.....	53
Figura 6. Modo de ação da aureocina A53 (4.096 UA) contra as estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C.....	59
Figura 7. Modo de ação da lisostafina (1.024 UA) contra as estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C.....	59
Figura 8. Modo de ação da hyicina 3682 (4.096 UA) contra as estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C.....	60
Figura 9. Modo de ação da Pep5 (2.048 UA) contra as estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C.....	60
Figura 10. Ação da aureocina A53 sobre as estirpes de <i>S. aureus</i> Q1 e QJ3 em matriz de queijo Minas frescal sem redução de sódio (QC, A), com redução de 25% da concentração de sódio (QI, B) e com redução de 50% da concentração de sódio (QII, C).....	63
Figura 11. Ação da aureocina lisostafina sobre as estirpes de <i>S. aureus</i> Q1 e QJ3 em matriz de queijo Minas frescal sem redução de sódio (QC, A), com redução de 25% da concentração de sódio (QI, B) e com redução de 50% da concentração de sódio (QII, C).....	64
Figura 12. Ação da Pep5 sobre as estirpes de <i>S. aureus</i> Q1 e QJ3 em matriz de queijo Minas frescal sem redução de sódio (QC, A), com redução de 25% da concentração de sódio (QI, B) e com redução de 50% da concentração de sódio (QII, C).....	65
Figura 13. Ação combinada da aureocina A53 e da Pep5 sobre as estirpes de <i>S. aureus</i> Q1 e QJ3 na matriz de queijo Minas frescal com redução de 25% da concentração de sódio, sob incubação refrigerada a 4 °C.....	67

Figura 14. Ação combinada da aureocina A53 e da lisostafina sobre as estirpes de <i>S. aureus</i> Q1 e QJ3 na matriz de queijo Minas frescal com redução de 25% da concentração de sódio, sob incubação refrigerada a 4 °C.....	67
Figura 15. Ação combinada da lisostafina e da Pep5 sobre as estirpes de <i>S. aureus</i> Q1 e QJ3 na matriz de queijo Minas frescal com redução de 25% da concentração de sódio, sob incubação refrigerada a 4 °C.....	68

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Testes de sensibilidade a estafilococinas.....	57

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas.....	15
Quadro 2. Estafilococcinas já caracterizadas com relevância no atual trabalho.....	22
Quadro 3. Exemplos de algumas bacteriocinas com potencial aplicação como preservativos de alimentos.....	26
Quadro 4. Estirpes bacterianas isoladas de alimentos utilizadas neste trabalho.....	32
Quadro 5. Estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. produtoras de bacteriocinas utilizadas neste trabalho.....	33
Quadro 6. Estirpes bacterianas utilizadas como controles em experimentos e suas condições de crescimento.....	34
Quadro 7. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a detecção dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.....	40
Quadro 8. Antimicrobianos utilizados no antibiograma e as suas respectivas concentrações.....	42
Quadro 9. Critérios para a classificação das estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos quanto à formação de biofilme.....	44
Quadro 10. Testes de bioquímicos realizados com as estirpes isoladas de alimentos.....	51
Quadro 11. Testes de detecção, por PCR, de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas no genoma das estirpes indicadoras.....	52
Quadro 12. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por estirpes de <i>S. aureus</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- aa – Ácidos aminados
- ABC – *ATP-binding cassette* (cassete ligante a ATP)
- ABIA – Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação
- a.C. – Antes de Cristo
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- Bac – Bacteriocina(s)
- BAL – Bactérias do ácido láctico
- BHI – *Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração)
- BPF – Boas práticas de fabricação
- CA-MRSA – *Community-associated MRSA* (MRSA associados à comunidade)
- CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
- CHCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- Da – Dalton(s)
- Dha – Dideidroalanina
- Dhb – Dideidrobutirina
- DO – Densidade óptica
- dsDNA* – *Double strand DNA* (DNA de fita dupla)
- DTA – Doenças transmitidas por alimentos
- eDNA – DNA extracelular
- EDTA – *Ethylene diamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino-tetra-acético)
- EE – Epidermite exsudativa
- EGM – Elemento genético móvel
- EPS – *Extracellular polymeric substances* (substâncias poliméricas extracelulares)
- erm* - *Erythromycin ribosome methylase*
- FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- GRAS – *Generally recognized as safe* (geralmente reconhecido como seguro)
- HA-MRSA – *Hospital-associated MRSA* (MRSA associados a hospitais)
- Hz – Hertz
- IMPG – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

IRAS – Infecções relacionadas à assistência à saúde

kb – Quilobase(s), 1.000 b

kDa – Quilodalton(s). 1.000 Da

kV – Quilovolts, 1.000 v

Lan – Lantionina

LB – Caldo *Luria-Bertani*

LGM – Laboratório de Genética Molecular

LPDE – Polietileno de baixa densidade

LPSN – *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*

MALDI-TOF – *Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight* (ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo)

MeLan – β -metil-lantionina

MG – Minas Gerais

MLS_B – *Macrolide-lincosamide-streptogramin B* (Macrolídeos-lincosamidas-estreptogramina B)

m/m – Massa/massa

MS – Mato Grosso do Sul ou Ágar-Manitol Salgado

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina)

orf – *Open reading frame* (quadro de leitura aberto)

pb – par(es) de base(s)

PBP2 – *Penicillin binding protein* (proteína ligante à penicilina)

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

pI – Ponto isoelétrico

p/p – Peso/peso

PR – Paraná

p/v – Peso/volume

q.s.p – Quantidade suficiente para

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

rpm – Rotações por minuto

RS – Rio Grande do Sul

SCC_{mec} – *Staphylococcal cassette chromosome mec* (cassete cromossômico estafilocócico *mec*)

- SCN – *Staphylococcus* coagulase-negativos
- SCP – *Staphylococcus* coagulase-positivos
- SE – *Staphylococcal enterotoxin(s)* [(enterotoxina(s) estafilocócica(s)]
- SEI – *Staphylococcal enterotoxin-like* (tipo-enterotoxina estafilocócica)
- SVS – Serviço de Vigilância Sanitária
- TAE – Tris/HCl - ácido acético - EDTA
- TE – Tris/HCl – EDTA
- tm* – Temperatura de desnaturação média
- Tris – Tris (hidroxi-metil-amino-metano)
- TSA – *Trypticase Soy Broth* acrescido de ágar
- TSB – *Trypticase Soy Broth* (caldo triptona de soja)
- TSST-1 – *Toxic shock syndrome toxin-1* (toxina da síndrome do choque tóxico 1)
- U – Unidade(s)
- UA – Unidades arbitrárias
- UFC – Unidades formadoras de colônia
- VC – Valor de corte
- VISA – *Vancomycin intermediate resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina)
- VRSA – *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina)
- v/v – Volume/volume
- xg – Gravidades
- WHO – *World Health Organization*

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE QUADROS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Os alimentos e a segurança alimentar.....	1
1.2 Queijo Minas frescal.....	2
1.3 O gênero <i>Staphylococcus</i>	6
1.3.1 <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos.....	6
1.3.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos.....	8
1.4 Bacteriocinas.....	13
1.4.1 Classe I	16
1.4.2 Classe II.....	17
1.4.3 Classe III.....	17
1.4.4 Classe IV.....	19
1.4.5 Classe V.....	19
1.5 Estafilococcinas.....	20
1.6 Aplicação biotecnológica das bacteriocinas em alimentos.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVO, METAS E FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Metas.....	29
3.3 Fluxograma experimental.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Estirpes bacterianas e meios de cultura.....	31
4.2 Identificação das estirpes isoladas de alimentos.....	35
4.2.1 Testes bioquímicos.....	35
4.2.1.1 Produção da enzima catalase.....	35
4.2.1.2 Produção de coagulase.....	35
4.2.1.3 Produção de acetoína.....	36
4.2.1.4 Fermentação de manitol.....	36
4.2.1.5 Produção de DNase.....	36
4.2.1.6 Produção de lecitinase.....	37
4.2.2 Identificação das estirpes por espectrometria de massas de tipo <i>matriz-assisted laser desorption/ionization – time of flight</i> (MALDI-TOF).....	37
4.3 Caracterização fenotípica das estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos.....	38
4.3.1 Detecção dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.....	38
4.3.1.1 Extração de DNA genômico das estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos.....	38

	Página
4.3.1.2 Detecção dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas no genoma das estirpes.....	39
4.3.2 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos	41
4.3.3 Teste de presença do fenótipo MLS _{Bi} (Teste D).....	42
4.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima para vancomicina através de microdiluição em caldo.....	43
4.3.5 Formação de biofilme.....	43
4.4 Teste de sensibilidade a estafilococcinas por difusão em ágar.....	44
4.5 Purificação parcial das estafilococcinas selecionadas.....	45
4.5.1 Obtenção das estafilococcinas a partir de precipitação com sulfato de amônio.....	45
4.5.2 Purificação parcial das estafilococcinas através de cromatografia de troca catiônica.....	46
4.6 Determinação das unidades arbitrárias das estafilococcinas por microdiluição.....	46
4.7 Modo de ação das estafilococcinas frente às estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos	47
4.8 Produção dos queijos do tipo Minas frescal.....	48
4.9 Contagem do número de células viáveis de <i>S. aureus</i> nas matrizes de queijo produzidas com e sem a adição de bacteriocinas.....	49
4.10 Análises estatísticas.....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1 Identificação ao nível de espécie das estirpes isoladas de alimentos.....	50
5.1.1 Testes bioquímicos.....	50
5.1.2 Espectrometria de massas por MALDI-TOF para identificação de espécie.....	51
5.2 Caracterização fenotípica das estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos.....	52
5.2.1 Detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas no genoma das estirpes de <i>S. aureus</i>	52
5.2.2 Perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos.....	54
5.2.3 Formação de biofilme pelas estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas de alimentos.....	56
5.3 Teste de sensibilidade a estafilococcinas pelo método de difusão em ágar.....	56
5.4 Modo de ação das estafilococcinas frente às estirpes de <i>S. aureus</i>	58
5.5 Contagem de células viáveis de <i>S. aureus</i> nas matrizes de queijo produzidas com e sem a adição de bacteriocinas.....	61
5.5.1 Emprego das bacteriocinas separadamente.....	61
5.5.2 Emprego das bacteriocinas em combinação no queijo com redução de 25% da concentração de sódio.....	66
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÕES.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
9. ANEXO.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os alimentos e a segurança alimentar

Os alimentos são uma das grandes preocupações da saúde pública, pois o seu controle higiênico-sanitário constitui um fator preponderante para a prevenção das doenças de origem alimentar e relevante fator de desenvolvimento social (Germano e Germano, 2011). Os alimentos são passíveis de contaminações provocadas pelos mais diversos agentes etiológicos (bactérias, leveduras e bolores), desta forma, podendo conduzir ao desenvolvimento de patologias associadas a esses microrganismos e/ou a suas toxinas (Stamford *et al.*, 2006).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) se destacam como um problema de saúde pública mundial, com 1,5 bilhões de casos de gastroenterites anuais, afetando, em especial, crianças abaixo de cinco anos de idade, principalmente, em países em desenvolvimento, levando a 1,8 milhões de óbitos por ano (FAO/WHO, 2008b).

A adequação da produção de alimentos à demanda crescente da população é um dos grandes desafios da atualidade. Com a globalização e as mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares (consumo de *fast-food* e alimentos crus, entre outros), ficaram mais evidentes os problemas relativos à qualidade dos alimentos para o consumo humano (FAO/WHO, 2008a).

Atualmente, os surtos microbianos associados a alimentos não estão restritos apenas a produtos de origem animal, mas também a produtos de origem vegetal, como frutas ou vegetais, tanto *in natura* como processados (Brasil, 2016). Em paralelo aos fatores biológicos, agentes químicos e físicos incorporados aos alimentos, de forma intencional ou acidental, também podem levar a danos ao consumidor (Germano e Germano, 2011).

Dentre os produtos de origem animal, destacam-se o leite cru e os produtos lácteos não-pasteurizados, os quais podem conter grande quantidade de *Staphylococcus aureus*, geralmente, devido à presença de mastite estafilocócica nos animais de produção (Lancette e Bennett, 2001; Franco e Landgraf, 2002). A mastite estafilocócica é bem conhecida nos rebanhos leiteiros, e as chances de se contrair intoxicação alimentar são grandes se o leite infectado dessas vacas for consumido ou utilizado na fabricação de queijos (Argudín, Mendoza e Rodicio, 2010).

1.2 Queijo Minas frescal

O consumo de queijo é popular em diversos países do mundo pelo fato de estar associado a reais benefícios à saúde do consumidor e, também, pelo seu sabor e aroma. Os benefícios à saúde incluem o fato de naturalmente conter microrganismos probióticos e propriedades antitumorais, e por reduzir os índices de diabetes do tipo II (Mozaffarian, 2010).

Este alimento é definido como um produto fermentado, ou não, à base de leite ou leite reconstituído, que pode apresentar uma ampla diversidade de características organolépticas, que variam de acordo com a sua fabricação (Fox *et al.*, 2000). O queijo é um concentrado de lipídeos, proteínas, vitaminas, cálcio, fósforo, carboidratos e sais minerais (Choi *et al.*, 2016). Apesar de existirem vestígios da produção do queijo desde o homem pré-histórico, o relato mais antigo de que se tem conhecimento do consumo do leite em forma sólida é datado de 7.000 a.C. (Perry, 2004).

Segundo a Portaria nº 352 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, o queijo Minas frescal é definido como sendo o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácteas específicas. Este queijo é do tipo semigordo (25 a 44% de gordura na matéria seca), de alta atividade de água, de consumo imediato e de curta vida de prateleira (Brasil, 1997).

Dentre os produtos lácteos, o queijo apresenta contribuição decisiva no consumo de sódio, na forma de cloreto de sódio (NaCl), pela população no seu dia-a-dia (Moshfegh *et al.*, 2012). Apesar de ser fundamental para o organismo, quando em excessivas quantidades, o NaCl causa a retenção de líquidos no organismo aumentando o seu volume hídrico, o que culmina na hipertensão, sendo um fator de risco para doenças cardiovasculares (Durack, Alonso-Gomez e Wilkinson, 2008; Wyness, Butriss e Stanner, 2012). Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO), visando à qualidade de vida da população, recomenda que o consumo de NaCl não deva ultrapassar o valor diário de 5 g (WHO, 2003).

No Brasil, estudos estimam que a população consome cerca de duas vezes o valor recomendado pela WHO (ABIA, 2013). Em concordância com estes trabalhos, dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 revelam que o consumo individual diário de sal no Brasil foi de 11,38 g (Sarno *et al.*, 2013).

Uma opção tecnologicamente viável é a substituição do NaCl por cloreto de potássio (KCl), pois este sal é quimicamente semelhante ao anterior e estudos na literatura têm

demonstrado resultados promissores em relação à sua aplicação nesta substituição (Johnson *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2011; Grummer *et al.*, 2013). Dentre estes estudos, destaca-se a pesquisa de Gomes e colaboradores (2011), que teve como objetivo investigar o efeito da redução de sódio pela substituição parcial de NaCl por KCl, em diferentes proporções (0%, 25%, 50% e 75% [m/m]), na produção de queijo Minas frescal, durante 21 dias de estocagem. Os resultados revelaram que a redução do teor de sódio em até 51,8% neste tipo de queijo apresentou boa aceitação sensorial. O grupo, através de outros testes complementares, concluiu que a substituição parcial de 25% a 50% (m/m) de sódio no produto não alterou significativamente as suas propriedades organolépticas, quando comparado com os queijos tradicionais. Todavia a substituição do NaCl por outros sais, ou a sua simples redução, na formulação do produto alimentício, implica em diversas barreiras no processamento de queijos, com reflexos na qualidade físico-química, reológica, funcional, organoléptica do produto e, principalmente, na atividade microbiana (Cruz *et al.*, 2011), o que pode comprometer a sua segurança para o consumidor (Taormina, 2010).

Os principais fatores que afetam a qualidade microbiológica do queijo são a má qualidade do leite e as falhas em sua manipulação. A temperatura utilizada no processo de produção do queijo Minas frescal, a qual varia entre 35-40 °C, favorece o crescimento microbiano. Ainda, a exposição a temperaturas abusivas durante o armazenamento e o transporte desse produto, como, por exemplo, a quebra da rede de frio (que seria todo o processo desde a produção até a mesa do consumidor, sob condições adequadas de refrigeração), pode levar à multiplicação de bactérias deteriorantes ou patogênicas (Silva, 2013).

Dentre os principais patógenos do leite e de seus derivados, destacam-se os estafilococos (Andrade *et al.*, 2011). Os alimentos comumente incriminados em intoxicação causada pelos *Staphylococcus* spp. são: carnes e produtos cárneos (principalmente, presuntos), saladas mistas, coberturas de panificação e produtos lácteos (principalmente, queijos) (Silva *et al.*, 2007; Irlinger, 2008).

Segundo dados coletados do Serviço de Vigilância Sanitária (SVS), os quais concordam com os artigos citados no parágrafo anterior, o leite e os seus derivados estão entre os principais vetores de DTA no Brasil. Apesar de ocupar a quarta posição dos alimentos mais envolvidos em surtos, os grupos “doces e sobremesas” e “alimentos mistos” também englobam produtos lácteos. Desta forma, não se pode subestimar a influência destes produtos como vetores para *S. aureus* (**Figura 1**).

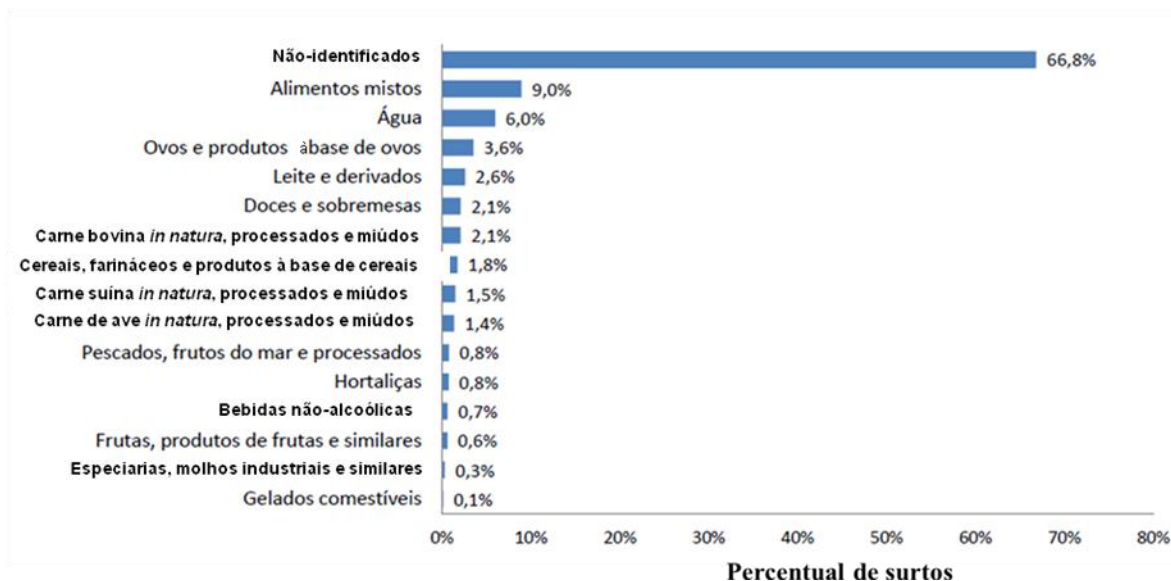


Figura 1. Percentual de surtos por tipo de alimento no período de 2000-2016. Adaptado de Brasil (2016).

Os dados (**Figura 2**) mostram que *S. aureus* representa o terceiro agente patogênico mais frequentemente associado a surtos alimentares notificados, sendo responsável por cerca de 20% dos casos com o agente etiológico identificado nos últimos anos (Brasil, 2016). O primeiro agente patogênico é *Salmonella* spp., sendo responsável por cerca de 25% dos casos de surtos notificados, e o segundo é a *Escherichia coli*, sendo responsável por cerca de 24% dos casos de surtos notificados. Importante destacar que mais de 70% dos surtos não apresentam agente etiológico conclusivo ou identificado. Assim, a relevância da espécie *S. aureus* em intoxicações alimentares pode estar subestimada (**Figura 2**).

Nos Estados Unidos, um estudo realizado no período de 2008 a 2010 mostrou que *S. aureus* está entre os agentes etiológicos mais custosos aos cofres públicos, em conjunto com *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.. Anualmente, os gastos com as infecções causadas por *S. aureus* ultrapassam o valor de 160 milhões de dólares (Scharff, 2012). A ocorrência deste microrganismo em alimentos representa um grande risco em termos de saúde pública, pois muitas de suas estirpes produzem enterotoxinas, as quais são capazes de levar ao processo de intoxicação, dentro de poucas horas após a sua ingestão (Martins e Reis, 2012).

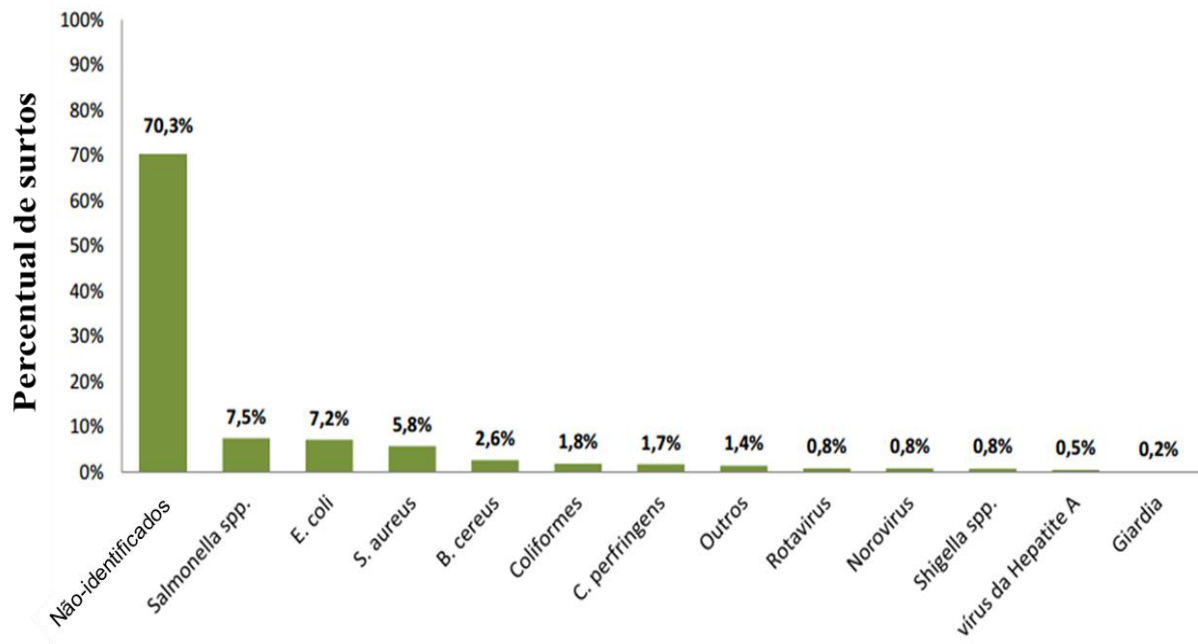


Figura 2. Percentual de surtos por agente etiológico no período de 2000-2016. Adaptado de Brasil (2016).

Os padrões microbiológicos para diversos produtos, inclusive queijos frescos, foram estabelecidos pela RDC 12, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), onde a tolerância para *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP) é de até 10^3 UFC/g em queijos de alta umidade. Todavia, muitos trabalhos mostram a presença de *S. aureus* em concentrações muito superiores aos valores preponderados pela legislação. Passos e colaboradores (2009) observaram que 50,5% das amostras de queijo Minas frescal vendido em cidades do Paraná estavam contaminadas com *S. aureus* e a maioria das amostras apresentou contagens maiores do que 10^4 UFC/g de produto. Komatsu e colaboradores (2010) analisaram 50 amostras de queijo Minas frescal produzido no município de Uberlândia (MG) e 88% das amostras encontravam-se fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde para *S. aureus*, onde as contagens de microrganismos variaram de 10^4 a 10^5 UFC/g. Pinto e colaboradores (2011) analisaram 20 amostras de queijo Minas frescal artesanal produzido no município de Santa Helena (PR) e 100% das amostras estavam contaminadas com *S. aureus* e encontravam-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Zocche e colaboradores (2012) identificaram SCP em 10,7% das amostras de queijo Minas frescal produzido no município de Pelotas (RS) e todas apresentaram contagens superiores a 10^3 UFC/g, as quais também estão fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Por fim, o estudo de Martins e Reis (2012) identificou *S. aureus* em 18 amostras (45%) de queijo Minas frescal vendido no município de Frutal (MS) e, novamente, todas apresentaram contagens superiores a 10^3 UFC/g.

Todos os estudos acima servem para corroborar como o controle de microrganismos patogênicos na cadeia de produção na indústria de alimentos é fundamental para que se garanta a segurança do consumidor e a qualidade do produto, que é amplamente consumido no Brasil e no mundo (Martin, 2015).

1.3 O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e, segundo a LPSN (2016), é composto por 52 espécies e 28 subespécies. Ogston descreveu pela primeira vez um representante do gênero em 1882, onde relatou uma bactéria como causadora de infecções cirúrgicas (*apud* Becker, Heilman e Peters, 2014). Os membros pertencentes a este gênero são cocos Gram-positivos, com variação de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase-positivos, possuindo um genoma com baixo teor de G+C (variando de 30 a 39%) e a sua divisão celular se dá em vários planos, desta forma, originando a estrutura de cachos irregulares (Kloss e Bannerman, 1994; Garrity e Holt, 2001).

Os estafilococos são bactérias ubíquas, as quais estão extensamente difundidas no meio-ambiente, e, principalmente, presentes em amostras de pele e de membranas mucosas de animais e seres humanos, onde fazem parte de sua microbiota anfibiótica. Essas bactérias também podem ser encontradas em diversos outros habitats, tais como: tratos gastrointestinais de peixes (Liu *et al.*, 2014), associadas a recifes de corais (Lampert *et al.*, 2008), a ouriços, anêmonas e macroalgas do mar (Xiao *et al.*, 2009; Leiva *et al.*, 2015), além de estarem presentes em ecossistemas com condições extremas, como os encontrados no mar Antártico, no Oeste Antártico e nos lagos de grande altitudes da Cordilheira dos Andes (Flores *et al.*, 2009; Tashirev *et al.*, 2010; Leiva *et al.*, 2015).

As espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser divididas em dois grandes grupos, os SCP e os coagulase-negativos (SCN). Esta divisão se baseia na presença ou na ausência da coagulase, que faz parte de um complexo capaz de coagular o plasma sanguíneo pela conversão do fibrinogênio em fibrina (Koneman, 2008).

1.3.1 *Staphylococcus* coagulase-negativos

Os SCN formam um grande grupo, no qual está inserida a maioria das espécies de *Staphylococcus* spp. Dentro deste grupo, podemos destacar: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*,

Staphylococcus simulans, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus*. As espécies pertencentes a este grupo foram consideradas, por muitos anos, como contaminantes de amostras clínicas e, apenas no início da década de 1970, foram relatados os primeiros espécimes clínicos contendo integrantes deste grupo atuando como patógenos oportunistas em pacientes imunossuprimidos (Becker, Heilmann e Peters, 2014).

A espécie *S. epidermidis* é o SCN mais comumente isolado de humanos, sendo pertencente à microbiota anfibiótica da pele, prevalente em regiões úmidas, e que tem, normalmente, uma relação harmoniosa com o hospedeiro. Todavia, na literatura, já foram descritos como isolados de infecções associadas a dispositivos médicos, do trato urinário, de feridas cirúrgicas, de bacteremia, de meningite, de infecções oftalmológicas e de outros tipos de infecção (Bannerman e Peacock, 2007; Seral *et al.*, 2011).

Apesar de algumas estirpes apresentarem um potencial patogênico, diversas estirpes de SCN possuem o *status* GRAS [*generally recognized as safe* (geralmente reconhecido como seguro)], sendo estas de fundamental importância para a indústria de alimentos. Essas bactérias contribuem para propriedades organolépticas desejáveis, como a produção de aromas e sabores em alimentos fermentados, como salsicha e queijos. Dentre os principais SCN utilizados na indústria, destacam-se *S. carnosus* e *S. xylosus* (Irlinger, 2008; Müller *et al.*, 2015; Vermassen *et al.*, 2016).

A espécie *S. carnosus* é usada como cultura iniciadora de processos fermentativos em produtos cárneos, como salsichas (Müller *et al.*, 2015). Esta bactéria contribui para o desenvolvimento e a estabilidade de diversas propriedades desses produtos, tais como: a formação de compostos aromáticos pelo catabolismo de cadeias de ácidos aminados em compostos metílicos voláteis; a coloração vermelha característica, a qual é gerada a partir da atividade da enzima nitrato-redutase estafilocócica; propriedades antioxidantes, para evitar o processo de rancificação, e o catabolismo de piruvato em diacetil e acetoína, os quais são responsáveis pelo aroma amanteigado do produto (Müller *et al.*, 2015; Vermassen *et al.*, 2016).

A espécie *S. xylosus* habita a pele e a mucosa de mamíferos e, por esta razão, é comum encontrá-la em alimentos de origem animal, como leite, queijo, carne e produtos cárneos fermentados. Da mesma forma que *S. carnosus*, esta espécie também é utilizada como cultura iniciadora de processos fermentativos em produtos cárneos. Estas duas espécies são as principais integrantes do gênero *Staphylococcus* utilizadas como culturas iniciadoras na indústria de alimentos (Vermassen *et al.*, 2016).

1.3.2 *Staphylococcus* coagulase-positivos

A principal espécie representante dos SCP é *S. aureus*, que tem um grande impacto nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e na indústria de alimentos. Neste grupo, além de *S. aureus*, podem-se encontrar as seguintes espécies: algumas estirpes de *Staphylococcus hyicus*; *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus agnetis* (Taponen *et al.*, 2012). Estas espécies estão, geralmente, associadas à área veterinária (Casanova *et al.*, 2011).

S. hyicus é uma bactéria que pode causar epidermite exsudativa (EE) em porcos adultos, mas, principalmente, em leitões. As estirpes deste microrganismo são divididas em patogênicas e não-patogênicas de acordo com a sua capacidade de induzir a EE em porcos e de produzir a toxina esfoliativa, que é o principal fator de virulência para gerar a doença (Leekitcharoenphon *et al.*, 2016). *S. lutrae* foi descrito, pela primeira vez, em 1997 em amostras colhidas de lontras (Foster *et al.*, 1997). A espécie *S. schleiferi* subsp. *coagulans* é um microrganismo raro, que é encontrado no ouvido de cachorros com otite externa, mas já foi reportado um caso envolvendo humanos, onde este microrganismo foi encontrado em infecção de cortes cirúrgicos (Kumar *et al.*, 2007). As espécies *S. delphini*, *S. intermedius* e *S. pseudintermedius* têm sido isoladas da pele e da nasofaringe de diversos animais (cães, gatos, pássaros e cavalos, entre outros) como microbiota comensal e a partir de sítios de infecção (articulações, olhos e conjuntiva). Existem relatos de infecções em humanos causadas por estas espécies, associadas a abrasões geradas por mordidas. *S. agnetis* é um microrganismo descrito recentemente, o qual causa a condronecrose bacteriana com osteomielite na tíbia proximal e fêmur, que leva à claudicação em frangos de corte (Taponen *et al.*, 2012; Al-Rubaye *et al.*, 2015).

S. aureus é uma bactéria presente na microbiota humana, sendo frequentemente encontrada na pele, nas fossas nasais e nas mucosas de pessoas saudáveis (Peacock e Paterson, 2015). Todavia, a espécie também pode atuar como um patógeno altamente eficiente, podendo provocar desde uma simples infecção, como espinhas, furúnculos e celulite, até infecções graves (pneumonia, meningite e endocardite) e síndromes toxigênicas (síndrome do choque tóxico, intoxicação alimentar e esfoliação localizada e generalizada) (Santos *et al.*, 2007). Dentre os seus fatores de virulência, destacam-se os componentes de superfície celular e as toxinas (Trabulsi e Alterthum, 2008).

A intoxicação causada por *S. aureus* é provocada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos (Franco e Landgraf, 2002). Logo, o crescimento de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas em alimentos representa um perigo em potencial à saúde pública, uma vez que pode levar a intoxicações alimentares (Lancette e Bennett, 2001). As enterotoxinas são produzidas entre 10 °C e 46 °C. Todavia, a produção máxima ocorre em temperaturas de 40 °C a 45 °C (Martin, 2015). A concentração mínima de células necessária para se ter produção suficiente de enterotoxina que cause a intoxicação é de 10⁵ UFC/g no alimento (Silva, 2013). Essas enterotoxinas possuem propriedades importantes que lhes permitem causar a intoxicação, que são: (1) a capacidade de causar vômito e gastroenterite em primatas; (2) a capacidade de atuar como superantígeno ativando de forma não-específica linfócitos T, seguida da liberação de citocinas e choque sistêmico, e (3) a resistência ao calor e à digestão pela ação da pepsina (Hennekinne *et al.*, 2010).

As enterotoxinas estafilocócicas são nomeadas com letras do alfabeto, de acordo com a ordem cronológica em que foram descritas (Freitas, 2005). Já foram identificadas 24 enterotoxinas estafilocócicas, as quais foram designadas de SEA até SE/V₂, com exceção de SEF, pois esta foi reclassificada como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Forsythe, 2002). A seguir, seguem as enterotoxinas que já foram descritas: A (SEA), B (SEB), C₁ (SEC₁), C₂ (SEC₂), C₃ (SEC₃), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH), I (SEI), J (SE/J), K (SE/K), L (SE/L), M (SE/M), N (SE/N), O (SE/O), P (SE/P), Q (SE/Q), R (SER), S (SES), T (SET), U (SE/U), U₂ (SE/U₂) e V (SE/V), estando divididas em enterotoxinas estafilocócicas (SE) e as enterotoxinas do tipo estafilocócico (SE/). As SE são aquelas enterotoxinas estafilocócicas que, após a sua ingestão, induziram o vômito em primatas. Já as SE/ são aquelas enterotoxinas que não tiveram ação emélica em primatas, ou ainda não foram testadas quanto a isso (Hennekinne, De Buyser e Dragacci, 2012). Elas são muito semelhantes entre si quando comparados a sua composição e o seu modo de ação. Todavia, são separadas, baseando-se em suas diferenças antigênicas (Freitas, 2005).

O quadro gastrointestinal tem um início rápido, entre duas a oito horas após a ingestão do alimento, e acaba levando a náuseas, dor abdominal, diarreia e vômito, podendo ou não haver a ocorrência de febre. Em pacientes saudáveis, a doença é autolimitada e a recuperação ocorre em poucos dias (Hennekinne *et al.*, 2010).

SEA é a enterotoxina mais associada a casos de intoxicação alimentar vinculados a bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Isto é, provavelmente, causado por sua alta resistência a enzimas proteolíticas (Argudín, Mendoza e Rodicio, 2010; Hennekinne *et al.*, 2010). A sua predominância é muito bem documentada nos mais diversos países. Como

exemplo, um estudo sobre 359 surtos que ocorreram na União Europeia entre o período de 1969-1990 revelou que cerca de 80% das estirpes de *S. aureus* produziam SEA (Wieneke, Roberts e Gilbert, 1993). Na França, SEA foi a enterotoxina mais frequente em surtos alimentares, estando presente em cerca de 70% dos casos e associada aos mais diversos tipos de alimentos (Kérouanton *et al.*, 2007). Na Áustria, um surto envolvendo produtos derivados de leite de vaca afetou 40 crianças e este foi atribuído a uma estirpe de *S. aureus* produtora de SEA e SED (Schmid *et al.*, 2009). No Brasil, um estudo envolvendo cepas de *S. aureus* provenientes de 16 surtos relacionados a laticínios revelou que o gene de enterotoxina mais encontrado foi o *sea* (codificador da SEA), seguido do *seb* (codificador da SEB) (Veras *et al.*, 2008). Em Taiwan, estirpes recuperadas de surtos alimentares ocorridos no período de 2000-2003 apresentaram, em sua maioria, o gene *sea*, seguido pelos genes *seb* e *sec* (codificador da SEC) (Chiang *et al.*, 2008).

As demais enterotoxinas clássicas, grupo que compreende SEA, SEB, SEC, SED e SEE, já foram encontradas causando surtos alimentares (Hennekinne *et al.*, 2010). Como exemplo, no fim de 2009, na França, ocorreram seis surtos alimentares causados pela enterotoxina SEE em queijos moles fabricados a partir de leite não-pasteurizado (Ostyn *et al.*, 2010).

Além da capacidade de produzir enterotoxinas, umas das características mais importantes de *S. aureus* é a capacidade de formar biofilme, tanto em superfícies inertes quanto em superfícies biológicas (Becker, Heilmann e Peters, 2014). Os biofilmes são definidos como microrganismos aderidos a superfícies e embebidos em uma matriz polimérica hidratada, de síntese própria, constituída de polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (eDNA) e ácidos teicoicos, denominados coletivamente de matriz polimérica extracelular (*extracellular polymeric substances*, EPS) (Sauer, Rickard e Davies, 2007).

O biofilme pode ser formado por espécies heterogêneas, sendo este tipo o mais comum, composto por diversas espécies bacterianas, ou até mesmo por outros microrganismos (fungos e algas), e os subprodutos metabólicos de uma espécie podem favorecer o crescimento de outros microrganismos. O biofilme também pode ser homogêneo, ou seja, formado por uma única espécie, o que é mais raro (Sauer, Rickard e Davies, 2007).

A formação do biofilme bacteriano é um processo multifatorial que ocorre em três grandes etapas: adesão, maturação e desagregação (**Figura 3**; Otto, 2013). Na etapa inicial, as forças adesivas desempenham um papel fundamental na interação com superfícies, como equipamentos usados no processamento de alimentos, e nas interações intercelulares. Em seguida, as bactérias aderidas começam a produzir EPS, o que leva a um processo irreversível

de adesão. Na segunda etapa, as multicamadas de EPS formadas devido à multiplicação das células levam à formação do biofilme maduro (maturação). Forças de ruptura fazem-se necessárias para que ocorra a formação de sulcos, os quais irão permitir o transporte de nutrientes para todas as partes do sistema, dando-lhe a sua estrutura característica. Por fim, essas forças também estão envolvidas no rompimento da estrutura do biofilme (desagregação), permitindo a disseminação dos microrganismos para outras superfícies (Otto, 2009).

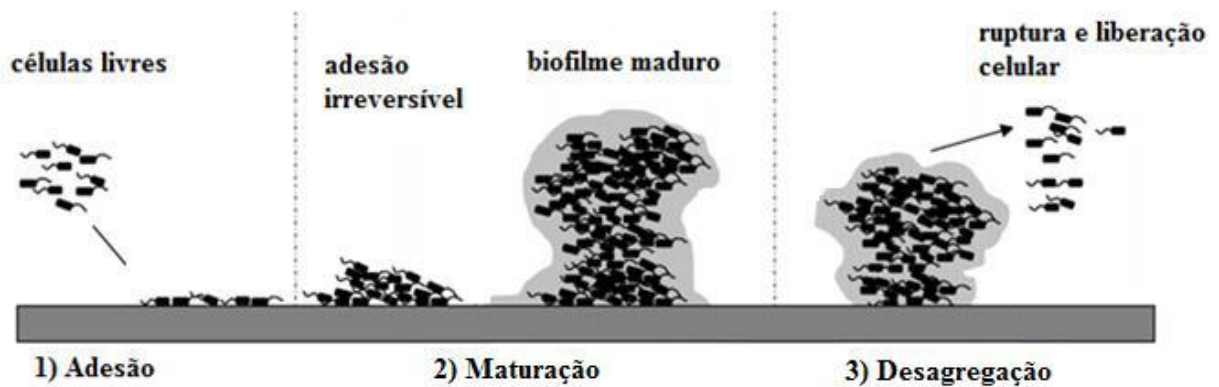


Figura 3. Etapas de desenvolvimento do biofilme. Adaptado de Trentin, Giordani e Macedo (2013).

O uso abusivo de antimicrobianos, como meticilina e outras penicilinas, junto com a habilidade do *S. aureus* em adquirir, rapidamente, resistência a estes compostos de uso clínico têm se tornado um grande problema para a área da saúde. A meticilina foi introduzida, em 1959, para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes à penicilina. Todavia, em 1961, já havia relatos das primeiras estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). As estirpes MRSA contêm o gene *mecA* (2,1 kb), o qual codifica a proteína ligante de penicilina alterada (PBP2a), que pertence ao grupo das enzimas necessárias para a biossíntese da parede celular, tendo baixa afinidade pelos antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos (Pantosti, 2012). Este gene está inserido dentro de um elemento genético móvel (EGM), o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (Peacock e Paterson, 2015). Importante destacar que os MRSA são responsáveis, anualmente, por cerca de 20.000 mortes nos Estados Unidos, e este valor é superior ao relatado para a síndrome da imunodeficiência adquirida (DeLeo e Chambers, 2009).

O surgimento de MRSA adquiridos pela comunidade (CA-MRSA), descritos pela primeira vez na década de 1990, tornou ainda mais difícil o controle de novas epidemias causadas por essas bactérias (David e Daum, 2010). Essas estirpes de CA-MRSA se distinguem geneticamente das estirpes adquiridas em hospitais (HA-MRSA) por possuírem

versões mais simples do *SSCmec* e apresentarem menos genes de resistência a antimicrobianos. A combinação destas características contribui para que as estirpes CA-MRSA tenham um crescimento mais acelerado quando comparadas com as estirpes HA-MRSA e, por consequência, fazem com que aquelas cepas se disseminem pela comunidade e sejam responsáveis por diversos tipos de infecções (David e Daum, 2010). Já, as estirpes HA-MRSA, por possuírem resistência a múltiplas drogas, se disseminam em ambientes hospitalares, pois, nestes locais, existe uma pressão seletiva pelo uso intensivo de antimicrobianos na terapêutica e estes microrganismos acabam sendo selecionados (Peacock e Paterson, 2015).

A alta incidência de infecções causadas por MRSA levou ao aumento da utilização de vancomicina na terapêutica e, assim, em 1996 no Japão, o primeiro caso de redução de sensibilidade à vancomicina foi relatado, onde a estirpe apresentava resistência intermediária à vancomicina (VISA) (Hiramatsu *et al.*, 1997). O surgimento destes microrganismos deixou as autoridades de saúde preocupadas, pois esta é uma das drogas de última escolha no tratamento de infecções relacionadas a MRSA. Não demorou muito também para aparecer *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) e, cinco anos depois, em 2002, isolou-se a primeira estirpe VRSA de uma amostra coletada do orifício de saída de um cateter e de uma úlcera no pé de um paciente em diálise (CDC, 2002).

O uso de vancomicina não só levou ao aparecimento de estirpes resistentes nos centros de saúde, mas também no rebanho leiteiro, pela contaminação dos campos de pastagem. Bhattacharyya e colaboradores (2016) isolaram, em diferentes distritos do estado de Bengala Ocidental (Índia), duas estirpes de VRSA, uma de leite bovino e a outra de leite caprino, e cinco estirpes de VISA, onde quatro eram provenientes de leite bovino e a outra de leite caprino. Este foi o primeiro registro de VRSA em alimentos de origem animal. A detecção dessas cepas resistentes em leite é um sério problema que, se não receber a devida atenção, pode gerar graves problemas de saúde ao consumidor.

O rápido aumento de estirpes resistentes aos antimicrobianos de escolha na terapêutica (ramoplanina, ceftifur e penicilina) e daqueles relacionados à indústria de alimentos, como fatores de crescimento para animais de corte (eritromicina e tetraciclina, entre outros) (Roberson, 2012, Oliver e Wells, 2015; Bagal *et al.*, 2016), faz com que a pesquisa e a caracterização de novas substâncias para o controle e o tratamento de infecções sejam fundamentais para a preservação da saúde e da qualidade de vida da população. Dentre essas novas substâncias, destacam-se as bacteriocinas.

1.4 Bacteriocinas

Na natureza, muitos procariotos e eucariotos produzem uma variedade de peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente (Snyder e Worobo, 2014). Entre os peptídeos antimicrobianos mais estudados, estão as bacteriocinas (Bac), que são compostos de natureza proteica, sintetizados por bactérias e arqueas, que, geralmente, possuem ação contra microrganismos da mesma espécie ou de espécies relacionadas à estirpe produtora da bacteriocina (Jack, Tagg e Ray, 1995; Heng *et al.*, 2007; Rea *et al.*, 2011).

Em 1925, Andre Gratia descreveu a primeira bacteriocina, a qual foi denominada colicina V por ser produzida pela estirpe *E. coli* V, quando relatou a descoberta de um antagonismo entre a estirpe produtora e outras estirpes de *E. coli* (*apud* Cotter, Hill e Ross, 2005). A partir daí, diversas bacteriocinas já foram descritas em estirpes produtoras dos mais diversos gêneros bacterianos. Importante destacar que uma mesma espécie pode produzir diversos tipos de bacteriocinas e que uma grande variedade de estirpes bacterianas descritas é capaz de produzir uma ou mais bacteriocinas (Riley e Chavan, 2007). Shand e Leyva (2007) citam a produção de bacteriocinas por arqueas, as "arqueocinas", onde dentro deste grupo destacam-se as halocinas e as sulfobolicinas.

As bacteriocinas podem ter um amplo espectro de ação, com capacidade de inibir o crescimento de microrganismos dos mais diversos gêneros bacterianos, como o exemplo da nisina (Mattick, Hirsch e Berridge, 1947), ou ainda podem ter um estreito espectro de ação, sendo capazes de inibir apenas microrganismos estreitamente relacionados à estirpe produtora, como o exemplo da thuricina CD (Rea *et al.*, 2010).

Esses compostos podem ser caracterizados quanto ao seu efeito, onde essas bacteriocinas podem ser bacteriostáticas, sendo capazes de inibir a multiplicação celular; bactericidas, sendo capazes de causar a morte celular do microrganismo-alvo sem levar à destruição do arcabouço celular, e, por último, bacteriolíticas, quando a sua ação leva à morte celular e à destruição total ou parcial da estrutura celular (Jack, Tagg e Ray, 1995).

As estirpes bacteriocinogênicas, para se protegerem da sua própria bacteriocina, possuem um sistema que lhes confere imunidade. Os genes que o codificam estão presentes no grupamento genético responsável pela produção e pelo transporte da bacteriocina, sendo esses genes expressos simultaneamente. Neste contexto, a imunidade à bacteriocina pode ocorrer de duas principais maneiras: por proteínas de imunidade específicas e pelos transportadores do tipo ABC. Importante ressaltar que esses mecanismos de imunidade são específicos para cada bacteriocina, todavia, há casos em que ocorre a imunidade cruzada entre

estirpes produtoras de bacteriocinas similares (Bastos *et al.*, 2009; Bierbaum e Sahl, 2009; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Gabrielsen *et al.*, 2014).

Os grupamentos gênicos das bacteriocinas podem estar inseridos dentro de plasmídeos, o mais comumente encontrado, no cromossomo ou em outros EGM (transpósons e profagos) (Jack, Tagg e Ray, 1995). Dentro desses grupamentos, estão compreendidos os genes que codificam o peptídeo-precursor da bacteriocina, enzimas de processamento e proteínas de transporte, regulação e imunidade. Em alguns casos, há também a presença de genes envolvidos na modificação de ácidos aminados (Jack, Tagg e Ray, 1995; Bastos *et al.*, 2009).

As bacteriocinas, em sua maioria (classes I, II, IV e V), são traduzidas na forma de peptídeos-precursor, contendo uma sequência-líder, a qual tem a função de manter o peptídeo na sua forma inativa dentro da célula produtora, assim, protegendo-a de uma possível ação do composto no seu interior (Jack, Tagg e Ray, 1995; Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Esta sequência-líder também atua no reconhecimento do peptídeo-precursor pela maquinaria de modificação da bacteriocina. A clivagem da sequência-líder a partir do peptídeo-precursor transcorre, em geral, durante o seu processo de exportação por um transportador do tipo ABC dedicado, e pode ocorrer pela ação do próprio transportador, por uma protease específica ou por uma via de secreção de proteínas específicas (Jack, Tagg e Ray, 1995; Cotter, Hill e Ross, 2005; Bierbaum e Sahl, 2009).

A lisostafina (classe III) também é produzida na forma de uma proteína precursora, a qual é clivada durante o processo de exportação da proteína. Entretanto, a pró-enzima apresenta ainda uma sequência peptídica repetida na sua região N-terminal que é removida por uma cisteína-peptidase apenas após o término da sua saída para o meio extracelular, onde se torna uma proteína madura (Heng *et al.*, 2007; Bastos, Coutinho e Coelho, 2010).

A constante descrição de bactérias produtoras de novas bacteriocinas com as mais diversas características faz com que seja necessária uma classificação abrangente. Desta forma, para as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, o presente trabalho irá adotar a classificação proposta por Duarte (2016) e Coelho, Duarte e Bastos (2017), onde os peptídeos foram divididos em cinco grandes classes (**Quadro 1**). O destaque para esta nova divisão é a classe V, que abrange os “sactibióticos” ou “sactipeptídeos”.

Quadro 1. Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas (Duarte, 2016; Coelho, Duarte e Bastos, 2017)

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	SUBCLASSES	EXEMPLOS (REFERÊNCIAS)
Classe I (lantibióticos)	Pequenos peptídeos (< 5 kDa), geralmente, termoestáveis, contendo ligações-tioéter raras com o carbono-β	Ia: peptídeos processados pelas enzimas de modificação LanB e LanC Ib: peptídeos processados pela enzima bifuncional LanM Ic: lantibióticos de dois componentes, processados por LanM Id: peptídeos contendo labionina, processados por LanKC	Nisina (Mattick, Hirsch e Berridge, 1947) Mersacidina (Brötz <i>et al.</i> , 1995) Lacticina 3147 (Martin <i>et al.</i> , 2004) Labirintopeptina A1 (Féris <i>et al.</i> , 2013)
Classe II	Pequenos peptídeos (< 10 kDa), geralmente, termoestáveis, que não apresentam ácidos aminados modificados	IIa: peptídeos lineares do tipo-pediocina, ativos contra listéria IIb: bacteriocinas de dois peptídeos lineares IIc: bacteriocinas de um único peptídeo linear do tipo não-pediocina e/ou com sequência-líder dependente do sistema <i>sec</i> IId: peptídeos lineares únicos, não-processados IIe: peptídeos formados por uma degradação específica de proteínas maiores IIf: bacteriocinas compostas por mais de dois peptídeos lineares	Pediocina PA-1 (Rodríguez, Martínez e Kok, 2002) Lactacina F (Abee, Klaenhammer e Letellier, 1994) Lactococcina A (Holo, Nilssen e Nes, 1991) Aureocina A53 (Netz <i>et al.</i> , 2002) Propionicina F (Brede <i>et al.</i> , 2004) Aureocina A70 (Netz <i>et al.</i> , 2001)
Classe III	Proteínas maiores do que 10 kDa e, geralmente, termolábeis	IIIa: bacteriolisinas IIIb: bacteriocinas não-líticas	Lisostafina (Bastos, Coutinho e Coelho, 2010) Helveticina J (Thompson, Collins e Mercer, 1996)
Classe IV	Pequenos peptídeos cíclicos e termoestáveis	IVa: peptídeos com <i>pIs</i> altos (~10) IVb: peptídeos com <i>pIs</i> mais baixos (4-7)	Enterocina AS-48 (Maqueda <i>et al.</i> , 2004) Gassericina A (Kawai <i>et al.</i> , 2004)
Classe V (“sactibióticos”)	Pequenos peptídeos contendo ligações-tioéter raras com o carbono-α	Va: peptídeos lineares Vb: peptídeos cíclicos Vc: “sactibióticos” compostos por dois peptídeos	Thurincina H (Lee, Churey e Worobo, 2009) Subtilosina A (Kawulka <i>et al.</i> , 2003) Thuricina CD (Rea <i>et al.</i> , 2010)

1.4.1 Classe I

Nesta classe, também chamada de lantibióticos, estão englobadas as bacteriocinas compostas por peptídeos pequenos (< 5 kDa), os quais variam entre 18 e 38 ácidos aminados e que são, geralmente, termostáveis. Os peptídeos que compõem esta classe apresentam, na sua estrutura molecular, ácidos aminados incomuns, com modificação pós-tradução, como, por exemplo, lantionina (Lan) e β -metil-lantionina (MeLan). O termo lantibiótico deriva da expressão "antibiótico contendo lantionina" (Schnell *et al.*, 1988). As modificações pós-tradução englobam, na maioria das vezes, os ácidos aminados cisteína, serina e treonina. A enzima desidratase leva à desidratação da serina, o que culmina na formação da dideidroalanina (Dha). Já para a treonina, a ação da enzima leva à sua transformação em dideidrobutilina (Dhb). Em seguida, a ação da enzima ciclase promove a adição de grupos tiol da cisteína próxima à Dha ou Dhb, o que gera pontes-tioéter entre estes ácidos aminados, levando à formação de Lan e MeLan, respectivamente (Bierbaum e Sahl, 2009).

As modificações pós-traducionais do peptídeo acabam culminando na formação de estruturas cíclicas intramoleculares que, em conjunto com a presença dos resíduos de Lan e MeLan, conferem à bacteriocina um esqueleto resistente à ação de temperatura e proteases (Bierbaum e Sahl, 2009).

Além dos ácidos aminados modificados citados anteriormente, outros podem estar presentes nesta classe de bacteriocinas, tais como, por exemplo: labionina, S-aminovinil-D-cisteína, S-aminovinil-3-metil-D-cisteína, D-alanina, lisinoalanina e oxobutiril, entre outros (Bierbaum e Sahl, 2009; Dischinger, Chipalu e Bierbaum, 2014).

O principal representante e o primeiro lantibiótico a ser descrito foi a nisina (Mattick, Hirsch e Berridge, 1947). Esta bacteriocina é produzida por *Lactococcus lactis* e, há mais de 60 anos, é empregada como biopreservativo na indústria alimentícia nos mais diversos países do mundo (Chopra *et al.*, 2015). Outros representantes dos lantibióticos já foram descritos, tais como: a Pep5, as lacticinas 481 e 3147, a epidermina, a subtilina, a estafilococcina C55, a mersacidina e a labirintopectina A1, entre outros (Bierbaum e Sahl, 2009; Férir *et al.*, 2013). A classe I, devido à sua diversidade, está subdividida em quatro subclasses de acordo com as enzimas necessárias para a modificação de ácidos aminados dos lantibióticos: Ia, Ib, Ic e Id (Coelho, Duarte e Bastos, 2017), apresentadas no **Quadro 1**.

O modo de ação das bacteriocinas pertencentes a este grupo tem sido exaustivamente estudado com alguns representantes da classe. A partir desses estudos, pode-se concluir que os lantibióticos podem atuar de três maneiras: (i) inibindo a biossíntese da parede celular; (ii)

interrompendo a integridade da membrana celular por meio da formação de poros; (iii) ou através de um modo de ação duplo que combina os dois mecanismos anteriores (**Figura 4**; Bierbaum e Sahl, 2009).

1.4.2 Classe II

As bacteriocinas pertencentes à classe II são peptídeos pequenos (< 10 kDa), termoestáveis, que, diferentemente das bacteriocinas de classe I, não são submetidos a modificações pós-traducionais em seus ácidos aminados e, por consequência, não apresentam Lan e MeLan na sua estrutura (Cotter, Hill e Ross, 2005).

O modo de ação desta classe de bacteriocinas é a inserção do peptídeo na membrana citoplasmática bacteriana, causando permeabilização celular pela formação de poros, que resultará na dissipação do potencial de membrana e no extravasamento do conteúdo intracelular do microrganismo-alvo, levando-o à morte (**Figura 4**). De acordo com as características, cada peptídeo é alocado em uma das seis subclasses, as quais estão descritas no **Quadro 1** (Duarte, 2016; Coelho, Duarte e Bastos, 2017).

1.4.3 Classe III

Dentro desta classe, estão compreendidas proteínas maiores do que 10 kDa e, geralmente, sensíveis ao calor. A classe III, diferentemente das classes apresentadas anteriormente, está subdividida em duas subclasses: IIIa, as bacteriolisinas (ou enzimas bacteriolíticas), as quais atuam diretamente na parede celular das células de bactérias Gram-positivas (**Figura 4**; Bastos, Coutinho e Coelho, 2010), e IIIb, as proteínas antimicrobianas não-líticas, que levam à morte celular por dissipação do potencial de membrana (Heng *et al.*, 2007). Representantes das classes IIIa e IIIb são, respectivamente, a lisostafina e a helveticina J.

Em oposição ao que é normalmente encontrado na literatura para a produção de outras bacteriocinas, as estirpes produtoras de lisostafina, geralmente, não possuem os genes específicos que conferem imunidade, todavia, apresentam um mecanismo de defesa contra esta bacteriocina. As estirpes podem apresentar modificações ao nível da parede celular que conferem resistência à bacteriolisina produzida. Essas modificações são mediadas pelo gene *lif* e a proteína codificada catalisa a inserção de serina às pontes de pentaglicina que estruturam a peptidoglicano das células produtoras de lisostafina, conferindo, assim, a resistência (Heng *et al.*, 2007; Bastos, Coutinho e Coelho, 2010).

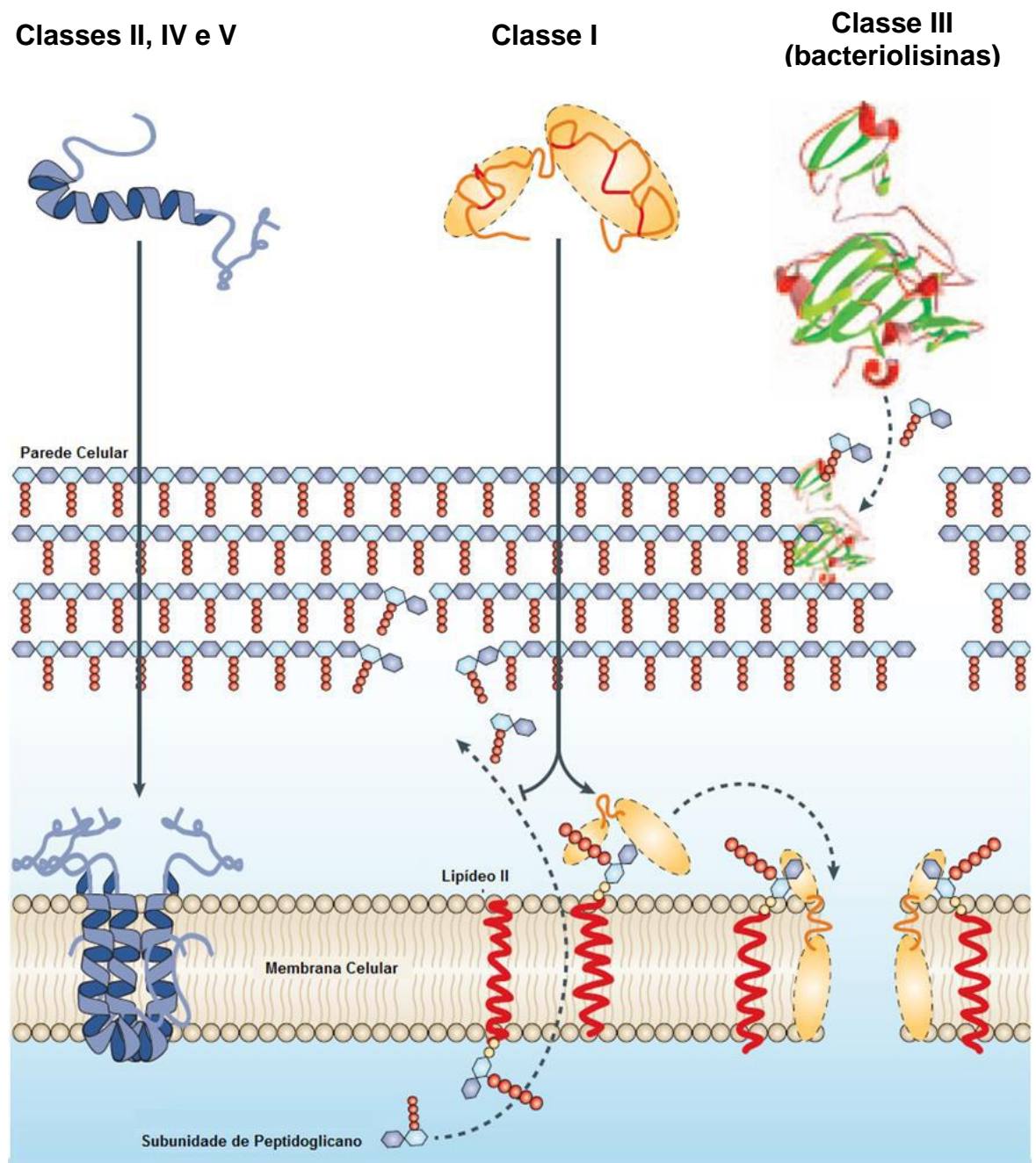


Figura 4. Modo de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas. Algumas bacteriocinas de classe I, como a nisina, podem apresentar um duplo modo de ação: elas podem se ligar ao lipídeo II, o transportador de subunidades de peptidoglicano do citoplasma para a parede celular, inibindo a biossíntese de parede, levando à morte celular. Podem, ainda, utilizar o lipídeo II como um ligante para iniciar o processo de inserção na membrana celular e a formação de poros na célula-alvo, o que também leva à morte celular. Geralmente, os peptídeos das classes II, IV e V têm uma estrutura anfipática, que lhes permite a inserção na membrana celular, promovendo despolarização e morte celular. As bacteriolisinas, bacteriocinas da subclasse IIIa, como a listofina, podem atuar diretamente na hidrólise da parede celular de bactérias Gram-positivas, levando-as à lise celular (Adaptada de Cotter, Hill e Ross, 2005).

1.4.4 Classe IV

Os peptídeos pertencentes a esta classe são bacteriocinas circulares e termostáveis, em que, após a clivagem do peptídeo-líder, os terminais carboxi e amino são ligados covalentemente por um tipo de ligação amida (Nissen-Meyer *et al.*, 2009). A estrutura cíclica dessas bacteriocinas contribui para a resistência a uma ampla faixa de temperatura e pH, e a diversas enzimas proteolíticas (Nissen-Meyer *et al.*, 2009; van Belkum, Martin-Visscher e Vederas, 2011).

Esses peptídeos, quando maduros, têm um tamanho que varia de 58 a 70 ácidos aminados e, em sua maioria, são catiônicos e hidrofóbicos. O seu modo de ação ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, a enterocina AS-48 e a carnociclina A, os dois peptídeos mais estudados quanto ao seu modo de ação, são capazes de permeabilizar a membrana da célula-alvo, levando à perda de moléculas, à interrupção da força-motora e, por consequência, à morte celular (**Figura 4**). Importante destacar que algumas bacteriocinas da classe IV, como a enterocina AS-48, são capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas quando utilizadas em grandes concentrações (Heng *et al.*, 2007; van Belkum, Martin-Visscher e Vederas, 2011).

Até a presente data, já foram descritas na literatura 13 bacteriocinas pertencentes a esta classe: acidocina B, amilociclina, aureociclicina 4185, butirivibriocina AR10, carnociclina A, circularina A, enterocina AS-48, enterocina AS-48RJ, garvicina ML, gassericina A, lactociclina Q, leucociclicina Q e uberolisina V (Gabrielsen *et al.*, 2014; Potter *et al.* 2014).

A classe é dividida em duas subclasses: IVa, peptídeos com *pIs* altos (~10), como, por exemplo, a enterocina AS-48, e IVb, peptídeos com *pIs* baixos (4-7), como, por exemplo, a gassericina A.

1.4.5 Classe V

Anteriormente, a subtilosina A se enquadrava na classe IV. Entretanto, na última década, a sua estrutura foi elucidada e observou-se que, fora o fato de ser uma molécula menor do que as demais bacteriocinas cíclicas, as suas modificações pós-traducionais são diferentes. O peptídeo apresenta três ligações-tioéter que se formam entre os enxofres de três resíduos de cisteína e os carbonos- α de duas fenilalaninas e de uma treonina (Kawulka *et al.*, 2003; Rea *et al.*, 2011). A partir desta elucidação, a subtilosina A saiu da classe IV e foi reclassificada no novo grupo dos “sactibióticos” ou “sactipeptídeos”. Desta forma, a classe V

é composta por peptídeos circulares (porém, menores) ou lineares, com uma ligação característica do grupamento tiol da cisteína com um carbono- α , mediada por modificações pós-traducionais (Mathur *et al.*, 2015; Coelho, Duarte e Bastos, 2017). Importante ressaltar que, diferentemente das bacteriocinas da classe I, onde as suas ligações-tioéter são formadas entre o enxofre e o carbono- β , as quais são comuns na natureza, as ligações-tioéter formadas entre o enxofre e o carbono- α são incomuns (Mathur *et al.*, 2015).

O seu modo de ação ainda não foi completamente elucidado, mas acredita-se que os peptídeos de classe V atuem de maneira similar às bacteriocinas das classes II e IV. Ou seja, a estrutura helicoidal anfipática desses peptídeos permite-lhes se inserir na membrana celular, promovendo despolarização da membrana e morte celular (Mathur *et al.*, 2015; Duarte 2016).

Coelho, Duarte e Bastos (2017) propuseram a classificação dos “sactibióticos” de acordo com a estrutura do peptídeo e o número de peptídeos que compõem a bacteriocina. Assim, a classe foi dividida em três subclasses: Va, composta por peptídeos lineares; Vb, composta por peptídeos cíclicos; e Vc, formada por “sactibióticos” compostos por dois peptídeos (**Quadro 1**).

1.5 Estafilococcinas

A primeira citação na literatura de um estafilococo com capacidade de produzir uma bacteriocina ocorreu em 1885, quando o pesquisador Babès observou a inibição de *Staphylococcus* spp. por outra estirpe de *Staphylococcus* spp. em meio sólido (*apud* Jack, Tagg e Ray, 1995). Em 1946, o pesquisador Frédéricq observou a produção de substâncias antimicrobianas por bactérias pertencentes a este gênero, que inibiam o crescimento de alguns estafilococos e de outras bactérias Gram-positivas, contudo, não apresentavam ação contra bactérias Gram-negativas. A partir destas observações, o termo estafilococcina foi criado (Bastos *et al.*, 2009).

As estafilococcinas, bacteriocinas produzidas pelo gênero *Staphylococcus*, têm a capacidade de inibir outras bactérias Gram-positivas, conferindo uma vantagem seletiva à estirpe produtora. Muitos desses peptídeos são codificados por plasmídeos e têm um conteúdo relativamente alto de ácidos aminados hidrofóbicos e básicos, resultando em uma alta afinidade por resinas de troca catiônica. Estas propriedades são úteis para a obtenção das bacteriocinas purificadas. A maior parte das bacteriocinas pertencentes a este grupo está localizada na classe I, os lantibióticos (Bastos *et al.*, 2009).

Quanto à sua produção, o máximo é, geralmente, obtido quando as estirpes produtoras

são cultivadas em meios ricos, principalmente em proteínas, como o caldo infusão de cérebro e coração [BHI (*Brain Heart Infusion*)] e o caldo triptona de soja [TSB (*Trypticase Soy Broth*)]. Outros parâmetros importantes para o melhor desempenho de produção são: a temperatura, que pode variar de 35 a 37 °C; os valores de pH do meio, que podem variar entre 6,5 e 8,0, e a fase do crescimento microbiano, onde, no fim da fase exponencial ou na fase estacionária, ocorre a maior produção do peptídeo (Bastos *et al.*, 2009).

A espécie mais estudada quanto à produção de bacteriocina é *S. epidermidis*. Na literatura, já foram descritos diversos peptídeos produzidos por esta espécie e os seus principais representantes são: Pep5, epidermina, epidermicina NI01, epilancina K7 e epidicina 280 (Bastos *et al.*, 2009; Sandiford e Upton, 2012). No **Quadro 2**, estão descritas algumas estafilococcinas já caracterizadas com relevância no atual trabalho.

O nosso grupo vem, ao longo dos anos, caracterizando diversas estafilococcinas, tais como: a nukacina 3299 (Ceotto *et al.*, 2010b); a aureociclicina 4185 (Potter *et al.*, 2014), a primeira bacteriocina cíclica descrita para o gênero *Staphylococcus* spp.; a hyicina 3682 (Fagundes *et al.*, 2011); a hyicina 4244 (Duarte, 2016), o primeiro "sactibiótico" cíclico descrito para o gênero *Staphylococcus* spp., e as aureocinas A53 (Netz *et al.*, 2002) e A70 (Netz *et al.*, 2001), as primeiras estafilococcinas de classe II descritas, as quais são as bacteriocinas de destaque nos estudos do laboratório.

1.6 Aplicação biotecnológica das bacteriocinas em alimentos

Nos últimos anos, os avanços tecnológicos na indústria de alimentos, em conjunto com as mudanças nos hábitos dos consumidores pela procura de produtos sem aditivos químicos, como nitratos, benzoatos e sorbatos, têm aumentado a demanda por biopreservativos alternativos que mantenham a atividade antimicrobiana com o objetivo de eliminar ou controlar o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes nos mais diversos tipos de alimentos e bebidas (Gálvez *et al.*, 2007, 2008). Outro ponto fundamental é a vida muito dinâmica nas grandes metrópoles, a qual leva a população a procurar alimentos menos processados (salada e *sushi*, entre outros) ou prontos para consumo (*ready-to-eat foods*), por não terem tempo de realizar as refeições com a devida calma (Newell *et al.*, 2010).

Um termo-chave para a qualidade dos alimentos é a biopreservação. O termo se refere à extensão da vida de prateleira (*shelf-life*) e ao aumento da segurança de alimentos pela aplicação de microrganismos e/ou de seus metabólitos com atividade antimicrobiana (Gálvez *et al.*, 2008).

Quadro 2. Estafilococcinas já caracterizadas com relevância no atual trabalho

ESTAFILOCOCCINA (CLASSE)	ESTIRPE PRODUTORA	MASSA MOLECULAR EM Da	TAMANHO (aa)	ELEMENTO GENÉTICO CODIFICADOR	GRUPAMENTO GENÉTICO	REFERÊNCIA
Epidermina (Classe I)	<i>S. epidermidis</i> Tü3298	2.164,6	22	pTü32 (54 kb)	<i>epiGEFHTABCDQP</i>	Schnell <i>et al.</i> , 1988
Estafilococcina C55 (Classe I)	<i>S. aureus</i> C55	3.339 (α) 2.993 (β)	21 24	pETB (~32 kb)	<i>sacaABAMITM2J</i>	Navaratna, Sahl e Tagg, 1998
Hycina 3682 (Classe I)	<i>S. hyicus</i> 3682	~ 2.135	22	pRJ109 (~54 kb)	<i>hyiABCDPFEG</i>	Fagundes, 2014
Nukacina 3299 (Classe I)	<i>S. simulans</i> 3299	2.957,3	27	pRJ97 (>27 kb)	<i>orf 1, IS257/431 e nukAMTFEGH</i>	Ceotto <i>et al.</i> , 2010b
Pep5 (Classe I)	<i>S. epidermidis</i> 5	3.488	34	pED503 (20 kb)	<i>pepTIAPBC</i>	Meyer <i>et al.</i> , 1995
Aureocina A53 (Classe II)	<i>S. aureus</i> A53	6.012	51	pRJ9 (10,4 kb)	<i>orf 7,8 e aucAIBIAEFG</i>	Netz, Bastos e Sahl, 2002; Nascimento <i>et al.</i> , 2012
Aureocina A70 (Classe II)	<i>S. aureus</i> A70	2.927 (AurA) 2.795 (AurB) 2.954 (AurC) 3.086 (AurD)	31 30 31 31	pRJ6 (7,9 kb)	<i>aurRIDCBAT</i>	Netz <i>et al.</i> , 2001; Coelho <i>et al.</i> , 2014

Quadro 2 (continuação). Estafilococcinas já caracterizadas com relevância no atual trabalho

ESTAFILOCOCCINA (CLASSE)	ESTIRPE PRODUTORA	MASSA MOLECULAR EM Da	TAMANHO (aa)	ELEMENTO GENÉTICO CODIFICADOR	GRUPAMENTO GENÉTICO	REFERÊNCIA
Lisostafina (Classe III)	<i>S. simulans</i> NRRL B- -2628	~ 27.000	246	pACK1 (~55,2 kb)	<i>lss e lif</i>	Bastos, Coutinho e Coelho, 2010
Aureociclicina 4185 (Classe IV)	<i>S. aureus</i> 4185	5.607	60	pRJ101 (11,7 kb)	<i>aclXBITCDAFGH</i>	Potter <i>et al.</i> , 2014
Hyicina 4244 (Classe V)	<i>S. hyicus</i> 4244	3.274	35	Cromossomo	<i>hyiSABCDEFGF</i>	Duarte, 2016

aa: ácidos aminados; Da: daltons; kb: quilobases

Na busca por biopreservativos alternativos que possam ser aplicados na cadeia produtiva da indústria alimentícia, as bacteriocinas mostram-se como potenciais candidatas. A partir dos estudos com as bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico (BAL), algumas propriedades foram estabelecidas como importantes para a sua aplicação, que são: (i) serem GRAS; (ii) não serem tóxicas para as células eucarióticas; (iii) serem inativadas por proteases digestivas para que não influenciem na microbiota intestinal; (iv) serem resistentes a uma ampla faixa de pH e temperatura; (v) terem um amplo espectro de ação que envolva patógenos e deteriorantes alimentares; e (vi) apresentarem os seus determinantes genéticos em plasmídeos para facilitar a manipulação genética (Gálvez *et al.*, 2007; Fagundes, 2014).

Inúmeros estudos nas últimas décadas mostraram que a aplicação das bacteriocinas nos alimentos e bebidas oferece diversos benefícios, tais como: (i) aumentar a vida de prateleira dos alimentos; (ii) prover uma proteção extra quando ocorrer quebra na cadeia de frio; (iii) diminuir o risco de transmissão de patógenos pela cadeia de produção; (iv) amenizar as perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos; (v) não comprometer a qualidade microbiológica por aplicar tratamentos térmicos menos intensos; e (vi) atender ao desejo dos consumidores por produtos com menos aditivos químicos (Robertson *et al.*, 2003; Cotter, Hill e Ross, 2005; Gálvez *et al.*, 2007).

As bacteriocinas podem ser aplicadas em alimentos de quatro diferentes formas: (i) adicionadas aos alimentos, na sua forma purificada ou parcialmente purificada, como aditivos alimentares que atuem aumentando a vida de prateleira; (ii) aplicadas a partir de um concentrado bruto, obtido pelo cultivo da cultura produtora em substratos alimentícios (leite ou soro), onde este preparado pode ser utilizado como aditivo ou ingrediente; (iii) através da sua produção *in situ* por culturas iniciadoras, adjuntas ou protetoras, bacteriocinogênicas, e (iv) imobilizadas nas embalagens de alimentos (Galvez *et al.*, 2007).

Essas metodologias alternativas têm como objetivo inibir o crescimento dos principais patógenos envolvidos em surtos alimentares, que são: *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* e *Bacillus cereus* (Brasil, 2016). Outra bactéria de fundamental importância no controle microbiológico é *L. monocytogenes*. Esta bactéria, além de ter a capacidade de crescer sob a temperatura de refrigeração (4 °C), pode causar a listeriose, que é uma doença letal para pacientes imunossuprimidos, gestantes e idosos, com índices de mortalidade próximos a 30% (Noordhout *et al.*, 2014).

A nisina, comercializada pela empresa *DuPont* com o nome de *Nisaplin*TM, vem sendo utilizada nos mais diversos tipos de alimentos, principalmente em queijos, pois apresenta um

amplo espectro de ação, como já apontado anteriormente (Cotter, Hill e Ross, 2005; Gálvez *et al.*, 2008). O sucesso de sua aplicação como biopreservativo ainda não foi repetido por nenhuma outra bacteriocina, mas isto fomenta, no meio acadêmico e no industrial, novas pesquisas para a descoberta e a caracterização de novos peptídeos com as mesmas qualidades da nisina.

A pediocina PA-1 é uma bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* que também é aplicada como biopreservativo de alimentos, principalmente em produtos cárneos. A empresa *Kerry Bio-Science* detém a patente desta bacteriocina e a comercializa com o nome de ALTA™ 2431. O produto apresenta atividade inibitória contra *L. monocytogenes* (Rodríguez, Martínez e Kok, 2002). Importante ressaltar que o peptídeo não apresentou atividade imunogênica frente a murinos e coelhos (Cleaveland, Laurenson e Taylor, 2001).

A mais recente adição ao mercado é a combinação das bacteriocinas: a cíclica carnociclina A, a carnobacteriocina BM1 e a piscicolina 126, as quais são produzidas pela estirpe *Carnobacterium maltaromaticum* UAL 307 (Martin-Visscher *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014). O seu nome comercial é Micocin® e é utilizada em alimentos cárneos com o objetivo de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*. Atualmente, este produto é comercializado nos Estados Unidos, no Canadá e em alguns países da América Latina (Martin-Visscher *et al.*, 2011; CanBiocin, 2016). A empresa dona da patente se chama *CanBiocin* e o destaque fica para o fato de todos os fundadores serem pesquisadores atuantes na área de segurança de alimentos e de caracterização de peptídeos antimicrobianos (CanBiocin, 2016).

Abaixo seguem alguns trabalhos, publicados nos últimos três anos, visando à aplicação de bacteriocinas na cadeia produtiva de alimentos. No **Quadro 3** também estão citados outros trabalhos relevantes na área.

Estudos realizados por Rivas e colaboradores (2014) mostraram que a bacteriocina sakacina Q, produzida pela estirpe *Lactobacillus curvatus* ACU-1, tem atividade antilistéria na superfície de carne suína cozida. Outras análises realizadas no trabalho mostraram que a adsorção do peptídeo aos tecidos e à gordura não comprometia a atividade da bacteriocina e que a purificação da sakacina Q é mais fácil, pois ela não se adere à célula produtora. Tais características corroboram a sua aplicação como biopreservativo.

Os estudos conduzidos por Kang e colaboradores (2014) mostraram que a combinação da nisina com sais orgânicos, lactato de potássio e diacetato de sódio, foi capaz de um controle antilistéria efetivo em salmão defumado resfriado. Esta combinação se mostrou mais efetiva do que a utilização da nisina em maiores concentrações, o que se mostra interessante para a indústria, pois pode representar uma economia no gasto com insumos.

Quadro 3 – Exemplos de algumas bacteriocinas com potencial aplicação como preservativos de alimentos

BACTERIOCINA	AÇÃO / POTENCIAL APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
Nisina	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade contra <i>S. aureus</i> em <i>sucuk</i>, uma salsicha fermentada turca - Aumento da atividade contra <i>S. aureus</i> em leite pasteurizado quando combinada com a endolisina LysH5 - Redução da velocidade de crescimento de <i>S. aureus</i> em queijo Minas frescal - Aumento da atividade contra <i>S. aureus</i> em leite quando combinada com óleo de perila 	<p>Hampikyan, 2009</p> <p>García <i>et al.</i>, 2010</p> <p>Felicio <i>et al.</i>, 2015</p> <p>Zhao <i>et al.</i>, 2016</p>
Hyicina 3682	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade contra <i>L. monocytogenes</i>, apresentando potencial aplicação como um biopreservativo 	Fagundes <i>et al.</i> , 2011
Sakacina Q	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade contra <i>L. monocytogenes</i> na superfície de carne suína cozida 	Rivas <i>et al.</i> , 2014
Nisina combinada a sais orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> - Controle efetivo de <i>L. monocytogenes</i> em salmão defumado resfriado 	Kang <i>et al.</i> , 2014
Enterocina AS-48 (combinada com o 2-nitro-1-propanol)	<ul style="list-style-type: none"> - Inativação e inibição de <i>S. aureus</i> em bebidas à base de aveia e soja 	Burgos <i>et al.</i> , 2015
Sonorensina	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade biopreservativa em carne de frango e tomate, revestidos de filmes de polietileno de baixa densidade contendo a bacteriocina, contra <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> - Atividade antibiofilme 	Chopra <i>et al.</i> , 2015
Bacteriocina SH01	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade contra <i>L. monocytogenes</i> na superfície de carne moída 	Kim, Jung e Kim, 2015
Aureocina A53	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade contra <i>L. monocytogenes</i> em leite desnatado, apresentando potencial aplicação como um biopreservativo 	Fagundes <i>et al.</i> , 2016a
Aureocina A70	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade contra <i>L. monocytogenes</i> em leite desnatado, apresentando potencial aplicação como um biopreservativo 	Fagundes <i>et al.</i> , 2016b

Chopra e colaboradores (2015) conduziram um estudo que teve como objetivo avaliar a eficiência da sonorensina, bacteriocina produzida pela estirpe *Bacillus sonorensis* MT93, como um agente antibiofilme e como biopreservativo em alimentos. Os resultados mostraram, quanto ao biofilme, que o peptídeo foi capaz de inibir a adesão e diminuir a viabilidade de células relacionadas à formação do mesmo. Já em relação à sua aplicação como biopreservativo, a adsorção ao filme de polietileno de baixa densidade (Low density polyethylene, LDPE) não inibiu a atividade da bacteriocina e os alimentos, carne de frango e tomate, revestidos por este filme bioativo tiveram a sua vida de prateleira estendida pela inibição dos microrganismos patogênicos e deteriorantes neles presentes.

Com o objetivo de investigar a atividade antilistéria da bacteriocina SH01, produzida pela estirpe *Enterococcus faecium* SH01, em carne moída a diferentes temperaturas, Kim, Jung e Kim (2015) verificaram que a sua atividade aumentava de uma maneira dependente de dose, ou seja, quanto maior a concentração do peptídeo, maior foi a inibição do patógeno. Os autores verificaram ainda que cerca de 50% da bacteriocina eram degradados pela ação de proteases intrínsecas à carne. Entretanto, ainda assim, o peptídeo foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano em 2,33 log UFC/g, à temperatura abusiva de 20 °C. Ao fim, os autores concluíram que esta nova bacteriocina pode ser uma excelente candidata a biopreservativo em produtos cárneos, principalmente carne moída.

O nosso grupo publicou, em 2016, um estudo que teve como objetivo avaliar a atividade antilistéria da aureocina A53, produzida pela estirpe *S. aureus* A53, em leite desnatado. Os testes realizados mostraram que: (i) a bacteriocina não apresentou toxicidade para as células eucarióticas testadas; (ii) não apresentou atividade hemolítica; (iii) teve uma grande estabilidade durante armazenamento sob diferentes temperaturas; (iv) apresentou sensibilidade aos sais biliares e ao suco gástrico sintético, sugerindo que o peptídeo não afetará a microbiota intestinal; e (v) a aureocina A53 foi capaz de reduzir a viabilidade celular da estirpe *L. monocytogenes* L12 em cerca de 7,0 unidades-log UFC/ml, após 7 dias de incubação a 4 °C, quando comparada ao controle (leite desnatado com o inóculo inicial do patógeno avaliado). Todos os resultados confirmaram a possível aplicação da aureocina A53 como biopreservativo de alimentos, representando uma viável alternativa à nisina em laticínios (Fagundes *et al.*, 2016a).

Por fim, mais recentemente, o nosso grupo publicou um artigo correlato ao trabalho de Fagundes e colaboradores (2016a) onde, foi avaliada a capacidade biopreservativa da aureocina A70 em leite desnatado. Os resultados obtidos tiveram diversas similaridades com

os resultados da aureocina A53 quanto: à toxicidade, à ação hemolítica, à estabilidade e à sensibilidade aos sais biliares e ao suco gástrico artificial. A aureocina A70 foi capaz de causar uma menor redução da viabilidade celular da estirpe *L. monocytogenes* L12 (5,5 unidades-log UFC/ml) do que a outra estafilococcina. Neste trabalho, também foi observado que a bacteriocina era capaz de se desorver da matriz de alginato/gelatina e era capaz de se manter adsorvida ao filme plástico de LPDE. Ambos os resultados corroboram para mostrar a versatilidade de aplicação deste peptídeo (Fagundes *et al.*, 2016b).

2. JUSTIFICATIVA

O nosso núcleo de pesquisa vem, há alguns anos, caracterizando diversas estafilococcinas, o que já culminou na descrição de uma grande diversidade de peptídeos. As estafilococcinas estudadas pelo nosso grupo (aureocinas A53 e A70, lisostafina, hyicinas 3682 e 4244, aureociclicina 4185 e Pep5, entre outras) têm, em sua maioria, um amplo espectro de ação, sendo capazes de inibir diversas bactérias patogênicas, tais como: *L. monocytogenes* e *S. aureus*, importantes patógenos alimentares; estafilococos e enterococos multirresistentes a drogas, importantes patógenos envolvidos em IRAS. Em trabalhos anteriores, algumas dessas estafilococcinas demonstraram uma potencial aplicação industrial como biopreservativos alimentares (Fagundes *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2013; Fagundes *et al.*, 2016a, 2016b), podendo, assim, ser empregadas no controle de bactérias deteriorantes de alimentos e/ou patogênicas transmitidas por alimentos. Portanto, aplicar essas bacteriocinas em queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio, como biopreservativos, poderia ser uma opção viável. A abordagem deste trabalho abre precedente para a aplicação industrial de novas bacteriocinas, no caso, estafilococcinas, em substituição a outros conservantes alimentares, o que poderá culminar em produtos mais saudáveis e, em alguns casos, na redução do custo de produção.

3. OBJETIVO, METAS E FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

3.1 Objetivo geral

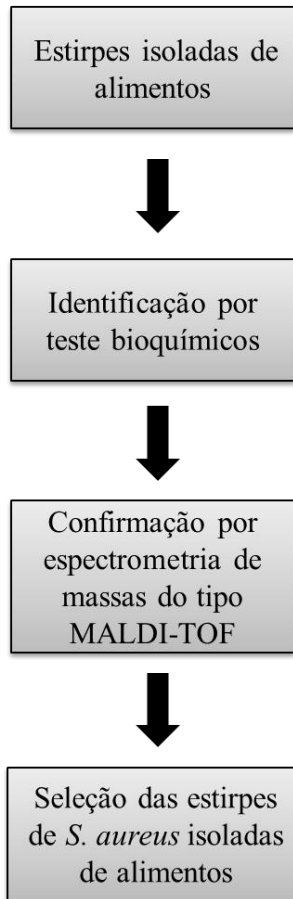
O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de estafilococcinas contra estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, visando à potencial utilização industrial desses peptídeos na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio. Para isso, as seguintes metas foram traçadas:

3.2 Metas

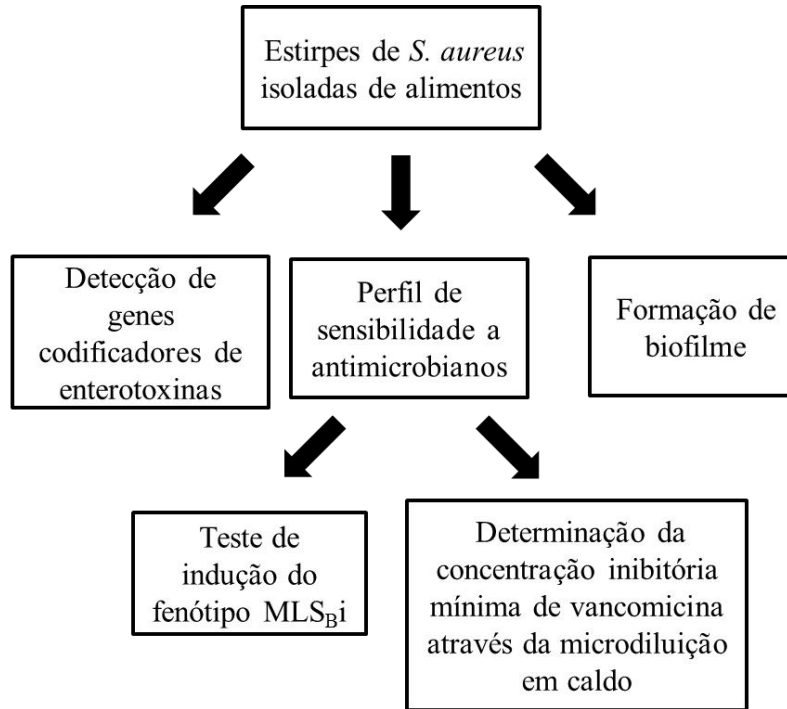
- Identificar a nível de espécie 15 estirpes bacterianas, previamente isoladas de alimentos, através de testes bioquímicos e por espectrometria de massas de tipo *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF) para selecionar apenas aquelas que fossem *S. aureus*;
- Verificar a presença de genes codificadores das enterotoxinas clássicas e de algumas não-clássicas no genoma das estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos;
- Verificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos no genoma das estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos;
- Verificar a produção de biofilme pelas estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos;
- Avaliar a sensibilidade das estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos frente às estafilococcinas, pelo teste de difusão em ágar, para se selecionar apenas aquelas substâncias que apresentassem as melhores atividades inibitórias;
- Avaliar o modo de ação das estafilococcinas escolhidas, parcialmente purificadas, frente às estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos e
- Verificar a estabilidade e a eficácia dessas estafilococcinas em matriz de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio, contaminados com *S. aureus* isolados de alimentos.

3.3 Fluxograma experimental

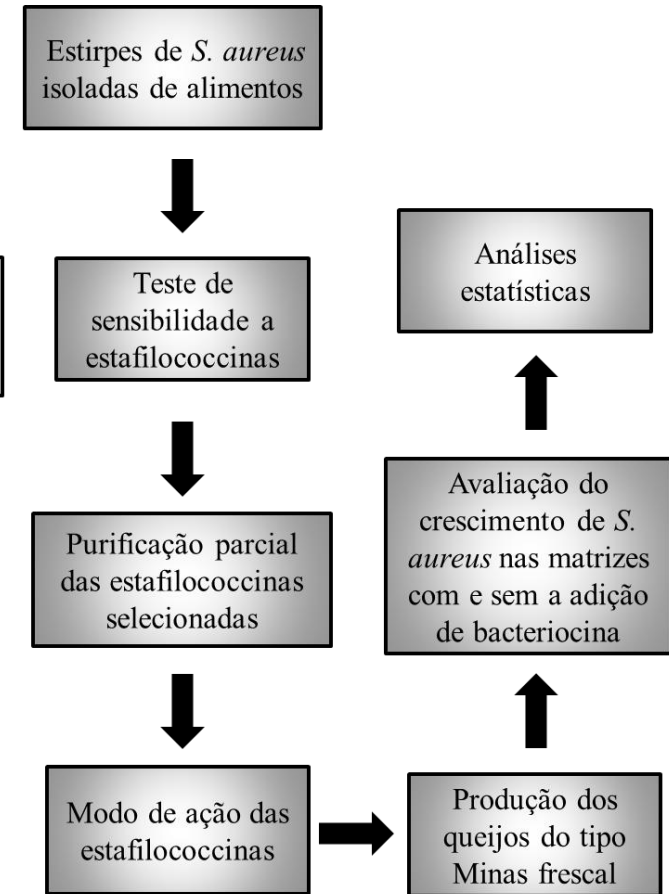
Identificação das estirpes



Caracterização fenotípica



Testes com estafilococcinas



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estirpes bacterianas e meios de cultura

Neste trabalho, foram empregadas 15 estirpes bacterianas Gram-positivas, previamente isoladas em nosso laboratório, na busca por *Staphylococcus* spp. a partir de alimentos (**Quadro 4**). As estirpes obtidas a partir de queijo foram designadas com a letra Q, enquanto que as estirpes isoladas a partir de linguiça foram designadas com a letra L.

As estirpes produtoras de estafilococcinas utilizadas no presente trabalho estão descritas no **Quadro 5**. As estirpes bacterianas que foram utilizadas como controles em experimentos e as suas condições de crescimento estão descritas no **Quadro 6**. A estirpe *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (**Quadro 6**), sabidamente sensível à ação da maioria das estafilococcinas já descritas, foi utilizada como indicadora da produção de estafilococcina.

Os meios de cultura empregados foram:

- TSB: (*Difco*) em caldo, acrescido de 40% (v/v) de glicerol (*Merck*), para estocagem a -20 °C das estirpes utilizadas neste trabalho, e sólido (TSA) [acrescido de ágar (*Vetec*) a 1,5% (p/v)];
- BHI: (*Difco*) em caldo, semissólido [acrescido de ágar a 0,7% (p/v)] e sólido [acrescido de ágar a 1,5% (p/v)];
- MS: Ágar-Manitol Salgado (BBL);
- LB: Caldo *Luria-Bertani* [10,0 g de triptona (*Micromed*); 5,0 g de extrato de levedura (*HiMedia*); 5,0 g de NaCl (*Reagen*) e água bidestilada q.s.p. 1 l; pH 7,0 ± 0,2];
- DNase-ágar: *DNase Test Agar* (*Acumedia*);
- Caldo *Clark-Lubs* [7,0 g de peptona (*Vetec*); 5,0 g de glicose (*Reagen*); 5,0 g de KH₂PO₄ (*Reagen*) e água bidestilada q.s.p. 1 l; pH 7,0 ± 0,2];
- Ágar *Müeller-Hinton* (*Difco*) e
- Ágar *Baird-Parker* (*Interlab*).

Quadro 4. Estirpes bacterianas isoladas de alimentos utilizadas neste trabalho

ESTIRPES ISOLADAS DE ALIMENTOS	ORIGEM
Q1 Q2	Queijo Minas
QMU1	Queijo Muçarela
QRHF1 QRHF2 QRHF3	Queijo Parmesão Ralado
QJ1 QJ2 QJ3	Queijo
LF1 LF2 LF3 LF4 LF5 LF6	Linguiça a Granel

Quadro 5. Estirpes de *Staphylococcus* spp. produtoras de bacteriocinas utilizadas neste trabalho

ESTIRPE PRODUTORA	CARACTERÍSTICA / PLASMÍDEO	REFERÊNCIA
<i>Staphylococcus aureus</i> A53	Produtora da aureocina A53/pRJ9	Giambiagi-deMarval <i>et al.</i> , 1990
<i>S. aureus</i> A70	Produtora da aureocina A70/pRJ6	Giambiagi-deMarval <i>et al.</i> , 1990
<i>S. aureus</i> 4185	Produtora da aureocina 4185 e da aureociclicina 4185 /pRJ101	Ceotto <i>et al.</i> , 2010a; Potter <i>et al.</i> , 2014
<i>S. aureus</i> MB50	Produtora das aureocinas A53 e A70/pRJ6 e pRJ22	Araújo e Bastos, 1995
<i>S. aureus</i> C55	Produtora da estafilococcina C55/pET-B	Navaratna, Sahl e Tagg, 1998
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tü3298	Produtora da epidermina/pTü32	Allgaier <i>et al.</i> , 1986
<i>S. epidermidis</i> 5	Produtora da Pep5/pED503	Sahl e Brandis, 1981
<i>Staphylococcus hyicus</i> 3682	Produtora da hyicina 3682/pRJ109	Fagundes <i>et al.</i> , 2011
<i>S. hyicus</i> 4244	Produtora da hyicina 4244	Duarte <i>et al.</i> , 2013
<i>S. hyicus</i> 5580	Produtora da estafilococcina 5580	Duarte <i>et al.</i> , 2013
<i>Staphylococcus simulans</i> 3299	Produtora da nukacina 3299/pRJ97	Ceotto <i>et al.</i> , 2010b
<i>S. simulans</i> NRRL B-2628	Produtora de lisostafina/pRG5	Recsei, Gruss e Novick, 1987

Quadro 6. Estirpes bacterianas utilizadas como controles em experimentos e suas condições de crescimento

ESTIRPES BACTERIANAS	APLICAÇÃO EXPERIMENTAL / FENÓTIPO RELEVANTE	ORIGEM / REFERÊNCIA
<p><i>S. aureus</i> ATCC 13565</p> <p><i>S. aureus</i> ATCC 14458</p> <p><i>S. aureus</i> ATCC 19095</p> <p><i>S. aureus</i> ATCC 23235</p> <p><i>S. aureus</i> ATCC 27664</p>	<p>Produtora da SEA</p> <p>Produtora da SEB</p> <p>Produtora das SEC, SEG, SEH e SEI</p> <p>Produtora das SED, SEG, SEI e SE/J</p> <p>Produtora das SEE, SEG, SEI e SE/J</p>	<p>ATCC</p> <p>ATCC</p> <p>ATCC</p> <p>ATCC</p> <p>ATCC</p>
<p><i>S. aureus</i> A70</p> <p><i>S. aureus</i> ATCC 25923</p> <p><i>S. aureus</i> ATCC 25213</p> <p><i>S. epidermidis</i> 5</p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</p> <p><i>Enterococcus faecium</i> E86</p> <p><i>M. luteus</i> ATCC 4698</p>	<p>Controle positivo da produção de catalase, de coagulase, de lecitinase e de DNase, e de fermentação de manitol</p> <p>Controle do antibiograma</p> <p>Controle do teste de determinação da CIM</p> <p>Controle negativo da produção de coagulase, de lecitinase e de DNase, e de fermentação de manitol</p> <p>Controle positivo para a produção de acetoina</p> <p>Controle negativo para a produção de catalase</p> <p>Indicadora da produção de bacteriocina</p>	<p>LGM¹</p> <p>ATCC</p> <p>ATCC</p> <p>Sahl e Brandis, 1981</p> <p>ATCC</p> <p>LGM¹</p> <p>ATCC</p>
<p><i>Escherichia coli</i> DH5α</p>	<p>Controle negativo para a produção de acetoina e estirpe calibradora da espectrometria de massas</p>	<p>Sambrook, Fritish e Maniatis, 1989</p>

ATCC: American Type Culture Collection; LGM¹: Laboratório de Genética Molecular, UFRJ; SEA: enterotoxina estafilocócica A; SEB: enterotoxina estafilocócica B; SEC: enterotoxina estafilocócica C; SED: enterotoxina estafilocócica D; SEE: enterotoxina estafilocócica E; SEG: enterotoxina estafilocócica G; SEH: enterotoxina estafilocócica H; SEI: enterotoxina estafilocócica I; SE/J: tipo-enterotoxina estafilocócica J.

4.2 Identificação das estirpes isoladas de alimentos

4.2.1 Testes bioquímicos

A fim de se identificar as estirpes isoladas de alimentos, visando-se selecionar *S. aureus* para os testes subsequentes, foram realizados alguns testes para se verificar a produção e/ou o metabolismo de certos compostos (fermentação de manitol, produção da coagulase, produção da enzima catalase, produção da enzima DNase e produção de acetoina), característicos desta espécie (Bannerman e Peacock, 2007). Para estes testes, quando não especificado, foram utilizados, como controles positivo e negativo, as estirpes *S. aureus* A70 e *S. epidermidis* 5 (**Quadro 6**), respectivamente. Todos os testes foram feitos em triplicata, para garantir uma maior confiabilidade dos resultados.

4.2.1.1 Produção da enzima catalase

As estirpes isoladas de alimentos foram crescidas a 37 °C por 18 h, em meio TSA, a fim de se obter colônias isoladas. Uma colônia de cada estirpe foi transferida para uma lâmina de vidro, previamente limpa, e, sobre a lâmina, foi acrescida uma gota de peróxido de hidrogênio [Musa; a 3% (v/v)]. Foram utilizadas, como controles positivo e negativo, as estirpes *S. aureus* A70 e *E. faecium* E86, respectivamente. Onde houve a produção da enzima, o peróxido de hidrogênio foi hidrolisado e ocorreu a produção de bolhas de O₂, visivelmente observadas (Koneman, 2008).

4.2.1.2 Produção de coagulase

Para o teste da produção de coagulase, foi utilizado plasma de coelho liofilizado [Coagu-Plasma (Laborclin)] reconstituído com solução salina [NaCl a 0,85% (p/v)]. Foram distribuídos, em tubos estéreis, 0,3 ml da solução e, com o auxílio de uma alça estéril, foram transferidas, para estes tubos, cinco colônias previamente crescidas a 37 °C por 18 h em placa contendo o meio TSA. O plasma reconstituído, já acrescido da estirpe, foi incubado em banho-maria a 37 °C por 24 h e, posteriormente, foi observada ou não a formação do coágulo, característica de algumas espécies do gênero *Staphylococcus* (Koneman, 2008).

4.2.1.3 Produção de acetoina

A fim de se verificar se as estirpes isoladas de alimentos são capazes de produzir acetoina através da fermentação butileno-glicólica, foi realizado o teste de *Voges-Proskauer*. A partir de placas contendo o meio TSA, com o crescimento de cada estirpe, cinco colônias foram retiradas e transferidas, por meio de uma alça previamente flambada, para tubos contendo 3 ml do caldo *Clark-Lubs*. Estes tubos foram incubados a 37 °C por 48 h e, logo após, foram acrescentados dois reativos aos tubos: 600 µl do reativo A [α -naftol (*Sigma-Aldrich*), 5% (p/v), preparado em álcool absoluto (*Reagen*)] e 200 µl do reativo B [KOH, 40% (p/v), preparado em água bidestilada]. Em seguida, os tubos foram agitados ocasionalmente por 30 min e, só então, foi feita a leitura: em caso positivo, o meio apresentou uma coloração vermelha. Em caso negativo, o meio se apresentou com a cor marrom (Koneman, 2008).

Para este teste, foram utilizadas, como controles positivo e negativo, as estirpes *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* DH5 α , respectivamente.

4.2.1.4 Fermentação de manitol

Para se verificar a capacidade de fermentação do manitol pelas estirpes isoladas de alimentos, estas foram previamente crescidas em placas contendo o meio TSA, a 37 °C por 18 h e, só então, estas estirpes foram semeadas em placa contendo o meio MS. As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C e a leitura dos resultados foi feita após este tempo. As estirpes que foram capazes de fermentar o manitol, o que levou à produção de ácidos, acidificaram o meio, mudando-o de coloração (amarelo) devido ao indicador de pH, vermelho de fenol. Para as estirpes que não fermentaram o manitol, o meio permaneceu da cor inicial (vermelha) (Koneman, 2008).

4.2.1.5 Produção de DNase

A enzima DNase, responsável por hidrolisar DNA, pode ser produzida por várias espécies de *Staphylococcus*. Por isso, as estirpes isoladas de alimentos foram testadas quanto à capacidade de produção desta enzima. As estirpes foram previamente crescidas em placas contendo o meio TSA, a 37 °C por 18 h e, só então, essas estirpes foram semeadas em placa

contendo o meio DNase-ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h e, após este período, as placas foram expostas a uma solução de ácido clorídrico a 2% (v/v), preparado em água, para a revelação. A produção de DNase foi verificada através da presença de um halo transparente em torno do crescimento bacteriano (Koneman, 2008)

4.2.1.6 Produção de lecitinase

Para se verificar a capacidade de produção desta enzima pelas estirpes isoladas de alimentos que deram resultados positivos em todos os outros testes, estas foram previamente crescidas em placas contendo o meio TSA, a 37 °C por 18 h e, só então, foram semeadas em placa contendo o meio *Baird-Parker*. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C e a leitura dos resultados foi feita após este tempo. Para as estirpes capazes de produzir lecitinase, foi observada a formação de halo opaco em torno do crescimento bacteriano (Koneman, 2008).

4.2.2 Identificação das estirpes por espectrometria de massas do tipo *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF)

A confirmação da identificação de todas as estirpes isoladas de alimentos como *S. aureus*, sendo estas aquelas que deram resultados positivos para todos os testes bioquímicos, foi realizada por espectrometria de massas através da tecnologia de MALDI-TOF, a partir de colônias isoladas.

Uma pequena porção do crescimento microbiano de 18 h de cada estirpe crescida em meio TSA (10^5 células) foi depositada na placa metálica, a qual vem junto com o equipamento. A placa contendo as amostras foi mantida em fluxo laminar até que ocorresse a completa secagem do material depositado. As amostras foram sobrepostas com 1 μ l da solução de matriz composta de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA – *Sigma-Aldrich*), diluído em acetonitrila 50% (v/v), e de ácido trifluoroacético a 2,5% (v/v) (*Sigma-Aldrich*), e esta foi cristalizada por uma secagem no fluxo laminar, à temperatura ambiente. Como estirpe-controle da análise e do controle de processamento das amostras, foi empregada *E. coli* DH5 α , a qual foi processada da mesma maneira que as demais estirpes. Após os processos descritos, a placa metálica foi inserida no equipamento para que ocorressem as leituras das amostras. As análises foram realizadas pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF LT *MicroflexBruker* (*Bruker Daltonics*), equipado com laser de nitrogênio de comprimento de onda de 337 nm, no modo linear, onde foram observados os seguintes

parâmetros: frequência do laser a 20 Hz; voltagens das fontes iônicas 1 e 2, 20 kV e 18,6 kV, respectivamente, e faixa de massa molecular de 2.000 – 20.000 Da (Ayeni *et al.*, 2015). Os resultados foram coletados e analisados pelo programa computacional *Biotyper 3.1* (Bruker *Daltonics*), no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (IMPG, UFRJ). Os testes foram realizados em triplicata.

4.3 Caracterização fenotípica das estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos

4.3.1 Detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas

4.3.1.1 Extração de DNA genômico das estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos

O DNA total das estirpes foi obtido pelo método de extração com tiocianato de guanidina, conforme descrito por Pitcher, Saunders e Owen (1989), com modificações. As estirpes bacterianas foram previamente crescidas a 37 °C por 18 h, em 3 ml de meio TSB, sob agitação a 120 rpm (na incubadora de bancada Cientec CT-712). Um novo crescimento das estirpes foi realizado através da diluição 1:100 das culturas em meio TSB fresco. Logo após, as mesmas foram incubadas por apenas 6 h, sob agitação (120 rpm), à mesma temperatura. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 8.000 xg por 5 min em centrífuga *Centrifuge 5415 R* (Eppendorf) e o sobrenadante, desprezado. O sedimento resultante foi lavado em 1 ml de tampão TE 1X (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM; pH 7,8). A suspensão celular foi novamente centrifugada a 8.000 xg por 5 min e o sobrenadante foi novamente desprezado. Logo após, o material foi suspenso em 100 µl de tampão TE 1X contendo lisozima (*Sigma-Aldrich*; 1 mg/ ml), RNase (*Sigma-Aldrich*; 1 mg/ ml, preparada em tampão Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, e NaCl 15 mM) e Brij 35 [0,5% (v/v); *Sigma-Aldrich*]. Esta suspensão foi incubada a 37 °C por 2 h. Decorrido este tempo, foram adicionados 500 µl de tiocianato de guanidina 5 M (*Promega*), preparado em água. O microtubo foi agitado manualmente e incubado à temperatura ambiente por 7 min. Posteriormente, o lisado celular foi mantido no gelo por 10 min e 250 µl de acetato de amônio (*Merck*) 7,5 M gelado foram adicionados. O microtubo foi invertido cinco vezes (para a homogeneização) e incubado no gelo por 10 min. Depois disso, foram adicionados 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico [24:1 (v/v), *Merck*] gelado. Uma nova e vigorosa agitação manual foi realizada e, logo após, o material foi centrifugado a 12.500 xg por 12 min. A fase aquosa formada foi transferida para

um novo microtubo e o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol (*Merck*) gelado. A solução foi gentilmente invertida até a visualização de um precipitado branco fibroso. Uma nova centrifugação a 13.000 xg por 5 min foi realizada, sendo o sobrenadante desprezado. O sedimento resultante foi lavado uma vez com 1 ml de etanol [70% (v/v); *Merck*] gelado, seguido de uma centrifugação a 13.000 xg por 1 min. Por fim, o sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento foi secado e dissolvido em 50 µl de água ultrapura estéril. O DNA obtido foi mantido a 4 °C, até o momento do uso.

A dosagem do DNA presente na solução resultante foi realizada no aparelho *NanoDrop Lite Spectrophotometer*® (*Thermo Fisher Scientific, Inc*), aplicando-se 1 µl da solução. A leitura foi realizada no modo para quantificação *dsDNA* (DNA de fita dupla).

4.3.1.2 Detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas no genoma das estirpes

Estes experimentos foram realizados como descrito por Johnson e colaboradores (1991) e Arcuri e colaboradores (2010), com algumas adaptações, com o objetivo de se identificar, nas estirpes de *S. aureus*, genes codificadores das enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) e de algumas não-clássicas (SEG, SEH, SEI e SEIJ), respectivamente. Esta detecção foi feita através de PCR, tendo como alvo os genes codificadores das enterotoxinas descritas acima. Para isso, foi empregado um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene codificador da enterotoxina investigada (**Quadro 7**) e, como controles positivo e negativo da reação, o DNA genômico das estirpes que, sabidamente, apresentam ou não o referido gene (**Quadro 6**).

Cada reação de PCR continha os seguintes componentes: 50 ng das preparações de DNA genômico das estirpes; 2,5 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos-trifosfato; 1,5 mM de MgCl₂ (*Merck*; preparado em água); 25 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (**Quadro 7**); 1X tampão de reação de PCR (*Thermo Fisher Scientific, Inc*); formamida (*Merck*; 1µl/reação); 0,5 U de *Taq* DNA-polimerase (*Thermo Fisher Scientific, Inc*) e água bidestilada q.s.p. 20 µl.

As reações de amplificação de DNA foram realizadas no termociclador *MasterCycler*® *Nexus* (*Eppendorf*). O ciclo térmico para as cinco enterotoxinas clássicas foi formado por uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 2 min, uma fase de anelamento a 55 °C por 1 min e uma fase de extensão a 72 °C por 1

Quadro 7. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a detecção dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas

GENE-ALVO DA AMPLIFICAÇÃO (ENTEROTOXINA CODIFICADA)	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	<i>t_m</i> (°C)	TAMANHO DO AMPLICON ESPERADO	REFERÊNCIA	
<i>sea</i> (SEA)	SEA-1 5' TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA 3'	46	120 pb	Johnson <i>et al.</i> , 1991	
	SEA-2 5' GAACCTTCCCATCAA AAA CA 3'	48			
<i>seb</i> (SEB)	SEB-1 5' TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG 3'	50	478 pb		
	SEB-2 5' GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC 3'	52			
<i>sec</i> (SEC)	SEC-1 5' GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT 3'	44	257 pb		
	SEC-2 5' AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC 3'	44			
<i>sed</i> (SED)	SED-1 5' CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT 3'	46	317 pb		
	SED-2 5' TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG 3'	44			
<i>see</i> (SEE)	SEE-1 5' TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC 3'	42	170 pb		
	SEE-2 5' TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC 3'	52			
<i>seg</i> (SEG)	SEG-F 5' ACG TCT CCA CCT GTT GAA GG 3'	54	400 pb		Arcuri <i>et al.</i> , 2010
	SEG-R 5' TGA GCC AGT GTC TTG CTT TG 3'	52			
<i>seh</i> (SEH)	SEH-F 5' TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG 3'	50	357 pb		
	SEH-R 5' TAG CAC CAA TCA CCC TTT CC 3'	52			
<i>sei</i> (SEI)	SEI-F 5' TGG AAC AGG ACA AGC TGA AA 3'	50	467 pb		
	SEI-R 5' TAA AGT GGC CCC TCC ATA CA 3'	52			
<i>selJ</i> (SELJ)	SELJ-F 5' CAG CGA TAG CAA AAA TGA AAC A 3'	49	426 pb		
	SELJ-R 5' TCT AGC GGA ACA ACA GTT CTG A 3'	53			

pb: pares de bases; *t_m*: temperatura de desnaturação média. Os oligonucleotídeos utilizados nestes testes foram sintetizados pela empresa *Life Technologies* do Brasil.

min, e, após os ciclos, uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min. Já para as quatro enterotoxinas não-clássicas, o ciclo térmico foi formado por uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C por 30 s, uma fase de anelamento a 57 °C por 30 s e uma fase de extensão a 72 °C por 30 s, e, após os ciclos, uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min.

Os produtos obtidos nessas reações foram submetidos à eletroforese de DNA em gel de agarose (*Sigma-Aldrich*) a 1,4% (p/v), preparado em tampão TAE 1X (Tris/acetato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 8,4) (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989), utilizando-se como marcador de tamanho molecular *100-bp DNA ladder* (Sinapse Inc.). Foram aplicados, no gel de agarose, 10 µl de cada produto de PCR acrescidos de 2,5 µl de corante para eletroforese [glicerol 50% (v/v); azul de bromofenol 0,02% (p/v); xilenocianol 0,02% (p/v) e EDTA 10 mM, pH 7,5]. As corridas eletroforéticas ocorreram a 70 V, por 30 min a 1 h e em tampão TAE 1X.

A coloração do gel foi feita pela imersão em uma solução de brometo de etídeo (*Sigma-Aldrich*; 1µg/ ml, preparada em água destilada) por aproximadamente 20 min e, em seguida, o gel foi imerso em água destilada durante 30 min. O gel, depois de corado e lavado, foi exposto à luz ultravioleta a 260 nm, emitida por um aparelho transiluminador (*VilberLourmat*), e a imagem do gel foi registrada por um sistema de imagens (*VilberLourmat DP-001-SD*). O programa de imagens *Photo-Capt* foi utilizado para a observação da imagem registrada, permitindo a análise dos fragmentos de DNA amplificados por PCR (*amplicons*).

4.3.2 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos

A metodologia que foi utilizada para o teste de antibiograma foi aquela recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). As estirpes isoladas de alimentos foram previamente semeadas em placas contendo o meio TSA, por 18 h a 37 °C, a fim de se obter colônias isoladas. Posteriormente, algumas colônias foram suspensas em 3 ml de solução salina, até a obtenção da turvação de 0,5 da escala de McFarland (padrão este que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/ ml). Estas suspensões foram passadas com um *swab* sobre placas (90 x 20 mm) contendo 20 ml de meio *Müller-Hinton* sólido, para que as estirpes formassem um tapete de células. Os discos contendo os antibióticos, listados no **Quadro 8**, foram depositados sobre o meio, já inoculado com as estirpes em questão, com a distância mínima de 25 mm entre eles. As placas foram, então, incubadas por 18 h, a 37 °C. Para a leitura dos

resultados de sensibilidade das estirpes à cefoxitina, as placas foram incubadas por 24 h. Após a incubação, os halos de inibição formados foram medidos e comparados com os dados de referência do CLSI (2015), com o intuito de se verificar se as estirpes isoladas de alimentos seriam resistentes a algum dos antimicrobianos testados. A estirpe-controle utilizada no teste foi *S. aureus* ATCC 25923.

Quadro 8. Antimicrobianos utilizados no antibiograma e as suas respectivas concentrações

ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO
Amicacina	30 µg
Ampicilina	10 µg
Cefotaxima	30 µg
Ceftazidima	30 µg
Ciprofloxacina	5 µg
Clindamicina	2 µg
Cloranfenicol	30 µg
Eritromicina	15 µg
Gentamicina	10 µg
Imipenem	10 µg
Penicilina G	10 U
Rifampicina	5 µg
Sulfozotrim	25 µg
Tetraciclina	30 µg
Tobramicina	10 µg
Vancomicina	30 µg

Marca: Laborclin; U – unidade.

4.3.3 Teste de presença do fenótipo MLS_Bi (Teste D)

No gênero *Staphylococcus*, um dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos da classe dos macrolídeos consiste na modificação do seu alvo ribossômico na subunidade 50S, o que também afeta a ligação de lincosamidas e estreptogramina B, caracterizando a resistência MLS_B. A expressão desta resistência pode ser induzível (MLS_Bi) ou constitutiva (MLS_{BC}), podendo ser codificada pelos genes *ermA* (*erythromycin ribosome methylase*) e *ermC* (Mahesh, Ramakant e Jagadeesh, 2013). Desta forma, identificar o tipo de resistência MLS_B é fundamental para que a terapia com antimicrobianos seja eficiente, uma vez que infecções causadas por estirpes de *Staphylococcus* spp. com resistência induzível e que forem tratadas com clindamicina podem levar à seleção de mutantes *erm* constitutivos, resultando em falha terapêutica (Prabhu, Rao e Rao, 2011).

Com o objetivo de se identificar a presença do fenótipo MLS_B_i, o teste foi realizado conforme a metodologia proposta no item 4.3.2, entretanto, o disco contendo 2 µg de clindamicina foi colocado a uma distância de 15 mm da borda de um disco contendo 15 µg de eritromicina. A interpretação do resultado foi dada pela distorção, ou não, do halo de inibição da clindamicina, o qual teria um formato de "D", caso o fenótipo MLS_B_i estivesse presente na estirpe.

4.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima para vancomicina através de microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada conforme descrito pelo CLSI (2015) e foi determinada para as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos. As diluições de vancomicina (*Sigma-Aldrich*) foram feitas em caldo *Mieller-Hilton* com concentrações entre 0,0625 a 64 µg/ml. Dentro de cada poço da placa de microdiluição de poliestireno de 96 poços (TPP® 92096), foram adicionados 200 µl do meio contendo o antimicrobiano diluído. Para o preparo do inóculo bacteriano das estirpes-alvo, foram utilizadas estirpes crescidas a 37 °C durante 18 h, em meio TSA. Quantidade suficiente do crescimento bacteriano foi utilizada na preparação de uma suspensão correspondente a 0,5 da escala de MacFarland e esta foi posteriormente diluída na proporção 1:10 (v/v) em salina estéril. Só então, 10 µl da suspensão bacteriana foram adicionados aos poços contendo o antimicrobiano. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 24 h. Após este tempo, a leitura foi realizada visualmente, onde a CIM correspondeu à diluição bacteriana na qual não foi observada turvação ou a formação de um “botão”, de acordo com os valores preconizados pelo CLSI (2015). A cepa *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle de sensibilidade. Os experimentos foram realizados em triplicata para que os resultados fossem validados.

4.3.5 Formação de biofilme

Com o objetivo de se verificar a formação de biofilme pelas estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, estas estirpes foram cultivadas, separadamente, em 3 ml de meio TSB, a 37 °C por 18 h e, então, essas suspensões foram diluídas 100 vezes também em meio TSB. As suspensões diluídas foram distribuídas em três poços de uma placa de microdiluição de 96 poços, em um volume final de 200 µl. Após incubação por 18 h a 37 °C, as suspensões foram

descartadas e os poços foram lavados três vezes com 200 μl de água destilada. A placa secou em forno de secagem, a uma temperatura de 50 °C por 1 h e, em seguida, cada poço foi corado com 200 μl da solução de cristal violeta a 0,1% (*Isofar*, p/v; preparado em água destilada) por 1 h. Após este período, a solução de cristal violeta foi descartada, os poços foram lavados com 200 μl de água destilada e, então, a placa secou à temperatura ambiente por 1 h. Para a solubilização do corante, a placa permaneceu por 30 min, sem agitação, sobre a bancada, após a adição de 200 μl de uma solução de etanol [*Merck*; 80% (v/v)] e acetona [*Merck*; 20% (v/v)] a cada poço. A leitura da DO₅₇₀ foi feita no leitor de absorvância *ELx800TM* (*BioTek*). Este experimento foi realizado em triplicata e, em cada réplica, foram utilizados três poços por estirpe (Potter *et al.*, 2009). De acordo com as leituras de DO obtidas, os resultados foram analisados segundo os critérios propostos por Stepanović e colaboradores (2007). Foi calculado o valor de corte (VC) baseado na DO do branco: DO média do meio (sem crescimento microbiano), acrescida de três vezes o valor do desvio-padrão. A DO média de cada amostra foi calculada e, com esses valores, as estirpes foram classificadas quanto à formação de biofilme, de acordo com os critérios apresentados no **Quadro 9**.

Quadro 9. Critérios usados para a classificação das estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos quanto à formação de biofilme

MÉDIA DOS VALORES DE DO ₅₇₀	CLASSIFICAÇÃO
DO \leq VC	Não-produtora
VC < DO \leq 2x VC	Produtora fraca
2x VC < DO \leq 4x VC	Produtora moderada
DO > 4x VC	Produtora forte

VC: valor de corte

4.4 Teste de sensibilidade a estafilococcinas por difusão em ágar

A fim de se determinar a ação das estafilococcinas sobre as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, foi empregado o método de difusão em ágar conforme descrito por Giambiagi-deMarval e colaboradores (1990). As estirpes foram crescidas em 3 ml de caldo TSB e incubadas a 37 °C por 18 h. Após este período, 5 μl das suspensões foram dispensadas, na forma de pontos, sobre uma placa contendo 20 ml de meio BHI sólido e, a seguir, esta placa foi incubada a 37 °C por 18 h. Após a incubação, os crescimentos foram expostos a vapores de clorofórmio (*Merck*) por 30 min, para que as células fossem mortas. A estirpe

indicadora *M. luteus* ATCC 4698 foi previamente crescida em 3 ml de caldo TSB, por 18 h a 37 °C, e uma alíquota de 300 µl desta suspensão foi inoculada em 3 ml de meio TSB semissólido que, então, foi vertido sobre a placa contendo os pontos de crescimento das estirpes bacterianas não mais viáveis. Já para as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, previamente crescidas em 3 ml de caldo TSB por 18 h a 37 °C, uma alíquota de 30 µl destas suspensões foi inoculada em 3 ml de meio TSB semissólido que, então, foram vertidos sobre a placa contendo os pontos de crescimento das estirpes bacterianas não mais viáveis. Após a adição da estirpe-alvo, o sistema foi incubado por 18 h a 37 °C. Em seguida, a leitura dos resultados foi realizada, observando-se a formação ou não de halos de inibição do crescimento da estirpe-alvo e, em caso de inibição, a aferição do tamanho dos halos em mm. A técnica foi realizada em triplicata.

4.5 Purificação parcial das estafilococcinas selecionadas

As estafilococcinas com o mais amplo espectro de ação, selecionadas a partir dos resultados do teste de sensibilidade a estafilococcinas por difusão em ágar, foram parcialmente purificadas pela precipitação com sulfato de amônio a 65% de saturação e através de cromatografia de troca catiônica (Ceotto *et al.*, 2010b).

4.5.1 Obtenção das estafilococcinas a partir de precipitação com sulfato de amônio

As estirpes produtoras das estafilococcinas selecionadas foram crescidas em 10 ml de meio BHI a 37 °C por 18 h, com exceção da estirpe produtora da Pep5, (Sahl e Brandis, 1981) que foi crescida em meio TSB a 35 °C. Posteriormente, 10 ml da suspensão celular de cada estirpe foram inoculados em 1 litro do meio de cultura correspondente, e estes volumes foram incubados sob agitação a 120 rpm na incubadora de bancada CT-712, a 35 °C, por um período de 12 h, para a estirpe *S. epidermidis* 5, e a 37 °C, por um período de 24 h, para as demais produtoras. As culturas foram centrifugadas no equipamento *Avanti® J-E Centrifuge* (Beckman Coulter), no rotor JA-20, a 7.710 xg, por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e as proteínas e os peptídeos neles presentes foram precipitados com sulfato de amônio a 65% de saturação, a 4 °C, sob agitação por 4 h. Após o sal entrar todo em solução, as preparações foram centrifugadas a 13.200 xg, por 45 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram desprezados e o material precipitado de cada preparação foi dissolvido em 100 ml de água

ultrapura estéril (Ceotto *et al.*, 2010a). As preparações foram pasteurizadas através de aquecimento a 65 °C por 15 min. Entretanto, a preparação referente à lisostafina foi filtrada com membrana de celulose com poros de 0,22 µm (*Millipore*) para evitar a sua desnaturação térmica. As atividades das estafilococcinas foram calculadas através do método de microdiluição descrito no item 4.6. As preparações foram mantidas a - 20 °C, até a etapa de cromatografia de troca catiônica.

4.5.2 Purificação parcial das estafilococcinas através de cromatografia de troca catiônica

Em uma coluna cromatográfica de vidro (15,2 cm de altura por 2,6 cm de diâmetro), foram aplicados 15 ml da resina *SP Sepharose Fast Flow* (*Amersham Biosciences*). A coluna cromatográfica foi lavada com água ultrapura estéril (quatro vezes o volume total da coluna) e, em seguida, equilibrada com 30 ml de ácido acético (*Merck*) a 10 mM. O pH das preparações contendo as estafilococcinas foi ajustado para o valor de 2,0 pela adição de HCl 6,0 M. Posteriormente, cada preparação foi submetida a uma centrifugação no rotor JA-14, a 22.100 xg, por 15 min a 4 °C e, em seguida, o sobrenadante foi aplicado na coluna. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 30 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,8, e, posteriormente, com 10 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,8, até que o eluato chegasse ao pH 5,8. Uma nova lavagem da coluna foi realizada com 20 ml de NaCl 0,1 M. As estafilococcinas foram, então, eluídas da coluna através de três lavagens consecutivas com 10 ml de NaCl 0,5 M (Ceotto *et al.*, 2010b). As estafilococcinas presentes nas frações referentes ao NaCl 0,5 M foram tituladas pelo método das diluições em placa de microdiluição (descrito no item 4.6), após a pasteurização a 65 °C por 15 min. Entretanto, para a lisostafina, a esterilização foi feita a partir da filtração do material com uma membrana de celulose com poros de 0,22 µm.

4.6 Determinação das unidades arbitrárias das estafilococcinas por microdiluição

A atividade antimicrobiana das estafilococcinas foi quantificada através de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços. Adicionou-se, aos dois primeiros poços de cada linha, 100 µl das preparações de bacteriocina a serem tituladas. O primeiro poço foi utilizado para se verificar a esterilidade da solução. A partir do segundo poço, foram feitas

diluições duplas e seriadas das preparações em 100 μl de meio de cultura TSB. A estirpe indicadora *M. luteus* ATCC 4698 foi crescida previamente em 3 ml de meio TSB, por 18 h a 37 °C, e foi diluída no meio TSB até a obtenção de DO_{600} equivalente a 0,05. Em seguida, 100 μl da suspensão da estirpe indicadora foram adicionados aos poços com as diluições duplas e seriadas. Três poços foram reservados como controles de crescimento da estirpe indicadora e, assim, não receberam o volume referente à preparação de bacteriocina. Este sistema foi incubado por 18 h a 37 °C e, após este tempo, a DO_{600} de cada poço foi lida no leitor de absorvância *ELx800TM*. Por fim, o título de cada preparação foi dado pelo inverso da maior diluição de bacteriocina capaz de reduzir, em pelo menos 50%, o crescimento bacteriano da estirpe indicadora *M. luteus* ATCC 4698, multiplicado por 10, o que gerou as unidades arbitrárias por ml (UA/ml) (Ceotto *et al.*, 2010b). Para a Pep5, a placa de poliestireno foi previamente tratada com uma solução de soro albumina bovina a 1% (p/v), durante 30 min a 37 °C, para que a bacteriocina não se adsorvesse ao material plástico e gerasse um resultado subestimado (Hoffmann *et al.*, 2011).

4.7 Modo de ação das estafilococcinas frente às estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos

Os experimentos relacionados ao modo de ação das estafilococcinas frente às estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos foram realizados com preparações de bacteriocinas obtidas após a etapa de purificação parcial através de cromatografia de troca catiônica.

As estirpes de *S. aureus* foram crescidas em 5 ml de meio TSB e incubadas a 37 °C por 18 h, sob agitação a 120 rpm. As culturas foram centrifugadas a 7.710 $\times g$ por 5 min, no rotor JA-20, e as células foram suspensas em meio TSB fresco até a obtenção de DO_{600} equivalente a 0,3 (aproximadamente 1×10^9 células). As alíquotas de 100 μl desta suspensão bacteriana, adicionadas de 100 μl da estafilococcina parcialmente purificada e selecionada, foram colocadas em poços de placas de microdiluição, sendo estas incubadas no equipamento *SpectraMax[®] Plus384 Absorbance Microplate Reader (Molecular Devices)*, a 37 °C por 24 h (Netz, Bastos e Sahl, 2002, modificado). Como controle de crescimento da estirpe-alvo, foram adicionados, a poços da placa de microdiluição, 100 μl da suspensão bacteriana e 100 μl de tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 6,0). A leitura da DO_{600} , realizada a cada hora, foi precedida de agitação da placa por 5 s. Os resultados foram expressos e analisados no

programa Excel 2010 (*Microsoft*).

Alíquotas de 100 µl do crescimento também foram retiradas assepticamente no início e no fim de cada experimento para a determinação do número de células bacterianas viáveis. Diluições de 10^{-3} a 10^{-8} do crescimento foram preparadas em 900 µl de salina estéril, sendo 100 µl de cada diluição semeados em placas de Petri contendo o meio TSA. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, para a posterior contagem das UFC/ml. Os testes relacionados ao modo de ação das estafilococcinas foram realizados em triplicata.

4.8 Produção dos queijos do tipo Minas frescal

O processamento dos queijos foi realizado no Laboratório de Microbiologia do IFRJ (Campus Maracanã), segundo a metodologia descrita por Gomes e colaboradores (2011), com algumas modificações. Cada litro de leite pasteurizado padronizado (marca Itaocara, Rio de Janeiro, Brasil) foi aquecido até 35 °C e adicionado de 0,03 % (p/v) de cloreto de cálcio (Divimed, São Paulo Brasil) e de 1 ml/l de coalho líquido (HA-LA, *Chr Hansen*, Valinhos, São Paulo). O leite foi, então, mantido em repouso por 40 min até a coagulação. Em seguida, o gel obtido foi cortado em cubos de aproximadamente 2,0 cm³ e estes foram submetidos à homogeneização manual por 20 min e transferidos para moldes de plástico de 150 g. A massa foi dividida em três partes iguais e foi realizada a salga seca, de acordo com o seguinte delineamento experimental:

(QC) sem redução da concentração de sódio (NaCl 100%*);

(QI) com redução de 25% da concentração de sódio (NaCl/KCl - 75%/25%) e

(QII) com redução de 50% da concentração de sódio (NaCl/KCl - 50%/50%)

* Equivalente à concentração final de 0,08% (p/p) de NaCl

Posteriormente, os queijos foram embalados em sacos plásticos de polietileno e mantidos sob refrigeração à temperatura de aproximadamente 4 °C, por no mínimo 30 min, antes dos experimentos seguintes.

4.9 Contagem do número de células viáveis de *S. aureus* nas matrizes de queijo produzidas com e sem a adição de bacteriocinas

Essas análises tiveram por objetivo verificar a viabilidade de duas estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, que foram escolhidas de acordo com a sua sensibilidade às estafilococcinas testadas, ao longo da estocagem refrigerada dos queijos e perante a ação das bacteriocinas.

A fim de se avaliar a capacidade biopreservativa das bacteriocinas parcialmente purificadas contra *S. aureus* nas matrizes de queijo, cada uma das bacteriocinas escolhidas foi testada, separadamente, contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, em cada um dos três tipos de matrizes de queijo Minas frescal preparadas: QC, QI e QII. Cada matriz foi dividida em cinco porções (20 g cada), que foram transferidas para frascos estéreis. Foram inoculadas 10^6 UFC/g de *S. aureus* nas matrizes de queijo Minas frescal após a salga, de modo a se obter uma contagem inicial propositalmente abusiva. A escolha da quantidade inoculada baseou-se em trabalhos recentes que relatam que queijos Minas frescal disponíveis para o consumo no Brasil apresentam, com frequência, este quantitativo com relação a *S. aureus* (Passos *et al.*, 2009; Komatsu *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2011; Zocche *et al.*, 2012). Imediatamente após a inoculação do patógeno, foram adicionadas 256-512 UA/g das estafilococcinas selecionadas, separadamente e em combinação de duas substâncias (aureocina A53 e Pep5; aureocina A53 e lisostafina; Pep5 e lisostafina). Concomitantemente, foram feitos os controles de crescimento das estirpes de *S. aureus* nas matrizes, sendo adicionado igual volume de água peptonada a 0,1% (p/v) em substituição à preparação de bacteriocinas. As matrizes foram, então, maceradas com espátulas esterilizadas para facilitar a homogeneização das bactérias e das bacteriocinas no alimento. O número de UFC/g foi verificado no momento do inóculo (controle), após 10 min de contato e após 1, 7, 14 e 21 dias de estocagem refrigerada a 4 °C. A quantificação de *S. aureus* nas matrizes foi realizada por meio de sucessivas diluições decimais, em solução salina, e semeadura de 100 μ l em ágar *Baird-Parker* (duas placas por diluição). As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C.

4.10 Análises estatísticas

Os resultados dos testes foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e do Teste de Tukey ao nível de $p < 0,05$, utilizando-se o programa XLSTAT para *Windows* 2012 (*Adinsoft*).

5. RESULTADOS

5.1 Identificação ao nível de espécie das estirpes isoladas de alimentos

5.1.1 Testes bioquímicos

A fim de se identificar ao nível de espécie as estirpes isoladas de alimentos, visando-se selecionar apenas *S. aureus* para os testes subsequentes, uma bateria de testes bioquímicos foi utilizada. As características avaliadas foram: fermentação do manitol, fermentação butileno-glicólica, produção de DNase, produção de catalase, produção de coagulase e produção de lecitinase. Os resultados obtidos nos testes bioquímicos para a identificação das estirpes ao nível de espécie estão contidos no **Quadro 10**.

Todas as estirpes originadas de linguiça e a estirpe QJ2 (47%) apresentaram resultado negativo para os testes de produção de catalase, coagulase e DNase.

Todas as estirpes apresentaram resultado positivo para o teste de fermentação de manitol, com a exceção da estirpe QMUF1.

Todas as estirpes apresentaram resultado positivo para a produção de acetoína, com a exceção da estirpe QJ1.

A estirpe QJ1 apresentou resultado positivo para os testes de produção de catalase e de DNase. Entretanto, apresentou resultado negativo para o teste de produção de coagulase.

Apenas as estirpes Q1, Q2, QRHF1, QRHF2, QRHF3 e QJ3 apresentaram resultados positivos para todos os testes realizados e puderam, então, ser identificadas como *S. aureus*. Em seguida, estas estirpes foram submetidas ao teste de produção de lecitinase com o objetivo de se confirmar a identificação como *S. aureus*. Os resultados obtidos foram positivos para a produção desta enzima e a redução do telurito em todas as estirpes testadas.

Quadro 10. Testes de bioquímicos realizados com as estirpes isoladas de alimentos

ESTIRPES TESTADAS	RESULTADOS DOS TESTES					
	DE FERMENTAÇÃO		DE PRODUÇÃO DE			
	do manitol	butileno-glicólica (teste de VP)	DNase	catalase	coagulase	lecitinase
Controle +	+	+	+	+	+	+
Controle -	-	-	-	-	-	-
Q1	+	+	+	+	+	+
Q2	+	+	+	+	+	+
QMUF1	-	+	+	+	-	X
QRHF1	+	+	+	+	+	+
QRHF2	+	+	+	+	+	+
QRHF3	+	+	+	+	+	+
QJ1	+	-	+	+	-	X
QJ2	+	+	-	-	-	X
QJ3	+	+	+	+	+	+
LF1	+	+	-	-	-	X
LF2	+	+	-	-	-	X
LF3	+	+	-	-	-	X
LF4	+	+	-	-	-	X
LF5	+	+	-	-	-	X
LF6	+	+	-	-	-	X

Os testes foram realizados em triplicata.

+: resultado positivo

-: resultado negativo

X: o teste não foi realizado para esta estirpe.

5.1.2 Espectrometria de massas por MALDI-TOF para identificação de espécie

Todas as estirpes isoladas de alimentos, que foram positivas para os testes bioquímicos (fermentação do manitol, utilização da via butileno-glicólica e produção de DNase, coagulase, catalase e lecitinase), tiveram a identificação confirmada para a espécie *S. aureus* por esta técnica.

5.2 Caracterização fenotípica das estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos

5.2.1 Detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas no genoma das estirpes de *S. aureus*

A fim de se detectar os genes codificadores de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) e de algumas não-clássicas (SEG, SEH, SEI e SEI/J), a presença dos mesmos foi pesquisada no DNA genômico das seis estirpes de *S. aureus* pela metodologia de PCR. Os resultados desta detecção estão apresentados no **Quadro 11** e na **Figura 5**.

As estirpes Q1, Q2 e QJ3 (50%) deram resultado positivo para a presença dos genes codificadores da SEA e da SEB. Todas as estirpes apresentaram resultado positivo para a presença do gene codificador da SEH. As estirpes Q1, Q2, QJ3, QRHF1, QRHF2 e QRHF3 apresentaram resultado negativo para a presença dos genes codificadores das demais enterotoxinas investigadas (SEC, SED, SEE, SEG, SEI e SEI/J).

Quadro 11. Testes de detecção, por PCR, de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas no genoma das estirpes de *S. aureus*

ESTIRPES TESTADAS	ENTEROTOXINAS INVESTIGADAS								
	CLÁSSICAS					NÃO-CLÁSSICAS			
	SEA	SEB	SEC	SED	SEE	SEG	SEH	SEI	SEI/J
Q1	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Q2	+	+	-	-	-	-	+	-	-
QJ3	+	+	-	-	-	-	+	-	-
QRHF1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
QRHF2	-	-	-	-	-	-	+	-	-
QRHF3	-	-	-	-	-	-	+	-	-

SE: enterotoxina(s) estafilocócica(s), SEI: tipo-enterotoxina estafilocócica. Os testes foram realizados em triplicata.

+: resultado positivo

-: resultado negativo

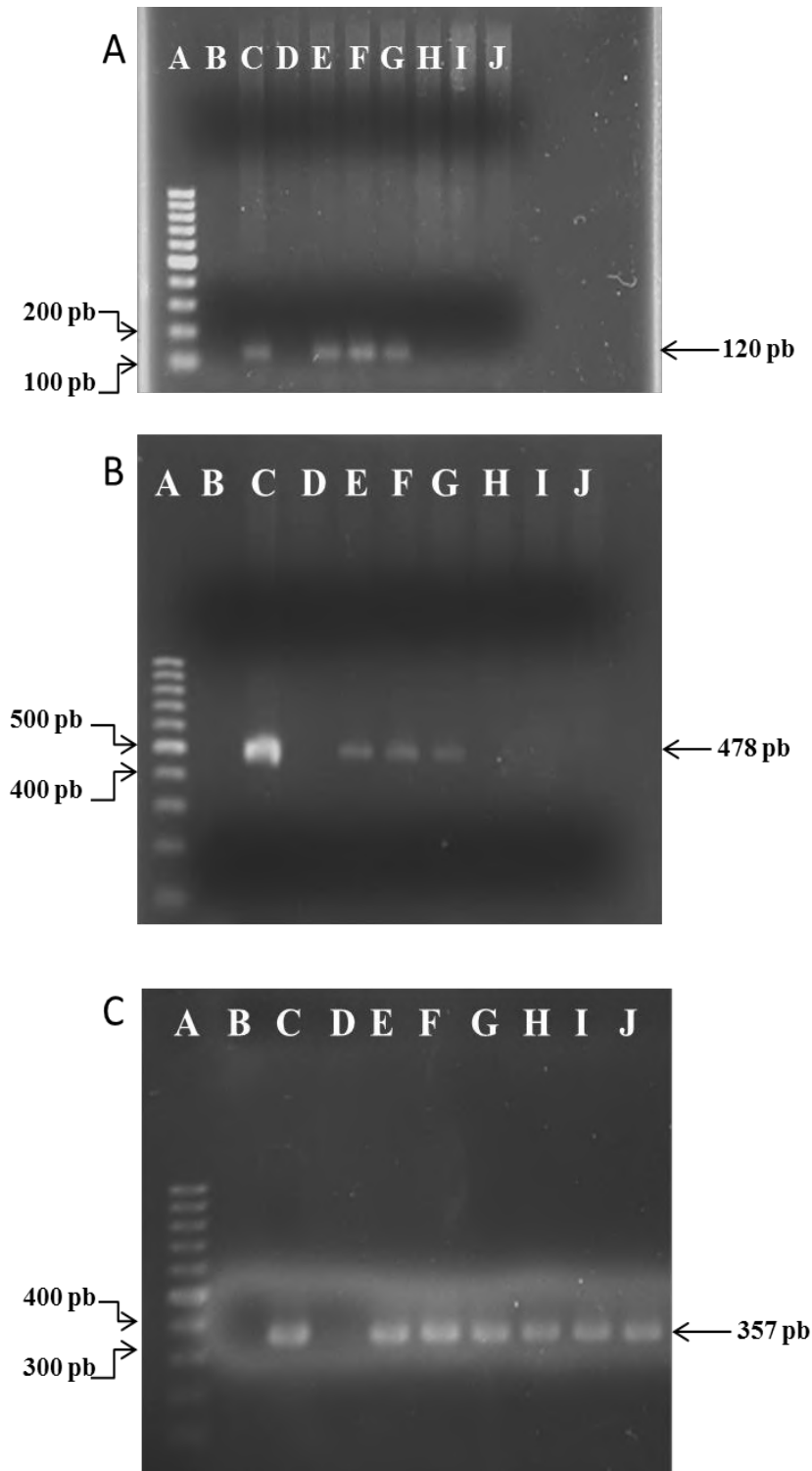


Figura 5. Amplicons obtidos por reação de PCR para a identificação de genes codificadores de enterotoxinas no genoma das estirpes de *S. aureus* e observados após a eletroforese em gel de agarose a 1,4% (p/v) em tampão TAE, por 30 min a 70 V. A, 100-bp DNA ladder (Promega); B, branco (mistura de reagentes sem o DNA); C, controle positivo; D, controle negativo; E, *S. aureus* Q1; F, *S. aureus* Q2; G, *S. aureus* QJ3; H, *S. aureus* QRHF1; I, *S. aureus* QRHF2; J, *S. aureus* QRHF3. (A) Enterotoxina SEA; (B) Enterotoxina SEB; (C) Enterotoxina SEH. Os números à esquerda da figura correspondem aos tamanhos de alguns fragmentos de DNA do marcador molecular empregado. O número à direita de cada figura corresponde ao tamanho do amplicon esperado.

5.2.2 Perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos

Os resultados do antibiograma, empregando-se o método de difusão a partir de discos para 16 compostos antimicrobianos, estão apresentados no **Quadro 12**. Os antimicrobianos foram separados por grupos de acordo com a sua aplicação nos testes de rotina. O grupo A corresponde aos antimicrobianos de primeira escolha, possuindo um amplo espectro de ação e baixa toxicidade. O grupo B corresponde aos antimicrobianos de escolha secundária, que são escolhidos quando a bactéria possui resistência a algum antimicrobiano do grupo A, ou caso o paciente tenha alguma alergia e/ou intolerância a estes medicamentos. O grupo C corresponde aos antimicrobianos alternativos ou de terapia suplementar, os quais são utilizados para estirpes com o fenótipo de multirresistência e para tratar infecções bacterianas em sítios incomuns (ex: *Salmonella* spp. em sítios extraintestinais). O grupo O corresponde aos antimicrobianos que têm uma indicação clínica para o grupo de organismos em questão, todavia, não são, comumente, candidatos para o teste de rotina laboratorial. Por fim, os antimicrobianos fora de classificação são aqueles que não estão compreendidos nos demais grupos, mas estão relacionados com alguns antimicrobianos contidos neles. Como exemplo, penicilina e ampicilina pertencem à classe das penicilinas sensíveis a penicilinas.

Todas as seis estirpes de *S. aureus* apresentaram resistência à penicilina G (PEN) e à ampicilina (AMP). Apenas as estirpes QRHF1, QRHF2 e QRHF3 apresentaram resistência à tetraciclina (TET) e à eritromicina (ERI). Todas as estirpes apresentaram sensibilidade à clindamicina (CLI). Entretanto, ao se realizar o teste D, pôde-se observar a resistência induzida à clindamicina, a qual denota o perfil fenotípico MLS_{B_i} , apenas para as estirpes QRHF1, QRHF2 e QRHF3.

Para a vancomicina, o teste de difusão em meio sólido funcionou apenas como um teste de triagem. Desta forma, o teste de determinação da CIM pela microdiluição em caldo foi empregado como descrito pelo CLSI (2015). A partir dos resultados, pôde-se observar que todas as estirpes foram sensíveis à vancomicina até a concentração de 0,5 µg, o que caracteriza o fenótipo de sensibilidade.

As estirpes QRHF1, QRHF2 e QRHF3 apresentaram o fenótipo de multirresistência a antimicrobianos, pois se mostraram resistentes às seguintes classes de drogas: macrolídeos, penicilinas e tetraciclinas.

Quadro 12. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos por estirpes de *S. aureus*

GRUPOS DE ANTIMICROBIANOS	A					B			C			O		FORA DE CLASSIFICAÇÃO			Teste-D
	PEN	CLI	CTX	ERI	SUT	RIF	TET	VAN	CIP	CLO	GEN	AMI	TOB	AMP	CAZ	IPM	
Estirpes de <i>S. aureus</i>																	
Q1	R	S	S	S	S	S	S	S (0,5 µg)	S	S	S	S	S	R	S	S	-
Q2	R	S	S	S	S	S	S	S (0,5 µg)	S	S	S	S	S	R	S	S	-
QJ3	R	S	S	S	S	S	S	S (0,5 µg)	S	S	S	S	S	R	S	S	-
QRHF1	R	S	S	R	S	S	R	S (0,5 µg)	S	S	S	S	S	R	S	S	+
QRHF2	R	S	S	R	S	S	R	S (0,5 µg)	S	S	S	S	S	R	S	S	+
QRHF3	R	S	S	R	S	S	R	S (0,5 µg)	S	S	S	S	S	R	S	S	+
Controle	S	S	S	S	S	S	S	S (0,5 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	-

R – resistência; S – sensibilidade. AMI- amicacina; AMP – ampicilina; CTX- cefotaxima; CAZ – ceftazidima; CIP – ciprofloxacina; CLI – clindamicina; CLO – cloranfenicol; ERI – eritromicina; GEN – gentamicina; IPM – imipenem; PEN – penicilina G; RIF – rifampicina; SUT – sulfazotrim; TET – tetraciclina; TOB – tobramicina; VAN – vancomicina; +, resultado positivo; -, resultado negativo. O resultado para a vancomicina foi dado a partir do teste de determinação da CIM, assinalada entre parênteses.

5.2.3 Formação de biofilme pelas estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos

Os resultados do teste de formação de biofilme foram analisados segundo os critérios propostos por Stepanovic e colaboradores (2007). Todas as estirpes de *S. aureus* foram identificadas como produtoras moderadas de biofilme em meio TSB.

5.3 Teste de sensibilidade a estafilococcinas pelo método de difusão em ágar

Os resultados dos testes de sensibilidade às estafilococcinas, empregando-se como alvos as seis estirpes identificadas como *S. aureus*, estão apresentados na **Tabela 1**.

As estafilococcinas 5580 e C55, as aureocinas 4185, a epidermina e a nukacina 3299 não foram capazes de inibir o crescimento das estirpes-alvo testadas. Já a aureocina A70 foi capaz de inibir o crescimento de três das seis estirpes-alvo testadas. O crescimento das estirpes Q1, Q2 e QJ3 não foi inibido por esta estafilococcina.

As estafilococcinas aureocina A53, hyicina 4244, hyicina 3682, Pep5 e lisostafina foram capazes de inibir o crescimento de todas as estirpes-alvo testadas.

Dentre todas as estafilococcinas testadas, a hyicina 4244 e a lisostafina, e a combinação das aureocinas A53 e A70 geraram os maiores halos de inibição frente às estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos.

As bacteriocinas selecionadas para os testes subsequentes foram: aureocina A53, hyicina 3682, Pep5 e lisostafina. A hyicina 4244 não foi escolhida, pois a metodologia para a sua purificação não era compatível com a sua aplicação em alimentos, necessitando do estabelecimento de uma metodologia alternativa para a obtenção desta bacteriocina parcialmente purificada.

Tabela 1. Testes de sensibilidade de *S. aureus* a estafilococinas

ESTIRPE PRODUTORA DA(S)	CLASSES DAS BACTERIOCINAS	ESTIRPES-ALVO					
		Q1	Q2	QRHF1	QRHF2	QRHF3	QJ3
Aureocina A70	II	-	-	16,0 ± 1,2	16,0 ± 1,2	15,0 ± 0,6	-
Aureocina A53	II	17,0 ± 0,6	17,0 ± 1,2	17,0 ± 0,6	18,0 ± 0,0	18,0 ± 1,0	18,0 ± 1,0
Aureocinas A53 e A70	Ambas de classe II	21,0 ± 1,2	20,0 ± 0,0	20,0 ± 0,6	21,0 ± 0,6	20,0 ± 0,6	22,0 ± 1,2
Aureocinas 4185	IV e ND	-	-	-	-	-	-
Pep5	I	16,0 ± 0,6	17,0 ± 0,6	20,0 ± 0,6	17,0 ± 1,0	17,0 ± 1,2	15,0 ± 0,6
Epidermina	I	-	-	-	-	-	-
Hycina 4244	V	25,0 ± 0,0	24,0 ± 1,2	24,0 ± 1,2	23,0 ± 1,0	23,0 ± 1,5	24,0 ± 1,5
Hycina 3682	I	11,0 ± 1,0	17,0 ± 0,6	12,0 ± 1,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,6	11,0 ± 0,6
Nukacina 3299	I	-	-	-	-	-	-
Estafilococcina C55	I	-	-	-	-	-	-
Lisostafina	III	22,0 ± 1,7	22,0 ± 1,2	24,0 ± 1,2	23,0 ± 0,6	23,0 ± 1,0	24,0 ± 1,2
Estafilococcina 5580	I*	-	-	-	-	-	-

Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em média do diâmetro dos halos de inibição ± desvio-padrão em milímetros.

* - Classificação realizada a partir de dados do grupamento gênico codificador da bacteriocina. ND, não-determinada.

5.4 Modo de ação das estafilococcinas frente às estirpes de *S. aureus*

O teste de modo de ação teve como objetivo verificar a atividade bactericida (bacteriolítica ou não) ou bacteriostática das estafilococcinas selecionadas no teste anterior. As análises referentes aos testes de modo de ação das bacteriocinas parcialmente purificadas foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados nas **Figuras 6, 7, 8 e 9**. A DO_{600} inicial da suspensão microbiana em todos os experimentos foi de $0,3 \pm 0,02$, o que corresponde a uma contagem de células de, aproximadamente, $2,0 \times 10^9$ UFC/ml.

Para a aureocina A53, a redução máxima de crescimento ($DO_{600} \approx 0,050$) ocorreu a partir de 18 h de incubação. Todas as estirpes terminaram o experimento com uma DO final muito próxima, que resultou em uma contagem de células de, aproximadamente, $8,2 \pm 0,5 \times 10^7$ UFC/ml (**Figura 6**). A redução acentuada da DO_{600} caracteriza uma atividade bactericida e fortemente bacteriolítica.

Para a lisostafina, ocorreu a eliminação de todo crescimento bacteriano, de todas as estirpes, logo após a primeira hora de incubação (**Figura 7**). A redução da DO_{600} e a completa eliminação do crescimento bacteriano em um curto período de tempo caracterizam uma acentuada atividade bactericida e bacteriolítica. Não foi possível se recuperar células viáveis para a contagem ao final do experimento.

Para a hyicina 3682, todas as estirpes de *S. aureus*, ao longo das 24 h de incubação, apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) da DO_{600} de 0,2 a 0,3, quando comparadas com os seus respectivos controles (**Figura 8**). A contagem de células viáveis nos controles foi de aproximadamente $3,4 \pm 0,3 \times 10^9$ UFC/ml e a contagem para os testes com a bacteriocina foi de aproximadamente $2,0 \pm 0,6 \times 10^9$ UFC/ml. A partir destes resultados, pôde-se observar que a hyicina 3682 foi capaz de reduzir o crescimento microbiano em cerca de 40%, o que caracteriza uma atividade bactericida fraca quando comparada com as demais estafilococcinas utilizadas neste teste.

Por fim, para a Pep5, a redução máxima de crescimento ($DO_{600} \approx 0,15$) de todas as estirpes ocorreu com 24 h de incubação. Todas as estirpes terminaram o experimento com uma DO final muito próxima, que resultou em uma contagem de células de, aproximadamente, $3,0 \pm 0,4 \times 10^8$ UFC/ml (**Figura 9**). A redução da DO_{600} observada caracteriza uma atividade bactericida, com lise parcial das células.

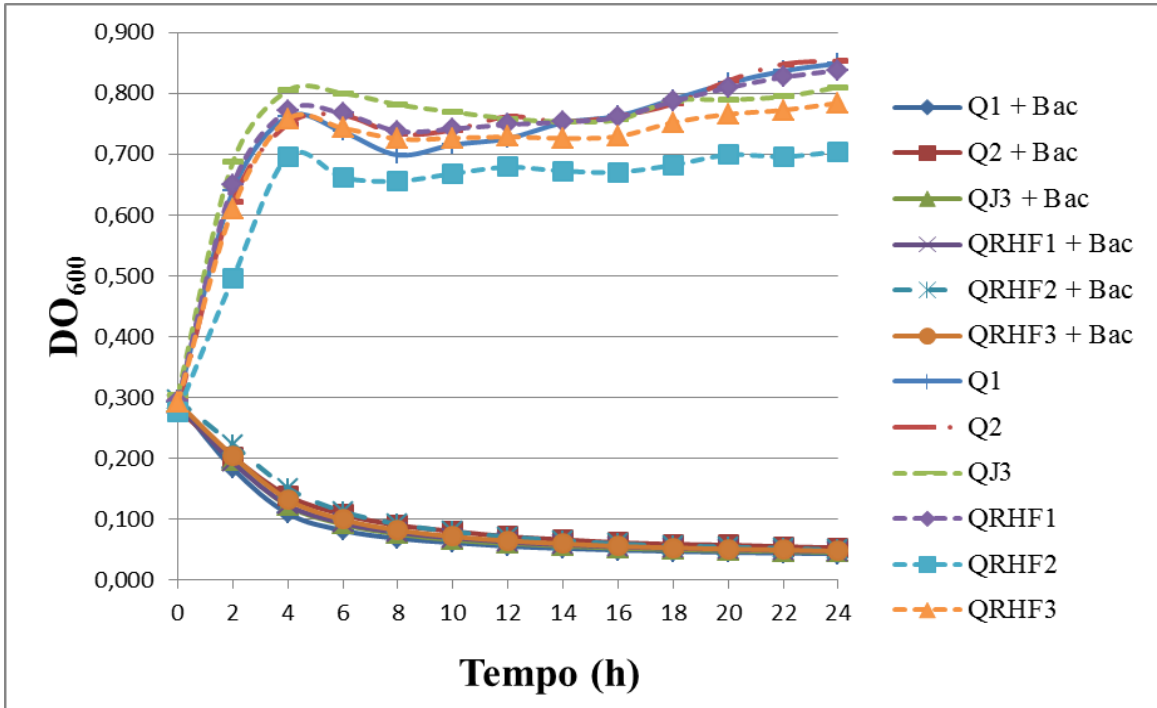


Figura 6. Modo de ação da aureocina A53 (4.096 UA) contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C. Os resultados apresentados são referentes à média de três experimentos independentes. Os desvios-padrão, embora calculados, não foram acrescentados devido à grande sobreposição de gráficos na figura. Bac - bacteriocina.

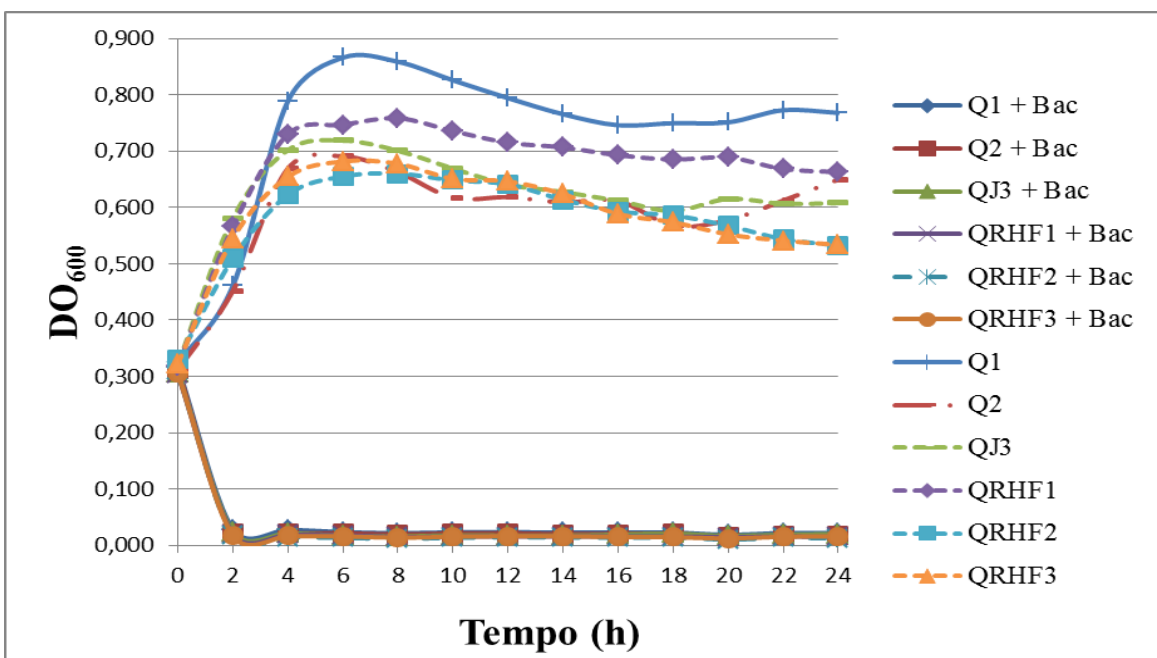


Figura 7. Modo de ação da lisostafina (1.024 UA) contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C. Os resultados apresentados são referentes à média de três experimentos independentes. Os desvios-padrão, embora calculados, não foram acrescentados devido à grande sobreposição de gráficos na figura. Bac - bacteriocina.

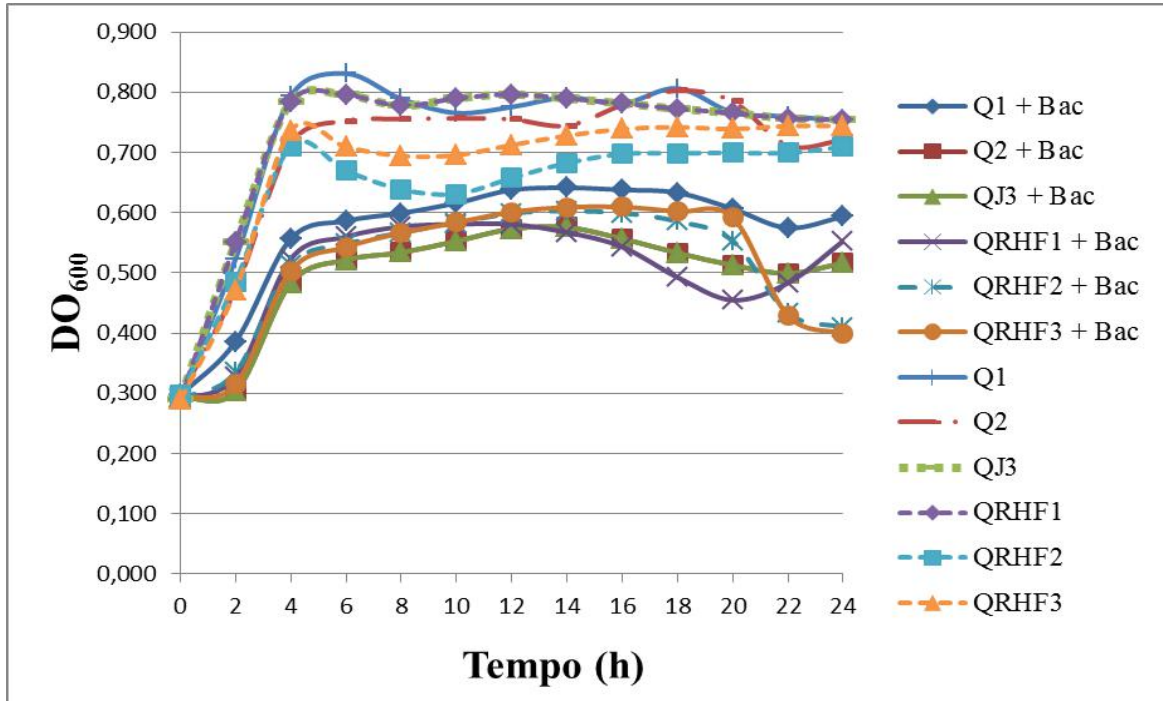


Figura 8. Modo de ação da hycicina 3682 (4.096 UA) contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C. Os resultados apresentados são referentes à média de três experimentos independentes. Os desvios-padrão, embora calculados, não foram acrescentados devido à grande sobreposição de gráficos na figura. Bac - bacteriocina.

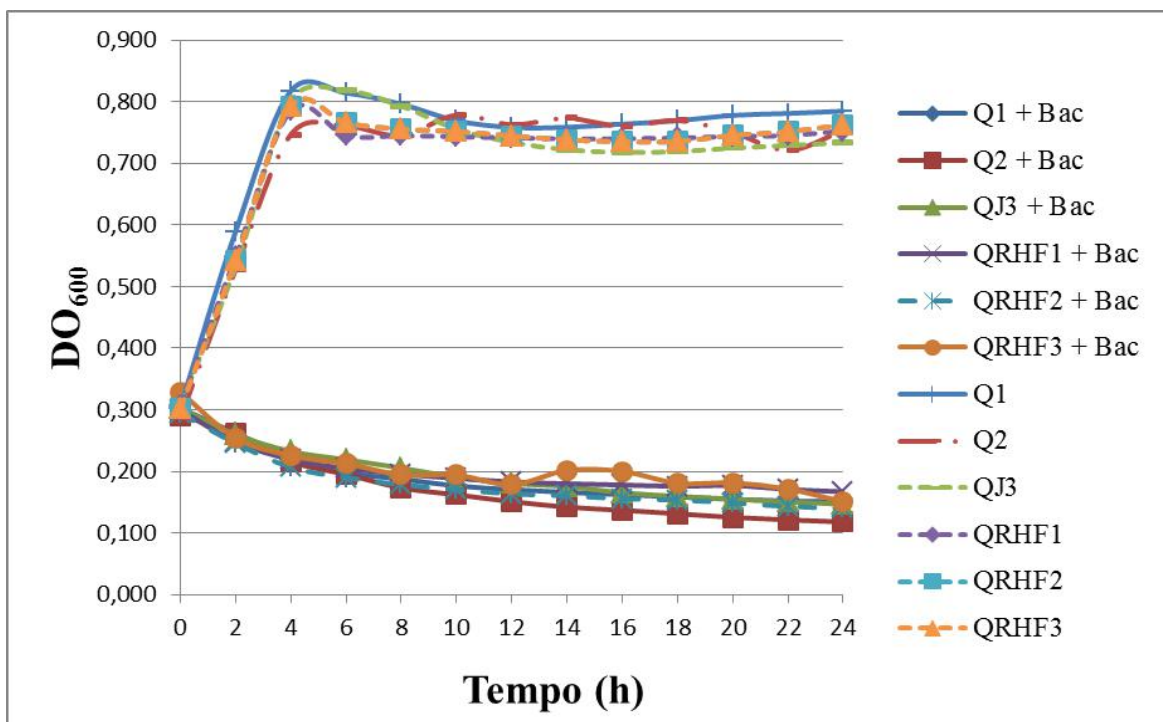


Figura 9. Modo de ação da Pep5 (2.048 UA) contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, em caldo BHI, por 24 h a 37 °C. Os resultados apresentados são referentes à média de três experimentos independentes. Os desvios-padrão, embora calculados, não foram acrescentados devido à grande sobreposição de gráficos na figura. Bac - bacteriocina.

5.5 Contagem de células viáveis de *S. aureus* nas matrizes de queijo produzidas com e sem a adição de bacteriocinas

5.5.1 Emprego das bacteriocinas separadamente

A fim de se avaliar a capacidade biopreservativa das bacteriocinas parcialmente purificadas em matrizes de queijo, cada uma das bacteriocinas escolhidas foi testada, separadamente, e em combinação, contra estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, em cada um dos três tipos de matrizes de queijo Minas frescal preparadas: NaCl 100%, NaCl/KCl – 75/25% e NaCl/KCl – 50/50%. As estirpes indicadoras Q1 e QJ3 foram escolhidas aleatoriamente para serem utilizadas nesta etapa como estirpes-alvo, pois o perfil de sensibilidade destas estirpes de *S. aureus* frente às estafilococcinas e os seus fatores de virulência (produção de três enterotoxinas e resistência à penicilina/ampicilina) foram similares aos das demais estirpes caracterizadas. As concentrações de 256 UA/ml e 512 UA/ml das estafilococcinas foram escolhidas baseadas nos dados da literatura (Grisi e Gorlach-Lira, 2005; Felicio *et al.*, 2015).

Com dito no item anterior, os resultados dos testes de modo de ação mostraram atividade bactericida (e bacteriolítica) da aureocina A53, da lisostafina e da Pep5, e uma atividade bactericida fraca da hycina 3682. Desta forma, somente as bacteriocinas que levaram a uma acentuada redução da DO ao longo do tempo foram selecionadas para este teste. Importante destacar que as estafilococcinas escolhidas para esta etapa pertencem a diferentes classes de bacteriocinas: a Pep5 pertence à classe I, a aureocina A53 pertence à classe II e a lisostafina pertence à classe III.

Em todos os experimentos realizados, foi possível se observar que tanto a estirpe Q1 quanto a estirpe QJ3 não apresentaram entre si diferenças significativas ($p < 0,05$) nas contagens de células viáveis, quando utilizadas como controles nos três diferentes tipos de matrizes, mantendo, em média 6 unidades-log UFC/g nos sete primeiros dias de estocagem e apresentando pequena queda, inferior a 1 unidade-log UFC/g, até o vigésimo primeiro dia (**Figuras 10, 11 e 12**). Estes resultados mostram que as estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 não foram capazes de crescer na condição de estocagem a 4 °C.

Em relação à preparação da aureocina A53 adicionada à matriz de queijo Minas frescal sem redução de sódio (**Figura 10A**), observou-se uma queda de 2 unidades-log da contagem de células viáveis da população de *S. aureus* Q1 logo nas primeiras 24 h de incubação, enquanto que, para *S. aureus* QJ3, apenas ao final do sétimo dia, obteve-se contagens

semelhantes de células viáveis ($p < 0,05$). Os resultados para ambas as estirpes se mantiveram semelhantes até o décimo-quarto dia. Entretanto, ao término dos 21 dias de experimento, pôde ser observado um leve aumento populacional. Resultados similares foram observados na matriz com redução de 25% (**Figura 10B**) e de 50% (**Figura 10C**) da concentração de sódio ($p < 0,05$). Todavia, para o queijo com redução de 25% da concentração de sódio (**Figura 10B**), as contagens de células viáveis para a estirpe *S. aureus* Q1, ao final dos 21 dias de experimento, foram similares às contagens obtidas para os controles ($p > 0,05$), mostrando, assim, que, nesta condição, houve uma retomada do crescimento bacteriano, ao final do experimento, indicando a presença de quantidade insuficiente de bacteriocina para manter a inibição.

Em relação à ação da lisostafina, as contagens de células viáveis obtidas para ambas as estirpes nos três tipos de matrizes não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), havendo uma redução significativa ($p < 0,05$) da contagem de células viáveis de, aproximadamente, 6 unidades-log UFC/g para 2 unidades-log UFC/g ao longo dos 21 dias de análise. Importante destacar a redução de pelo menos 1 unidade-log da contagem de células viáveis após os primeiros 10 min da análise, pois isto mostra que o modo de ação desta proteína é extremamente rápido e eficaz. Ao final do primeiro dia de incubação, foi verificada uma redução populacional de pelo menos 3 unidades-log, chegando esta a ser igual a cerca de 4 unidades-log UFC/g no sétimo dia de incubação e assim mantendo-se até o vigésimo-primeiro dia de experimento (**Figura 11**). Com esta estafilococcina, foram encontrados os resultados mais expressivos na redução da contagem de células viáveis.

Já a aplicação da bacteriocina Pep5 resultou, em média, em uma redução da contagem de células viáveis de 1,2 unidades-log, para a estirpe *S. aureus* Q1, e de 1,6 unidades-log, para a estirpe *S. aureus* QJ3, ao final dos 21 dias de análise. Importante destacar que, assim como a lisostafina, a Pep5 levou à redução acentuada da contagem de células viáveis de, aproximadamente, 0,8 e 1,2 unidades-log UFC/g, respectivamente, para as estirpes Q1 e QJ3 nos primeiros 10 min de incubação refrigerada (**Figura 12**). As contagens mostraram que houve diferença significativa entre os controles e as matrizes com bacteriocina ($p < 0,05$), o que comprova a efetividade do peptídeo. Entretanto, não houve diferença significativa dos resultados para esta bacteriocina entre as três matrizes alimentares propostas ($p > 0,05$).

Importante ressaltar que, independentemente da variação da concentração de sódio entre as matrizes, todas as bacteriocinas se mostraram capazes de reduzir, em pelo menos 0,7 unidades-log UFC/g, a concentração inicial de *S. aureus* utilizada nos experimentos.

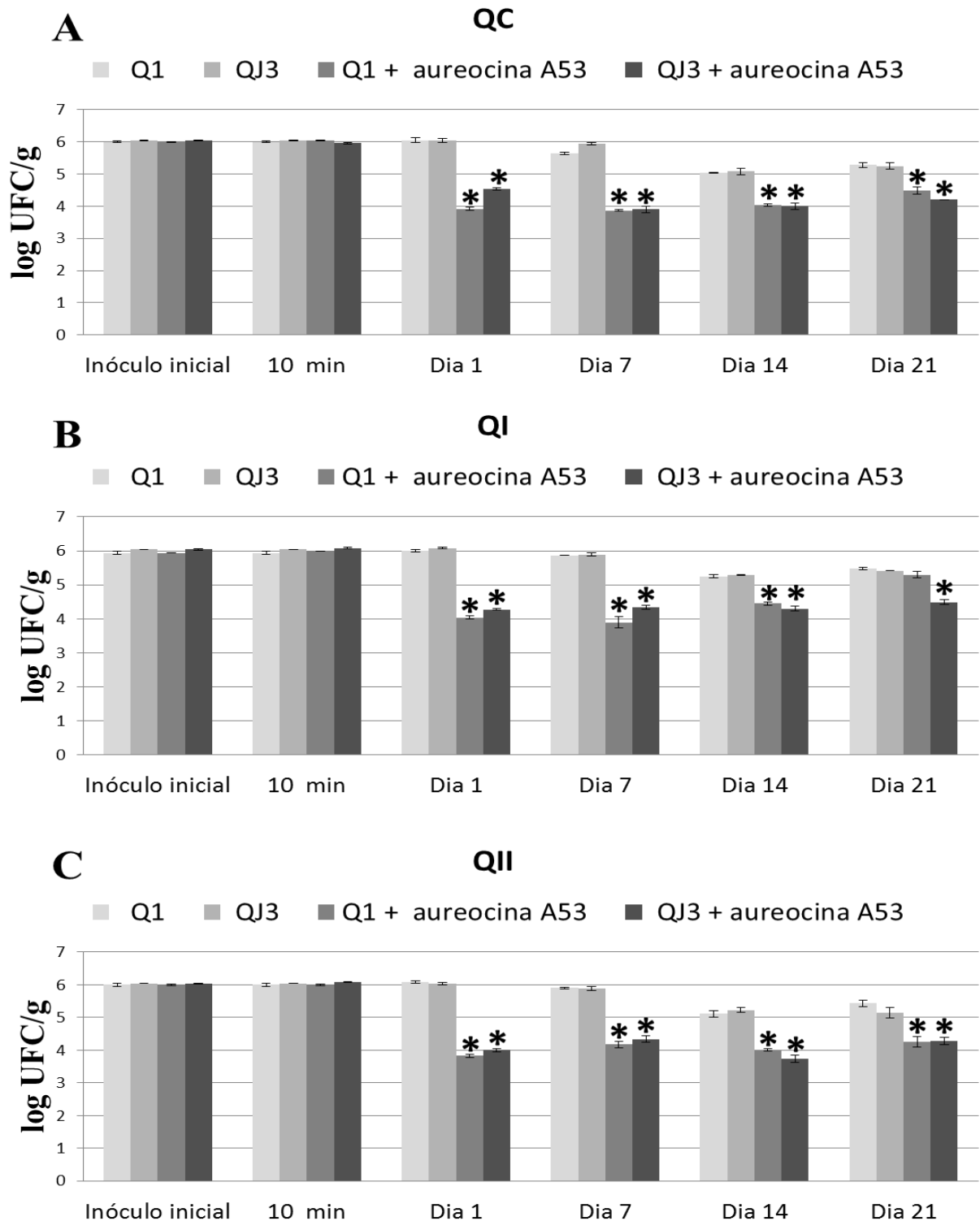


Figura 10. Ação da aureocina A53 sobre as estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 em matriz de queijo Minas fresco sem redução de sódio (QC, A), com redução de 25% da concentração de sódio (QI, B) e com redução de 50% da concentração de sódio (QII, C). Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em média da contagem de células viáveis \pm desvio-padrão. As amostras foram mantidas sob incubação refrigerada a 4 °C. *, a diferença foi estatisticamente significativa.

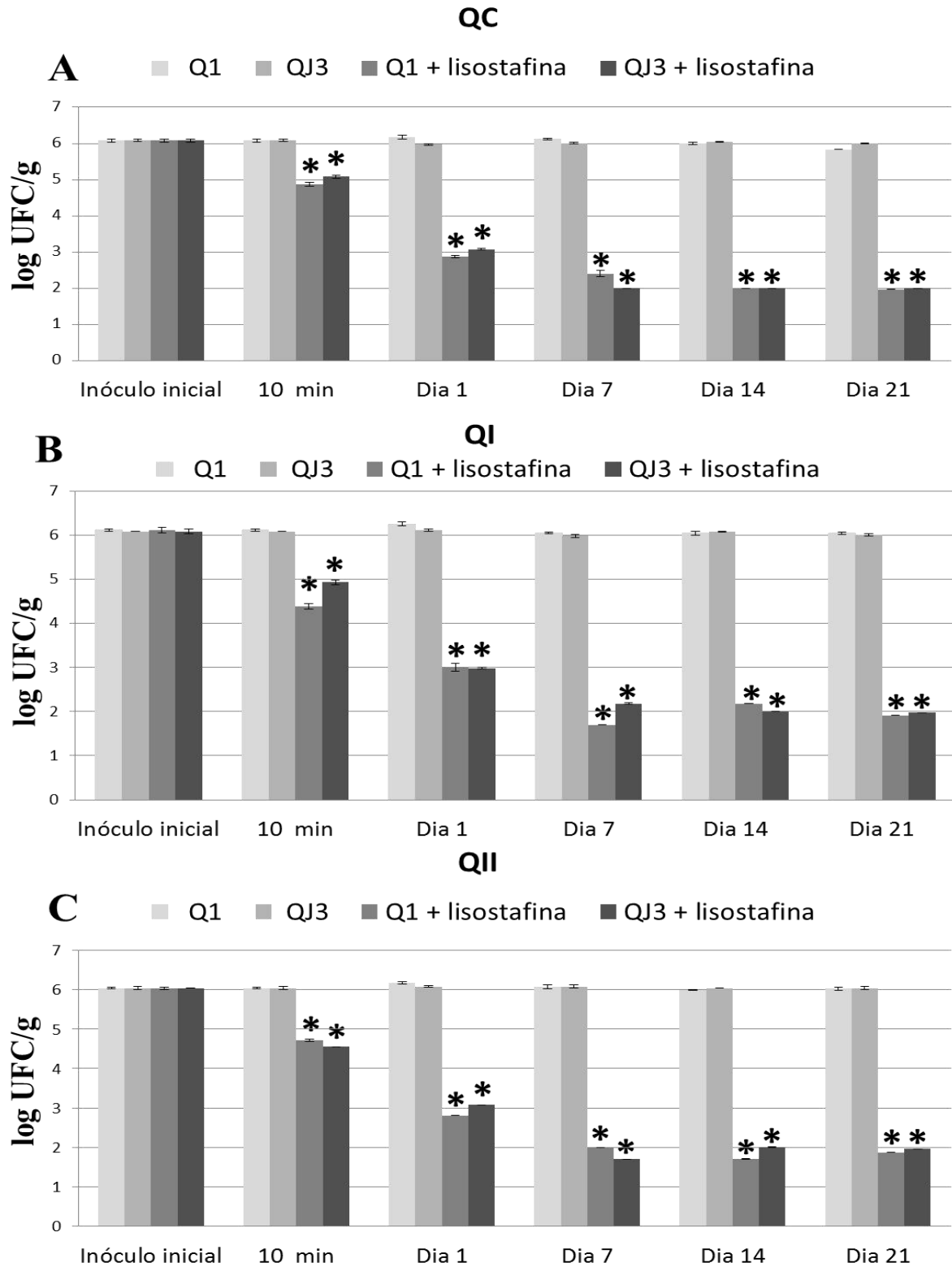


Figura 11. Ação da lisostafina sobre as estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 em matriz de queijo Minas frescal sem redução de sódio (QC, A), com redução de 25% da concentração de sódio (QI, B) e com redução de 50% da concentração de sódio (QII, C). Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em média da contagem de células viáveis \pm desvio-padrão. As amostras foram mantidas sob incubação refrigerada a 4°C. *, a diferença foi estatisticamente significativa.

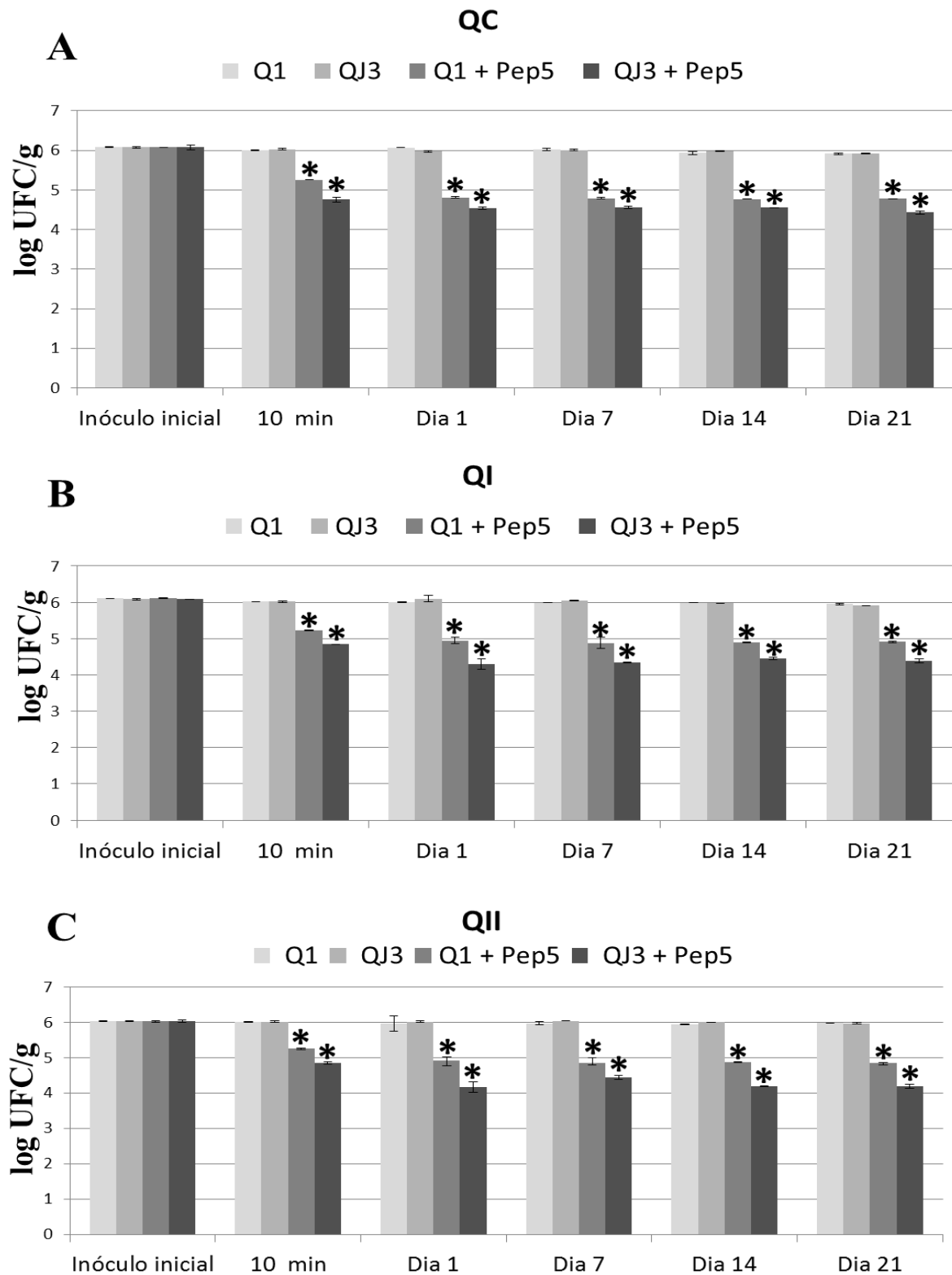


Figura 12. Ação da Pep5 sobre as estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 em matriz de queijo Minas frescal sem redução de sódio (QC, A), com redução de 25% da concentração de sódio (QI, B) e com redução de 50% da concentração de sódio (QII, C). Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em média da contagem de células viáveis \pm desvio-padrão. As amostras foram mantidas sob incubação refrigerada a 4 °C. *, a diferença foi estatisticamente significativa.

5.5.2. Emprego das bacteriocinas em combinação no queijo com redução de 25% da concentração de sódio

Uma vez que não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto ao comportamento das estirpes de *S. aureus* nas três matrizes de queijo, a matriz com 25% de redução da concentração de sódio (Q1) foi escolhida para os experimentos de avaliação da contagem de células viáveis frente à combinação das bacteriocinas, duas a duas. As concentrações finais de cada uma das estafilococcinas empregadas foram as mesmas utilizadas nos experimentos anteriores. A escolha desta matriz para esses experimentos é justificada pelo fato da mesma ter apresentado características físico-químicas e organolépticas (odor e aspecto visual, entre outros) mais satisfatórias do que as da matriz com redução de 50% da concentração de sódio (dados não apresentados).

A combinação da aureocina A53 com a Pep5 resultou em um aumento significativo da redução da população de *S. aureus*, quando comparada com a utilização das duas bacteriocinas separadamente ($p < 0,05$). Quando comparada com a ação isolada da aureocina A53, foi observado um aumento significativo da redução da população microbiana de 1,9 unidades-log UFC/g, para a estirpe Q1, e de 1,2 unidades-log UFC/g, para a estirpe QJ3 ($p < 0,05$), ao final dos 21 dias de análise. Em relação à ação isolada da Pep5, houve um aumento significativo da redução de cerca de 1,6 unidades-log UFC/g para a estirpe Q1 e de 1,0 unidade-log UFC/g para estirpe QJ3, ao final dos 21 dias de análise, respectivamente ($p < 0,05$). A combinação da aureocina A53 com a Pep5 resultou em uma redução de, aproximadamente, 2,7 unidades-log UFC/g da contagem de células viáveis ($p < 0,05$), quando comparada com os controles ao final do experimento (**Figura 13**), sugerindo um possível efeito aditivo, ou mesmo um sinergismo, entre ambas as bacteriocinas. Não foi verificada diferença entre os resultados obtidos com as duas estirpes de *S. aureus* ($p > 0,05$).

A ação combinada das estafilococcinas lisostafina e aureocina A53 (**Figura 14**) e da lisostafina e Pep5 (**Figura 15**) resultou em uma queda da população de *S. aureus* similar àquela gerada pela ação isolada da lisostafina ($p > 0,05$). Todavia, a combinação da lisostafina com a aureocina A53 resultou em uma queda da população de *S. aureus* um pouco superior ao decréscimo gerado pela ação isolada da lisostafina, e que foi de aproximadamente 0,4 unidades-log UFC/g para a estirpe Q1. Outro ponto relevante foi que, ao final dos 21 dias de análise, a contagem final de células viáveis para a estirpe Q1, em relação à combinação da aureocina A53 com a lisostafina, foi de aproximadamente 1,56 unidades-log UFC/g e a contagem final de células viáveis para a combinação da Pep5 com a lisostafina foi de 2,58

unidades-log UFC/g, mostrando que a primeira combinação foi mais efetiva do que a segunda em relação à redução da população microbiana. Este efeito não foi observado para estirpe QJ3.

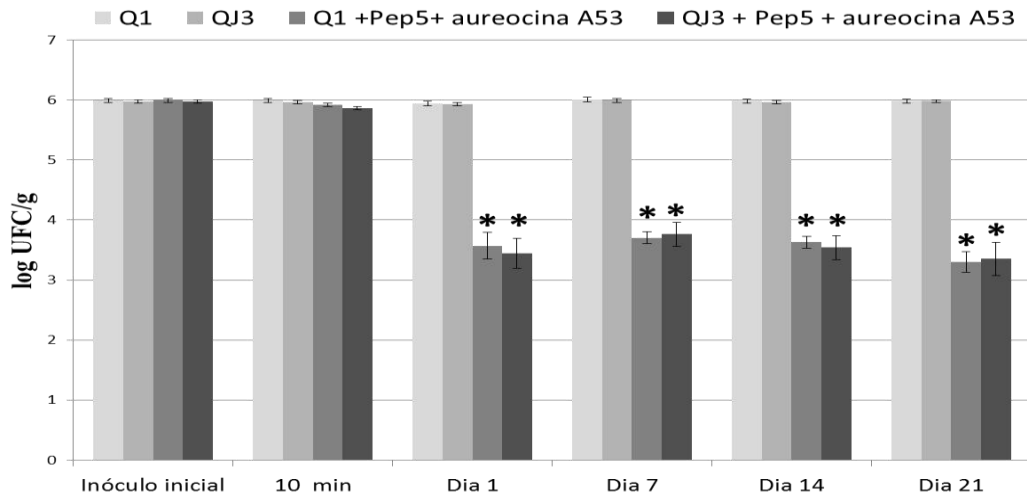


Figura 13. Ação combinada da aureocina A53 e da Pep5 sobre as estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 na matriz de queijo Minas fresco com redução de 25% da concentração de sódio, sob incubação refrigerada a 4 °C. Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em média da contagem de células viáveis \pm desvio-padrão. *, a diferença foi estatisticamente significativa.

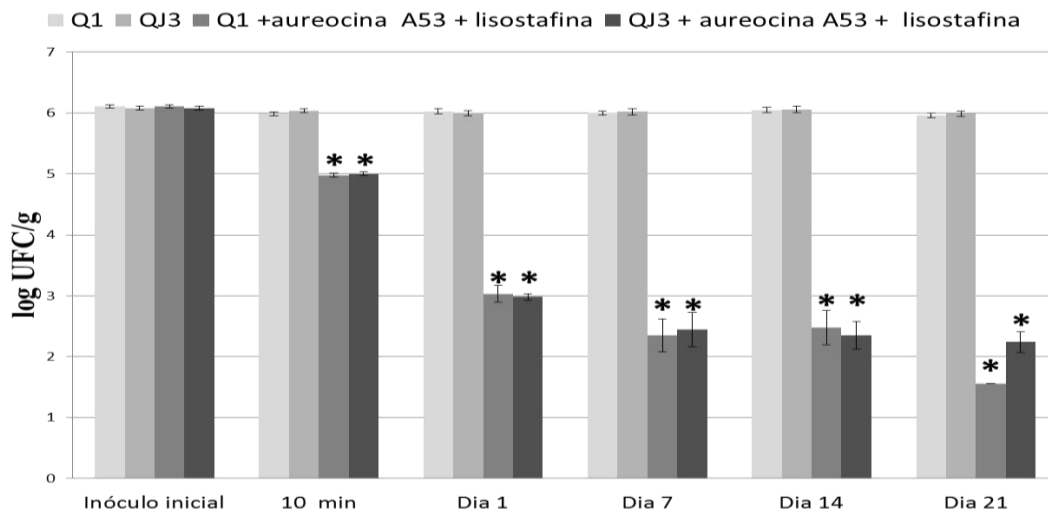


Figura 14. Ação combinada da aureocina A53 e da listofina sobre as estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 na matriz de queijo Minas fresco com redução de 25% da concentração de sódio, sob incubação refrigerada a 4 °C. Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em média da contagem de células viáveis \pm desvio-padrão. *, a diferença foi estatisticamente significativa.

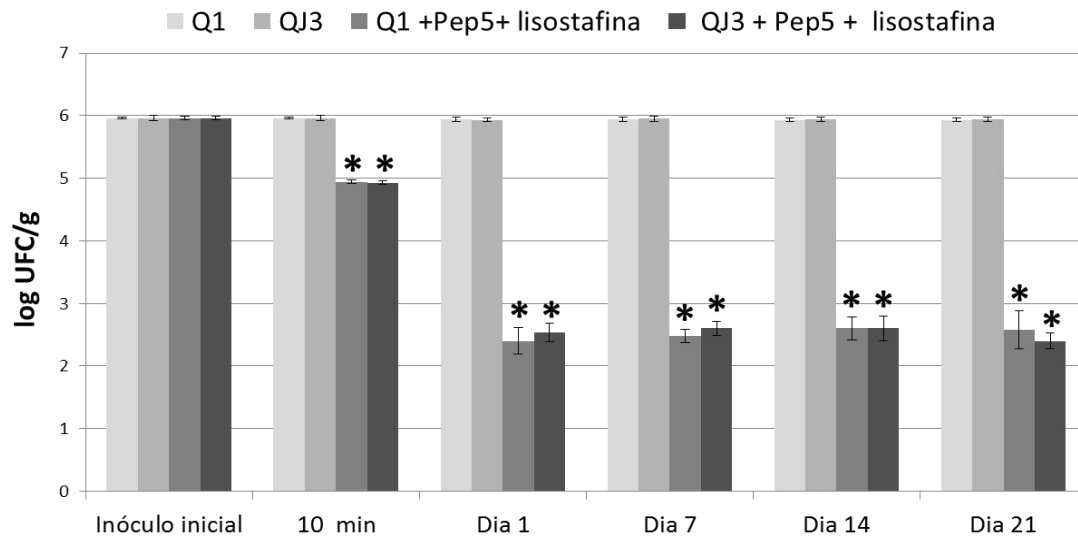


Figura 15. Ação combinada da lisostafina e da Pep5 sobre as estirpes de *S. aureus* Q1 e QJ3 na matriz de queijo Minas frescal com redução de 25% da concentração de sódio, sob incubação refrigerada a 4 °C. Todos os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos em média da contagem de células viáveis \pm desvio-padrão. *, a diferença foi estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

S. aureus é o terceiro patógeno mais vinculado a surtos alimentares, o qual pode causar desde simples infecções até síndromes toxigênicas (Santos *et al.*, 2007; Brasil, 2016). Dentre os alimentos comumente incriminados em intoxicação causada por esta bactéria, destacam-se: produtos cárneos, saladas mistas, panificação e, principalmente, leite e derivados (com ênfase no queijo; Irlinger, 2008).

O queijo é um produto amplamente consumido no mundo pelo fato de estar associado a diversos benefícios à saúde, como incluir na sua composição microrganismos probióticos, ter efeito antitumoral, reduzir os índices de diabetes do tipo II e ser rico em vitaminas e sais minerais (Mozaffarian, 2010; Moshfegh *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2016). Apesar de suas propriedades benéficas, alguns queijos apresentam características físico-químicas que favorecem o crescimento de patógenos (alta atividade de água, pH >5,0 e ausência de biopreservativos), como, por exemplo, o queijo Minas frescal (Souza e Saad, 2009). Importante destacar que este alimento apresenta contribuição decisiva para o consumo de sódio, na forma de NaCl, pela população mundial. Apesar de essencial, quando consumido em altas concentrações, este sal pode levar a problemas cardiovasculares (Wyness, Butriss e Stanner, 2012). Desta forma, a substituição do NaCl por KCl se torna uma opção viável para se solucionar este problema (Gomes *et al.*, 2011). Entretanto, a retirada ou a substituição deste sal afeta negativamente a qualidade microbiológica do queijo, pois o mesmo atua como um inibidor do crescimento de microrganismos (Cruz *et al.*, 2011). Visando resolver esta problemática, diversos trabalhos estudam a adição de substâncias biopreservativas aos alimentos com o intuito de melhorar a sua qualidade microbiológica, como, por exemplo, as bacteriocinas (Fagundes *et al.*, 2016a, b). A aplicação destes compostos se torna mais viável do que se utilizar os antimicrobianos convencionais, por apresentarem características distintas, tais como: (i) não serem, em sua maioria, tóxicos para as células eucarióticas; (ii) serem inativados durante o processamento do alimento pelo sistema digestório; (iii) serem resistentes a uma ampla faixa de pH e temperatura; e (iv) o fato de, em sua maioria, atuarem ao nível de membrana, o que dificulta o aparecimento do fenótipo de resistência (Gálvez *et al.*, 2007; Cotter *et al.*, 2013). Assim, a partir desta diretriz, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de estafilococcinas contra estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos e investigar a potencial utilização industrial desses peptídeos na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio, contaminado artificialmente com algumas dessas estirpes de *S. aureus*.

Neste estudo, 15 estirpes isoladas de alimentos foram identificadas ao nível de espécie, por testes bioquímicos e espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, visando-se encontrar aquelas que fossem *S. aureus*. Destas, apenas seis (40%) apresentaram os fenótipos característicos da referida espécie nos testes bioquímicos. A identificação das estirpes foi confirmada pela espectrometria de massas. Importante destacar que todas essas estirpes de *S. aureus* foram isoladas de queijo, o que representa, entre o grupo de estirpes selecionadas para este estudo, aproximadamente, 67% das estirpes obtidas deste alimento. Não foi encontrada estirpe de *S. aureus* nas amostras de linguiça. A percentagem de estirpes de *S. aureus* encontradas neste trabalho é semelhante aos resultados obtidos por Sabioni e Maia (1998) e por Câmara e colaboradores (2002) que, ao analisarem, respectivamente, 20 e 30 amostras de queijo Minas frescal, constataram que cerca de 70% dos alimentos estavam contaminados com *S. aureus*. A percentagem obtida no presente estudo foi bem maior do que a encontrada por Martins e Reis (2012) que, ao analisarem 40 amostras de queijo Minas frescal vendidas no município de Frutal (MS), relataram que 18 (45%) amostras estavam contaminadas com *S. aureus*. Contudo, outros trabalhos mostram uma grande variação no percentual de amostras de queijo contaminadas por *S. aureus*, onde os valores variam entre 10,7 e 100% (Passos *et al.*, 2009; Komatsu *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2011; Zocche *et al.*, 2012; Lira *et al.*, 2016). As duas principais causas desta variação são a carga microbiana inicial do leite e a contaminação cruzada pelos manipuladores (Franco e Landgraf, 2002).

Devido ao seu potencial patogênico, as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos foram caracterizadas fenotipicamente quanto a importantes fatores de virulência para a indústria alimentícia, os quais foram: a presença dos genes codificadores de enterotoxinas, a susceptibilidade a antimicrobianos e a formação de biofilme.

As estirpes de *S. aureus* foram avaliadas quanto à presença dos genes codificadores de enterotoxinas clássicas e de algumas não-clássicas (SEG, SEH, SEI e SEIJ). O estudo se focou nestes genes, pois estão fortemente relacionados a estirpes isoladas do leite e de seus derivados, como mostram os dados encontrados na literatura (Arcuri *et al.*, 2010; Argudín, Mendoza e Rodício, 2010; Bianchi *et al.*, 2014). Para as enterotoxinas clássicas, apenas as estirpes Q1, Q2 e QJ3 (50%) apresentaram resultado positivo para a presença dos genes codificadores da SEA e da SEB. Estas duas enterotoxinas são as mais importantes para a área clínica e, por isso, Fooladi, Tavakoli e Naderi (2010) analisaram laticíneos fabricados no Irã em busca dos genes codificadores destas toxinas. Os resultados deste estudo mostraram que 15,6% das estirpes possuíam o gene *sea*, 9,3% das estirpes possuíam o gene *seb* e 6,2% das estirpes possuíam ambos os genes. Seyoum e colaboradores (2016) realizaram um estudo de

detecção de genes de enterotoxinas em 109 amostras de leite bovino produzido na Etiópia central, onde os resultados encontrados mostraram que 36,7% das estirpes possuíam o gene *sea*, 17,4% das estirpes possuíam o gene *seb* e 6,2% das estirpes possuíam ambos os genes. O estudo de Nunes e colaboradores (2016) avaliou a presença dos genes codificadores de enterotoxinas em 60 estirpes de SCN recuperadas de queijo Minas frescal comercializado no sudeste do Brasil. Estes pesquisadores observaram que 90% das estirpes possuíam o gene *sea* e 70% das estirpes possuíam o gene *seb*, o que mostra uma alta prevalência destes genes. A discrepância dos resultados obtidos neste estudo em relação aos dados da literatura pode ter ocorrido pela diferença no número de estirpes utilizadas nos trabalhos.

Para as enterotoxinas não-clássicas avaliadas (SEG, SEH, SEI e SEJ), todas as estirpes (100%) apresentaram resultado positivo para a presença do gene codificador da SEH. Este resultado é concordante com a literatura, onde a enterotoxina H tem sido reportada como a enterotoxina estafilocócica não-clássica mais prevalente em leite bovino (Liu *et al.*, 2014, Sato'o *et al.*, 2015). Růžičková e colaboradores (2008) realizaram um estudo na República Checa, no período de 2000 a 2005, e observaram que das 46 estirpes de *S. aureus* carreadoras de genes de enterotoxinas testadas, 28 estirpes (cerca de 60%) carregavam o gene *seh*, sendo este o gene mais prevalente. Ferreira e colaboradores (2016) reportaram que o gene codificador da enterotoxina H foi o gene mais frequentemente detectado nas estirpes de *S. aureus* isoladas das amostras de queijo artesanal analisadas por eles e comercializadas em Goiânia.

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que as estirpes *S. aureus* isoladas de alimentos, estudadas neste trabalho, possuem um alto potencial toxigênico, pois todos os genes codificadores de enterotoxinas encontrados codificam enterotoxinas vinculadas a surtos alimentares (SEA, SEB e SEH; Argudín, Mendoza e Rodício, 2010; Liu *et al.*, 2014).

A detecção de *S. aureus* acima do limite estabelecido pela legislação vigente, em níveis suficientes para a produção de enterotoxinas em queijos, é um potencial risco para a saúde pública. Neste sentido, a capacitação dos manipuladores de alimentos, em conjunto com as condições higiênico-sanitárias adequadas nas áreas de produção de alimentos, se tornam armas fundamentais para se combater o problema. Paralelamente, a identificação de genes codificadores de enterotoxinas, diferentes das clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) nos alimentos, destaca a importância de se investir na pesquisa para que metodologias de detecção mais rápidas e precisas desses fatores de virulência sejam desenvolvidas com o objetivo de garantir a segurança alimentar dos consumidores.

O perfil de resistência das seis estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos a diferentes

antimicrobianos também foi avaliado. Todas as seis estirpes (100%) foram classificadas como resistentes à penicilina e à ampicilina, ambas pertencentes ao grupo dos antimicrobianos β -lactâmicos. O que foi observado, provavelmente, foi o evento de resistência cruzada causada pela ação de uma β -lactamase (Drawz e Bonomo, 2010). A sensibilidade à cefoxitina corrobora esta hipótese, pois indica que as estirpes não são MRSA e, provavelmente, não produzem a proteína PBP2a (CLSI, 2015). Esta prevalência da resistência aos β -lactâmicos é frequentemente encontrada nas estirpes de *S. aureus* isoladas de leite e de seus derivados (Xu *et al.*, 2014). Apenas as estirpes QRHF1, QRHF2 e QRHF3 (50%) apresentaram, ainda, resistência à tetraciclina. Este percentual é concordante com o observado por Yang e colaboradores (2016), onde cerca de 44% das estirpes de *S. aureus* avaliadas por estes autores apresentaram este fenótipo de resistência. Possivelmente, este percentual se dá pelo fato da tetraciclina ser largamente utilizada na criação do gado leiteiro para a prevenção de infecções (Lee *et al.*, 2014).

As estirpes QRHF1, QRHF2 e QRHF3 (50%) também apresentaram resistência à eritromicina e, pelo teste D, resistência induzida à clindamicina, a qual pertence à classe das lincosamidas. Esta percentagem é maior do que a encontrada nos estudos de Li e colaboradores (2015), que identificaram o fenótipo MLS_Bi em 38 (32%) de 121 estirpes de *S. aureus* utilizadas no trabalho. Todavia, esses percentuais indicam altas taxas deste fenótipo em *S. aureus*. Tais dados sugerem que os macrolídeos, as lincosaminas e a estreptogramina B devam ser utilizados com mais cautela no tratamento de mastite bovina causada pelas bactérias pertencentes a esta espécie (Li *et al.*, 2015).

O fenótipo de mutirresistência a antimicrobianos foi observado nas estirpes QRHF1, QRHF2 e QRHF3 (50%), pois estas se mostraram resistentes aos macrolídeos, penicilinas e tetraciclina. Isso é um perigoso reflexo do uso de antimicrobianos (penicilina, tetraciclina e eritromicina, entre outros) como fator de crescimento para animais nas indústrias e fazendas, o que pode resultar em falha terapêutica no tratamento da mastite bovina (Prabhu, Rao e Rao, 2011; Li *et al.*, 2015; Oliver e Wells, 2015; Bagal *et al.*, 2016).

Faz-se importante destacar que todas as estirpes foram sensíveis à vancomicina, pois a detecção da resistência a este antimicrobiano, nos últimos anos, tem se tornado cada vez mais comum em estirpes de *S. aureus* isoladas de fazendas e de alimentos (Lira *et al.*, 2016) e que, em 2016, foi registrado o primeiro caso de isolamento de VRSA a partir de alimentos de origem animal (Bhattacharyya *et al.*, 2016).

Por fim, na etapa de caracterização fenotípica, foi avaliada a capacidade de produção de biofilme pelas estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos. O biofilme é um importante

fator de virulência bacteriano, que leva à redução do efeito de sanitizantes e à contaminação dos alimentos na planta industrial, e que pode elevar os níveis de resistência a antimicrobianos. Essas características levam a grandes perdas econômicas nas indústrias e, por isso, a relevância de sua caracterização (Kroning *et al.*, 2016). No presente trabalho, todas as estirpes foram classificadas como produtoras moderadas de biofilme a partir do crescimento no meio TSB. Importante destacar qual foi a metodologia empregada, pois a produção de biofilme pode ser aumentada sob certas condições, tais como: a adição de glicose ao meio, o estresse por etanol e o estresse osmótico com NaCl (Knobloch *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2009). A formação do biofilme é decorrente da atuação de proteínas específicas: a proteína associada à acumulação, a autolisina E, o fator de agregação A, a proteína de superfície de *Staphylococcus* e a proteína associada ao biofilme, entre outras moléculas de superfície. Esta formação também é dependente de açúcares como o polissacarídeo de adesão intercelular, o qual é considerado uma das principais substâncias envolvidas na sua formação. (Götz, 2002; Potter *et al.*, 2009; Otto, 2013).

Em um estudo publicado por Lira e colaboradores (2016), 45% de 60 estirpes estafilocócicas isoladas de produtos lácteos foram capazes de amplificar o gene *icaD*, o qual está relacionado com a produção de biofilme, pois é um dos genes envolvidos na produção do polissacarídeo de adesão intercelular (Gad *et al.*, 2009; Potter *et al.*, 2009). Desta forma, a detecção deste gene sugere que o operon *icaADBC* esteja presente e que, assim, essas estirpes possam produzir biofilme. Todavia, a presença destes genes não foi avaliada no presente estudo.

Outro ponto importante é que a produção de biofilme dificulta a lise celular nos protocolos de extração do DNA celular. Todavia, a metodologia aplicada neste trabalho para o isolamento do DNA genômico não precisou ser alterada.

A ação de estafilococcinas (aureocina A53, aureocina A70, aureocinas 4185, Pep5, epidermina, hyicina 3682, hyicina 4244, nukacina 3299, estafilococcina C55, lisostafina e estafilococcina 5580), descritas em trabalhos anteriores (**Quadro 5**), foi, então, testada contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, buscando-se verificar quais destas bacteriocinas seriam mais eficientes em inibir o crescimento das estirpes-alvo. Para isso, os seguintes parâmetros foram estabelecidos: (i) a estafilococcina ideal deveria inibir todas as estirpes-alvo testadas; (ii) ter uma média do diâmetro de seus halos de inibição igual ou superior a 11 mm e (iii) um desvio-padrão inferior a 10% da média. Deste modo, as estafilococcinas que se enquadraram nestes três quesitos foram: a aureocina A53, a lisostafina, a hyicina 3682, a hyicina 4244 e a Pep5. Todavia, a hyicina 4244 foi descartada, pois a

metodologia para a sua purificação parcial não era adequada à sua utilização em alimentos. Duarte (2016) utilizou o método de cromatografia de troca catiônica para tentar purificar parcialmente esta estafilococcina, mas, após esta etapa, o eluato acabou perdendo a atividade contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, só havendo atividade contra *M. luteus*. Ou seja, o peptídeo não estava presente na fração final eluída da coluna. A autora, posteriormente, verificou que a hyicina 4244 é uma bacteriocina de caráter aniônico e que, provavelmente, não poderia mesmo ser recuperada por este tipo de cromatografia. Porém, uma possível interação deste sactibiótico aniônico com uma molécula catiônica poderia levar à copurificação de ambos os compostos. Desta forma, a melhor metodologia para a sua purificação é a extração do sactibiótico, a partir do sobrenadante da cultura, com 1-butanol e, após evaporação, a eluição em metanol, para que ele possa ser submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (Duarte, 2016). Todavia aplicar este método na indústria de alimentos se torna praticamente inviável, pois o composto estará eluído em um solvente orgânico nocivo à saúde do consumidor e porque o processo de purificação é muito oneroso.

Relevante destacar que a aureocina A70 sozinha não inibiu o crescimento de todas as estirpes-alvo, mas, no momento em que esta bacteriocina foi utilizada em conjunto com a aureocina 53, a combinação dos peptídeos gerou um halo de inibição com valor superior ao gerado pela aureocina 53 sozinha, mostrando, assim, um possível efeito aditivo ou sinergismo entre estas estafilococcinas, o qual já havia sido observado contra estirpes de *S. aureus* e *Staphylococcus agalactiae* envolvidas em mastite bovina (Coelho *et al.*, 2007).

A fim de se identificar o modo de ação das estafilococcinas selecionadas e parcialmente purificadas sobre as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, foi empregada a metodologia descrita por Ceotto e colaboradores (2010b). A avaliação de tal característica se torna fundamental quando se pretende aplicar as bacteriocinas como biopreservativos. O modo de ação ideal é o bacteriolítico, pois elimina completamente as células microbianas.

Os resultados do modo de ação mostraram uma atividade bactericida (e bacteriolítica) da aureocina A53, da lisostafina e da Pep5 contra as estirpes de *S. aureus*, e uma redução de crescimento das estirpes de *S. aureus* pela hyicina 3682, quando comparadas com os controles. Desta forma, as bacteriocinas que levaram a uma acentuada redução da DO ao longo do tempo (Pep5, aureocina A53 e lisostafina) foram utilizadas nos testes subsequentes.

Os resultados obtidos para as bacteriocinas que tiveram o perfil lítico frente às estirpes-alvo já eram esperados, pois estudos anteriores já descreveram esta característica, tais como: Netz, Bastos e Sahl (2002), para a aureocina A53; Browder e colaboradores (1965), para a lisostafina; e Sahl e Brandis (1982), para a Pep5. A lise celular causada por estas

estafilococcinas ocorre por diferentes formas: para a aureocina A53, a sua atividade bacteriolítica deriva da permeação da membrana através de sua destruição generalizada; para a lisostafina, a sua atividade bacteriolítica deriva da sua ação específica sobre a pentaglicina das ligações cruzadas da parede celular; e para a Pep5, a sua atividade deriva da formação de poros na membrana celular, que leva ao efluxo de íons e à despolarização da membrana, e da inibição da síntese de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos.

A fim de se avaliar a capacidade biopreservativa das estafilococcinas parcialmente purificadas contra *S. aureus* nas matrizes de queijo, cada uma das bacteriocinas escolhidas foi testada, separadamente, e em combinação, contra as estirpes de *S. aureus* isoladas de alimentos, em cada um dos três tipos de matrizes de queijo Minas preparadas: NaCl 100%, NaCl/KCl – 75/25% e NaCl/KCl – 50/50%.

O primeiro ponto a ser discutido neste experimento é a contagem de células viáveis nos controles não-tratados com as bacteriocinas que se manteve em cerca de 10^6 UFC/g, mostrando que ambas as estirpes de *S. aureus*, Q1 e QJ3, não foram capazes de crescer em termos populacionais sob refrigeração a 4 °C. Os resultados são concordantes com os dados encontrados na literatura para estas bactérias mesófilas, as quais têm a sua taxa máxima de crescimento a 37 °C, sendo que baixas temperaturas de estocagem são capazes de diminuir drasticamente a velocidade da sua divisão celular (Bannerman e Peacock, 2007).

Em relação à ação individual de cada bacteriocina, a preparação da lisostafina apresentou o melhor resultado, onde foi capaz de reduzir a população inicial de *S. aureus* de 10^6 UFC/g a contagens inferiores a 10^3 UFC/g nas três matrizes de queijo, logo nas primeiras 24 h de incubação refrigerada, sendo que, após 21 dias de incubação, a população de *S. aureus* foi reduzida para valores inferiores ou iguais a 2,0 unidades-log UFC/g. Este resultado é muito satisfatório, pois, de acordo com a RDC 12 (Brasil, 2001), o limite máximo permitido para a presença de *S. aureus* em queijos Minas frescal é de 10^3 UFC/g. Ainda vale a pena ressaltar que a redução da contagem de células viáveis para valores inferiores à concentração de 10^5 UFC/g impede que ocorra o acúmulo de enterotoxinas que seja suficiente para causar danos ao consumidor (Silva, 2013).

Os resultados referentes à ação inibitória das estafilococcinas aureocina A53 e Pep5 foram menos expressivos do que os obtidos para a lisostafina, embora significativos em relação à maioria dos seus controles. Importante relatar que a inibição causada por estes peptídeos resultou em uma contagem final de células viáveis inferior à concentração de 10^5 UFC/g, exceto para a estirpe Q1 no queijo Minas frescal com 25% de redução da concentração de sódio em relação a aureocina A53. Como dito anteriormente, contagens

inferiores a 10^5 UFC/g não são suficientes para que haja o acúmulo de enterotoxinas que cause intoxicação ao consumidor (Silva, 2013).

Nossos resultados mostraram ser bem promissores quando comparados ao uso de outras bacteriocinas em ensaios semelhantes descritos na literatura. Pimentel-Filho e colaboradores (2014), ao avaliarem os efeitos da nisina e da bovicina HC5 sobre *S. aureus* em uma matriz de queijo Minas frescal, verificaram que a adição de 600 UI/g de cada bacteriocina foi capaz de reduzir em apenas 1 unidade-log a população inicial de *S. aureus* ATCC 6538 de 10^4 UFC/g, após 15 dias de armazenagem refrigerada. Felicio e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da nisina *in vivo* e *in situ* sobre *S. aureus*. Os autores relataram que a bacteriocina na concentração de 500 UI/ml foi capaz de reduzir, respectivamente, em 2 e 3 unidades-log UFC/ml, o crescimento bacteriano no coalho e no soro do leite obtidos na produção do queijo, quando comparado ao controle. Todavia, a nisina não apresentou resultados promissores na matriz queijo, onde foi observada uma leve redução do crescimento bacteriano, quando comparado ao controle, no final do experimento.

Segundo alguns autores, a baixa inibição do crescimento de *S. aureus* pela nisina pode ser atribuída ao pH mais elevado do queijo Minas Frescal (geralmente, entre 5,9 e 6,6, durante a armazenagem), uma vez que a nisina é mais eficiente em pH baixo (Tong, Ni e Ling, 2014; Felicio *et al.*, 2015). Além disso, esta bacteriocina pode se ligar à caseína, tornando-se indisponível para a atividade antagonica contra as bactérias (Aly *et al.*, 2012).

Nossos resultados com as estafilococcinas sugerem que este tipo de interação com a caseína não ocorra, ou ocorra em baixas proporções, e que o pH do queijo durante a estocagem refrigerada não tenha um efeito limitante na ação dessas bacteriocinas sobre *S. aureus*. Assim sendo, as estafilococcinas lisostafina, aureocina A53 e Pep5 parecem apresentar vantagens em relação à nisina. Na maioria dos casos, as bacteriocinas selecionadas foram capazes de reduzir a contagem de células viáveis em valores de unidades-log superiores à contagem dos experimentos com a nisina, mesmo empregando-se uma carga microbiana mais elevada. Outro ponto a ser ressaltado é que os queijos utilizados nos testes com a nisina foram produzidos sem a substituição do NaCl por KCl, ou seja, esses queijos possuíam uma barreira antimicrobiana extra em relação àquelas aplicadas neste trabalho, em que se empregou reduzida concentração de sódio, e, mesmo assim, os resultados encontrados pelos autores que trabalharam com aquele lantibiótico foram menos expressivos.

Em relação aos resultados obtidos para os diferentes tipos de matrizes alimentares utilizadas, pôde-se observar que a variação no percentual de sódio/potássio utilizado na salga

do queijo, aparentemente, não influenciou a ação antimicrobiana da Pep5 e nem da lisostafina nos diferentes tipos de queijo. Todavia para a aureocina A53, foi observada uma efetividade menor na redução da contagem de células viáveis no queijo com 25% de redução da concentração de sódio, a partir do décimo-quarto dia de experimento, do que nas demais condições. Este resultado contrasta com os demais obtidos neste trabalho e mais análises serão necessárias para que se possa apontar uma possível causa para este fenômeno. O fato da variação da concentração de NaCl não influenciar a ação das estafilococcinas na maioria das condições é uma característica muito promissora, pois abre precedente para a sua aplicação em outros produtos em que a estratégia de substituição do sódio por potássio possa ser utilizada.

Silva e colaboradores (2012) avaliaram a capacidade biopreservativa de outra substância antimicrobiana no queijo Minas frescal contra *S. aureus*, a lactoferrina, um composto ligante de ferro. Os resultados mostraram que as duas concentrações de lactoferrina testadas [2% (m/m) e 4% (m/m)] atuaram, inicialmente, com atividade bacteriostática nos queijos contaminados com $5,0 \times 10^2$ UFC/g de *S. aureus*. Ao longo do experimento, foi observada a atividade bactericida depois de 15 dias de estocagem, para a lactoferrina a 2%, e depois de oito dias de estocagem, para a lactoferrina a 4%, com completa eliminação da estirpe-alvo ao final dos 22 e 15 dias, respectivamente. O composto quelante de ferro teve o seu modo de ação muito parecido com o das estafilococcinas empregadas neste trabalho e, desta forma, a possível combinação dessas substâncias pode ser uma interessante ideia a ser explorada em trabalhos futuros pelo grupo.

A combinação da aureocina A53 com a Pep5 levou a uma maior redução da população bacteriana, quando comparada com os resultados destas bacteriocinas separadamente. Uma possível justificativa para este resultado seria o modo de ação distinto destas bacteriocinas.

Já as quedas observadas da população de *S. aureus*, resultantes da ação combinada da lisostafina com a aureocina A53 e da lisostafina com a Pep5, foram similares, na maioria dos casos, àquelas geradas pela ação isolada da lisostafina, sugerindo duas hipóteses: (i) que esta bacteriocina atue mais rapidamente nas células, não sendo possível se verificar a ação da aureocina A53 e da Pep5, ou (ii) que a combinação daquelas bacteriocinas com a lisostafina não apresentem efeito aditivo ou sinergismo contra as estirpes de *S. aureus* empregadas.

Importante destacar que, após os 21 dias de análise, o aspecto sensorial dos queijos Minas frescal contendo as bacteriocinas aureocina A53 ou Pep5 foi muito superior quando comparado aos controles (dados não apresentados). Isso ocorreu, provavelmente, pois estas duas bacteriocinas, tendo um amplo espectro de ação, atuaram também sobre a microbiota

deteriorante do alimento, diferentemente do que ocorreu com a lisostafina, a qual tem um modo de ação muito específico, provavelmente, atuando apenas nas células de *S. aureus*.

Por fim, em nenhum dos experimentos, foi observada a eliminação total das células microbianas, apenas a redução máxima de cerca de 4 unidades-log da contagem de células viáveis. Uma possível maneira de se resolver este problema seria a aplicação de uma maior concentração de estafilococinas. Todavia, outros compostos ou metodologias podem também ser empregados em conjunto com as estafilococinas para melhorar os resultados obtidos, tais como: a lactoferrina (Silva *et al.*, 2012), especiarias (Carocho *et al.*, 2016) e óleos essenciais (Bustos, Alberti e Matiacevich, 2016), entre outros.

Muitos estudos ainda podem ser feitos quanto à aplicação das estafilococinas como biopreservativos em matriz queijo, mas é inegável o fato de que a aureocina A53, a Pep5 e a lisostafina se tornaram excelentes candidatas para futuras pesquisas na área, representando este trabalho o primeiro estudo a investigar o potencial de utilização de estafilococinas na biopreservação de queijo Minas frescal.

7. CONCLUSÕES

Das 15 estirpes isoladas de alimentos, apenas seis foram identificadas como *S. aureus* e todas elas apresentaram fatores de virulência muito problemáticos para a saúde pública e para a indústria de alimentos, tais como: resistência a antimicrobianos, produção de biofilme e genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas. Dentre as 12 estafilococinas testadas quanto ao espectro de ação em meio sólido, apenas quatro foram utilizadas nas etapas subsequentes do trabalho: a aureocina A53, a Pep5, a lisostafina e a hyicina 3682. Estas bacteriocinas, ao serem submetidas ao teste de modo de ação, apresentaram, em sua maioria, um perfil bacteriolítico, com exceção da hyicina 3682 que levou, apenas, à redução do crescimento bacteriano. As estafilococinas líticas foram utilizadas nos testes de avaliação de crescimento de *S. aureus* em matriz queijo com teor reduzido de sódio onde, todos os compostos geraram resultados muito expressivos, levando à redução significativa da contagem de células viáveis. Independentemente da ação antimicrobiana extremamente satisfatória das estafilococinas nos alimentos testados, não se pode esquecer que esses compostos são apenas uma ferramenta complementar às Boas Práticas de Fabricação (BPF) de alimentos e nunca deverão ser utilizados com o objetivo de substituí-las.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abee, T., Klaenhammer, T.R. e Letellier, L. (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1006-1013.
- ABIA (2013). Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. Cenário do consumo de sódio no Brasil. Estudo elaborado com base em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em <http://www.abia.org.br/sodio/Sodio2.pdf>. Acesso em 07 de junho de 2016.
- Allgaier, H., Jung, G., Werner, R.G., Schneider, U. e Zahner, H. (1986). Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* 160, 9-22.
- Al-Rubaye, A.A., Couger, M.B., Ojha, S., Pummill, J.F., Koon II, J.A., Wideman Jr, R.F. e Rhoads, D.D. (2015). Genome analysis of *Staphylococcus agnetis*, an agent of lameness in broiler chickens. *PloS One* 10, 1-18.
- Aly, S., Floury, J., Piot, M., Lortal, S., e Jeanson, S. (2012). The efficacy of nisin can drastically vary when produced *in situ* in model cheeses. *Food Microbiol.*, 32, 185-190.
- Andrade, A.P.C., Borges, M.F., Figueiredo, E.A.T., Machado, T.F. e Porto, B.C. (2011). Perfil de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho. *B. Pesq. Desenv.* 52, 1-18.
- Araújo, S.A. e Bastos, M.C.F. (1995). Incompatibility and molecular relationships between small bacteriogenic plasmids of *Staphylococcus aureus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 525-528.
- Arcuri, E.F., Ângelo, F.F., Guimarães, M.F.M., Talon, R., Borges, M.F., Leroy, S., Loiseau, G., Lange, C.C., Andrade, N.J. e Montet, D. (2010). Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. *J. Food Prot.* 73, 2225-2231.
- Argudín, M.A., Mendoza, M.C. e Rodicio, M.R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins* 2, 1751-1773.
- Ayeni, F.A., Gbaradon, T., Andersen, C. e Nørskov-Lauritsen, N. (2015). Comparison of identification and antimicrobial resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from Amassoma, Bayelsa state, Nigeria. *Afr. Health Sci.* 15, 1282-1288.
- Bagal, V.L., Khatta, V.K., Tewatia, B.S., Sangwan, S.K. e Raut, S.S. (2016). Relative efficacy of organic acids and antibiotics as growth promoters in broiler chicken. *Vet. World* 9, 377-382.
- Bannerman, T.L. e Peacock, S.J. (2007). *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgeman, J.H., Landy, M.L. e Pfaller, J.M.A., eds. 9th ed. (Washington DC: ASM Press), pp. 390-411.
- Bastos, M.C.F., Ceotto, H., Coelho, M.L.V. e Nascimento, J.S. (2009) Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 38-61.
- Bastos, M.C.F., Coutinho, B.G. e Coelho, M.L.V. (2010). Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals* 3, 1139-1161.
- Becker, K., Heilmann, C. e Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870-926.
- Bhattacharyya, D., Banerjee, J., Bandyopadhyay, S., Mondal, B., Nanda, P.K., Samanta, I., Mahanti, A., Das, A.K., Das, G., Dandapat, P. e Bandyopadhyay, S. (2016). First report on vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microb. Drug Resist.* 10.1089/mdr.2015.0330.
- Bianchi, D.M., Gallina, S., Bellio, A., Chiesa, F., Civera, T., e Decastelli, L. (2014). Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 190-196.
- Bierbaum, G. e Sahl, H.-G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 2-18.
- Brasil (1997). Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. O Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento institui o regulamento técnico para a fixação de identidade e qualidade do queijo minas frescal. In: Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, diet, light enriquecidos. Santos, J.A., ed. (São Paulo: Fonte), pp. 76-78.
- Brasil (2001). Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos

- para alimentos. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html. Acesso em 02 maio 2016.
- Brasil (2016). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis por Alimentos – Agosto 2016. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em 23 agosto 2016.
- Brede, D.A., Faye, T., Johnsborg, O., Odegard, I., Nes, I.F. e Holo, H. (2004). Molecular and genetic characterization of propionin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7303-7310.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. e Sahl, H.-G. (1995). Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? Antimicrob. Agents Chemother. 39, 714-719.
- Browder, H.P., Zygmunt, W.A., Young, J.R. e Tavormina, P.A. (1965). Lysostaphin: enzymatic mode of action. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 383-389.
- Burgos, M.J.G., Aguayo, M., Pulido, R.P., Gálvez, A. e López, R.L. (2015). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in oat and soya drinks by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. J. Food Sci. 80, M2030-M2034.
- Bustos, R.O.C., Alberti, F.V.R. e Matiacevich, S.B. (2016). Edible antimicrobial films based on microencapsulated lemongrass oil. J. Food Sci. Technol. 53, 832-839.
- Câmara, S.A.V.; Amaral, G.B.; Muller, M.T.; Silveira, K.C.S.; Almeida, T.N. e Medeiro, C.F. (2002). Avaliação microbiológica de queijo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. R. Hig. Alim. 101, 32-36.
- CanBioicin (2016). Meet our founders. CanBioicin, Alberta. Disponível em <http://canbiocin.ca>. Acesso em 26 maio 2016.
- Carocho, M., Barros, L., Barreira, J.C., Calhelha, R.C., Soković, M., Fernández-Ruiz, V., Buelga, C.S., Morales, P. e Ferreira, I.C.F.R. (2016). Basil as functional and preserving ingredient in “Serra da Estrela” cheese. Food Chem. 207, 51-59.
- Casanova, C., Iselin, L., von Steiger, N., Droz, S. e Sendi, P. (2011). *Staphylococcus hyicus* bacteremia in a farmer. J. Clin. Microbiol. 49, 4377-4378.
- CDC (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51, 565-567.
- Ceotto, H., Brede, D., Salehian, Z., Nascimento, J.S., Fagundes, P.C., Nes, I.F. e Bastos, M.C.F. (2010a). Aureocins 4185, bacteriocins produced by *Staphylococcus aureus* 4185: potential application in food preservation. Foodborne Pathog. Dis. 7, 1255-1262.
- Ceotto, H., Holo, H., Costa, K.F.S., Nascimento, J.S., Salehian, S., Nes, I.F. e Bastos, M.C.F. (2010b). Nukacin 3299, an anti-streptococci and anti-staphylococci bacteriocin produced by *Staphylococcus simulans* 3299. Vet. Microbiol. 146, 124-131.
- Chiang, Y.C., Liao, W.W., Fan, C.M., Pai, W.Y., Chiou, C.S. e Tsen, H.Y. (2008). 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.
- Choi, K.-H., Lee, H., Lee, S., Kim, S. e Yoon, Y. (2016). Cheese microbial risk assessments — a review. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 29, 307-314.
- Chopra, L., Singh, G., Jena, K.K. e Sahoo, D.K. (2015). Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. Sci. Rep. 5, 1-13.
- Cleaveland, S., Laurenson, M.K. e Taylor, L.H. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356, 991-999.
- CLSI (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, P.A.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coelho, M.L.V., Nascimento, J.S., Fagundes, P.C., Madureira, D.J., Oliveira, S.S., Brito, M.A.V.P. e Bastos, M.C.F. (2007). Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus*

agalactiae involved in bovine mastitis. Res. Microbiol. 158, 625-630.

Coelho, M.L.V., Coutinho, B.G., Santos, O.C.S., Nes, I.F. e Bastos, M.C.F. (2014). Immunity to the *Staphylococcus aureus* leaderless four-peptide bacteriocin aureocin A70 is conferred by AurI, an integral membrane protein. Res. Microbiol. 165, 50-59.

Coelho, M.L.V., Duarte, A.F.S. e Bastos, M.C.F. (2017). Bacterial labionin-containing peptides and sactibiotics: unusual types of antimicrobial peptides with potential use in clinical settings (a review). Curr. Top. Med. Chem. 17, 1-22.

Cotter, P.D., Hill, C. e Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3, 777-788.

Cotter, P.D., Ross, R.P. e Hill, C. (2013). Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics? Nat. Rev. Microbiol. 11, 95-105.

Cruz, A.G., Faria, J.A., Pollonio, M.A., Bolini, H.M., Celeghini, R.M., Granato, D. e Shah, N.P. (2011). Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. Trends Food Sci. Technol. 22, 276-291.

David, M.Z. e Daum, R.S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin. Microbiol. Rev. 23, 616-687.

DeLeo, F.R. e Chambers, H.F. (2009). Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. J. Clin. Invest. 119, 2464-2474.

Dischinger, J., Chipalu, S.B. e Bierbaum, G. (2014). Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. Int. J. Med. Microbiol. 304, 51-62.

Drawz, S.M. e Bonomo, R.A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. Clin. Microbiol. Rev., 23, 160-201.

Duarte, A.F.S. (2016). Caracterização genético-molecular da hycina 4244 e avaliação da sua potencial aplicação biotecnológica. Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)] – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 240f.

Duarte, A.F.S., Ceotto, H., Coelho, M.L.V., Brito, M.A.V.P. e Bastos, M.C.F. (2013). Identification of new staphylococcins with potential application as food biopreservatives. Food Control 32, 313-321.

Durack, E., Alonso-Gomez, M. e Wilkinson, M.G. (2008). Salt: a review of its role in food science and public health. Curr. Res. Nutr. Food Sci. 4, 290-297.

Fagundes, P.C. (2014). Caracterização da hycina 3682 e avaliação do seu potencial de aplicação biotecnológica contra um fitopatógeno de tomate. Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)] – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 216f.

Fagundes, P.C., Ceotto, H., Potter, A., Brito, M.A.V.P., Brede, D., Nes, I.F. e Bastos, M.C.F. (2011). Hycin 3682, a bioactive peptide produced by *Staphylococcus hyicus* 3682 with potential applications for food preservation. Res. Microbiol. 162, 1052-1059.

Fagundes, P.C., Farias, F.M., Santos, O.C.S., Oliveira, N.E.M., Paz, J.A.S., Ceotto-Vigoder, H., Alviano, D.S., Romanos, M.T.V. e Bastos, M.C.F. (2016a). Aureocin A53, an antimicrobial peptide, as an alternative agent for food biopreservation in dairy products. J. Appl. Microbiol. 121, 435-444.

Fagundes, P.C., Farias, F.M., Santos, O.C.S., Paz, J.A.S., Ceotto-Vigoder, H., Alviano, D.S., Romanos, M.T.V. e Bastos, M.C.F. (2016b). The four-component aureocin A70 as a promising agent for food biopreservation. Int. J. Food Microbiol. 237, 39-46.

FAO/WHO (2008a). Food and Agricultural Organization/World Health Organization. Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables: Meeting Report. In: Microbiological Risk Assessment Series, Rome: Pre-publication version, 25p.

FAO/WHO (2008b). Food and Agricultural Organization/World Health Organization. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities. In: Microbiological Risk Assessment Series, 53p.

Felicio, B.A., Pinto, M.S., Oliveira, F.S., Lempk, M.W., Pires, A.C.S. e Lelis, C.A. (2015). Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. J. Dairy Sci. 98, 4364-4369.

Férriz, G., Petrova, M.I., Andrei, G., Huskens, D., Hoorelbeke, B., Snoeck, R., Vanderleyden, J., Balzarini, J.,

- Bartoschek, S., Brönstrup, M., Süßmuth, R.D. e Schols, D. (2013). The lantibiotic peptide labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications. *PLoS One* 8, e64010.
- Ferreira, M.A., Bernardo, L.G., Neves, L.S., Campos, M.R.H., Lamaro-Cardoso, J. e André, M.C.P. (2016). Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. *J. Dairy Sci.* 99, 8589-8597.
- Fooladi, A.I., Tavakoli, H.R., e Naderi, A. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. *Iran. J. Microbiol.* 2, 135-140.
- Flores, M.R., Ordoñez, O.F., Maldonado, M.J. e Fariás, M.E. (2009). Isolation of UV-B resistant bacteria from two high altitude Andean lakes (4,400 m) with saline and non saline conditions. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55, 447-458.
- Forsythe, S.J. (2002). *Microbiologia da segurança alimentar*. 2ª ed. (Porto Alegre, Artmed), pp. 424.
- Foster, G., Ross, H.M., Hutson, R.A. e Collins, M.D. (1997). *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 724-726.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. e McSweeney, P.L.H. (2000). *Fundamentals of cheese science*. 1st ed. (Gaithersburg: Aspen Publ.), pp. 587.
- Franco, B.D.G. e Landgraf, M. (2002). *Microbiologia dos Alimentos*. 2ª ed. (São Paulo: Atheneu), pp. 182.
- Frédéricq, P. (1946). Sur la sensibilité et l'activité antibiotique des staphylococciques. *C. R. Soc. Biol.* 140, 1167-1170.
- Freitas, E.I. (2005). Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 119f.
- Gabrielsen, C., Brede, D.A., Nes, I.F. e Diep, D.B. (2014). Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6854-6862.
- Gad, G., El-Feky, M., El-Rehewy, M., Hassan, M., Abolella, H. e El-Baky, R. (2009). Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J. Infect. Dev. Ctries* 3, 342-351.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. e Ben-Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51-70.
- Gálvez, A., López, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E. e Ben-Omar, N. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 125-152.
- García, P., Martínez, B., Rodríguez, L. e Rodríguez, A. (2010). Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 151-155.
- Garrity, G.M. e Holt, J.G. (2001). Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. (New York:Springer-Verlag), pp. 155-166.
- Germano, P.M.L. e Germano, M.I.S. (2011). *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 4ª ed. (São Paulo: Livraria Varela), pp. 1088.
- Giambiagi-deMarval, M., Mafra, M.A., Penido, E.G.C. e Bastos, M.C.F. (1990). Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1591-1599.
- Gomes, A.P., Cruz, A.G., Cadena, R.S., Celeghini, R.M.S., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., Pollonio, M.A.R. e Granato, D. (2011). Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. *J. Dairy Sci.* 94, 2701-2706.
- Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43, 1367-1378.
- Grisi T.C.S. e Gorlach-Lira, K. (2005). Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Braz. J. Microbiol.*, 36, 151-156.
- Grummer, J., Bobowski, N., Karalus, M., Vickers, Z. e Schoenfuss, T. (2013). Use of potassium chloride and flavor enhancers in low sodium Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96, 1401-1418.
- Hampikyan, H. (2009). Efficacy of nisin against *Staphylococcus aureus* in experimentally contaminated sucuk, a turkish-type fermented sausage. *J. Food Prot.* 72, 1739-1743.

- Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W. e Tagg, J.R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: *Bacteriocins: ecology and evolution*. Riley, M.A. e Chavan, M.A., eds. 1st ed. (New York, Springer), pp. 45-83.
- Hennekinne, J.A., Ostyn, A., Guillier, F., Herbin, S., Pruger, A.L. e Dragacci, S. (2010). How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins* 1, 2106-2116.
- Hennekinne, J.A., De Buyser, M.L. e Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 815-836.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, K., Yabuta, T., Oguri, T. e Tenover F.C. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 135-146
- Hoffmann, A., Tanja, S., Pag, U. e Sahl, H.-G. (2011). Localization and functional analysis of PepI, the immunity peptide of Pep5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3263-3271.
- Holo, H., Nilssen, Ø. e Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173, 3879-3887.
- Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 302-310.
- Jack, R.W., Tagg, J.G. e Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
- Johnson, M.E., Kapoor, R., McMahon, D.J., McCoy, D.R. e Narasimmon, R.G. (2009). Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects. *Compr. Rev. Food Sci. F. Saf.* 8, 252-268.
- Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R. e Rozee, K.R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 426-430.
- Kang, J., Stasiewicz, M.J., Murray, D., Boor, K.J., Wiedmann, M. e Bergholz, T.M. (2014). Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 179, 1-9.
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J. e Saito, T. (2004). The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 393-398.
- Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P. e Vederas, J.C. (2003). Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to α -carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4726-4727.
- K rouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. e De Buyser, M.L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369-375.
- Kim, M.J., Jung, M. e Kim, W.J. (2015). Antilisterial effect of bacteriocin SH01, obtained from *Enterococcus faecium* SH01, in ground beef. *Korean J. Food Sci. An.* 35, 211-215.
- Kloos, W.E. e Bannerman, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 117-140.
- Knobloch, J.K.M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H. e Mack, D. (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* 183, 2624-2633.
- Komatsu, R.S., Rodrigues, M.A.M., Lorenzo, W.B.N. e Santos, K.A. (2010). Ocorr ncia de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo minas frescal produzidos em Uberlândia. *Biosci. J.* 26, 316-321.
- Koneman, E.W. (2008). Cocos Gram-positivos. Parte I: Estafilococos e cocos Gram-positivos relacionados. In: *Diagnóstico Microbiológico – texto e  tlas colorido*, 6^a ed. (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), pp. 618-665.
- Kroning, I.S., Iglesias, M.A., Sehn, C.P., Gandra, T.K.V., Mata, M.M., e Silva, W.P. (2016). *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: Biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiol.* 58, 105-111.
- Kumar, D., Cawley, J.J., Irizarry-Alvarado, J.M., Alvarez, A. e Alvarez, S. (2007). Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. *Transpl.*

Infect. Dis. 9, 336-338.

Lampert, Y., Kalman, D., Nitzan, Y., Dubinsky, Z., Behar, A. e Hill, R.T. (2008). Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 187-198.

Lancette, G.A. e Bennett, R.W. (2001). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Downes, F.P. e Ito, K., eds. 4th ed. (Washington, American Public Health Association), pp. 359-379.

Lee, H., Churey, J.J. e Worobo, R.W. (2009). Biosynthesis and transcriptional analysis of thuringin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiol. Lett.* 299, 205-213.

Leekitcharoenphon, P., Pamp, S.J., Andresen, L.O. e Aarestrup, F.M. (2016). Comparative genomics of toxigenic and non-toxigenic *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microbiol.* 185, 34-40.

Leiva, S., Alvarado, P., Huang, Y., Wang, J. e Garrido, I. (2015). Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, fnv 206.

Lira, M.C., Givisiez, P.E.N., Sousa, F.G.C., Magnani, M., Souza, E.L., Spricigo, D.A., Gebreyes, W.A. e Oliveira, C.J.B. (2016). Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. *J. Infect. Dev. Ctries.* 10, 932-938.

Li, L., Feng, W., Zhang, Z., Xue, H. e Zhao, X. (2015). Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Vet. Res.* 11, 1-8.

Liu, X., Basu, U., Miller, P. e McMullen, L.M. (2014). Stress response and adaptation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to a sublethal dose of carnocyclin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3835-3841.

Liu, Y., Chen, W., Ali, T., Alkasir, R., Yin, J., Liu, G. e Han, B. (2014). Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells *in vitro*. *Toxins* 6, 3552-3567.

Liu, Y., Shi, W., An, J., Zhao, Y., Ye, R. e Xu, C. (2014). Diversity of antimicrobial bacteria associated with *Siganus fuscescens* from Naozhou island in Zhanjiang, China. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 54, 582-588.

LPSN (2016). List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.net>. Acesso em 29 de abril de 2016.

Mahesh, C.B., Ramakant, B.K. e Jagadeesh, V.S. (2013). The prevalence of inducible and constitutive clindamycin resistance among the nasal isolates of staphylococci. *J. Clin. Diagn. Res.* 7, 1620-1622.

Maqueda, M., Gálvez, A., Bueno, M.M., Sanchez-Barrena, M.J., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M. e Valdivia, E. (2004). Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 399-416.

Martin, J.G.P. (2015). Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal. Tese de Doutorado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 135f.

Martin, N.I., Sprules, T., Carpenter, M.R., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. e Vederas, J.C. (2004). Structural characterization of lactacin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry* 43, 3049-3056.

Martin-Visscher, L.A., van Belkum, M.J., Garneau-Tsodikova, S., Whittal, R.M., Zheng, J., McMullen, L.M. e Vederas, J.C. (2008). Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4756-4763.

Martin-Visscher, L.A., Yoganathan, S., Sit, C.S., Lohans, C.T. e Vederas, J.C. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol. Lett.* 317, 152-159.

Martins, E.S. e Reis, N.E.V. (2012). Determinação de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas frescal. *Rev. Bras. Tec. Agro.* 6, 842-851.

Mathur, H., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C. e Ross, R.P. (2015). The sactibiotic subclass of bacteriocins: an update. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 549-558.

Mattick, A.T.R., Hirsch, A. e Berridge, N.J. (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* 2, 5-7.

- Meyer, C., Bierbaum, G., Heidrich, C., Reis, M., Süling, J., Iglesias-Wind, M.I., Molitor, E. e Sahl, H.-G. (1995). Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC. *Eur. J. Biochem.* 232, 478-489.
- Moshfegh, A.J., Holden, J.M., Cogswell, M.E., Kuklina, E.V., Patel, S.M., Gunn, J.P., Gillespie, C., Hong, Y., Merritt, R. e Galuska, D.A. (2012). Vital signs: food categories contributing the most to sodium consumption – United States, 2007-2008. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* 61, 92-98.
- Mozaffarian, D., Cao, H., King, I.B., Lemaitre, R.N., Song, X., Siscovick, D.S. e Hotamisligil, G.S. (2010). Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: A cohort study. *Ann. Intern. Med.* 153, 790-799.
- Müller, A., Huptas, C., Wenning, M., Schmidt, H. e Weiss, A. (2015). Draft genome sequence of *Staphylococcus carnosus* subsp. *utilis* LTH 7013, isolated from South Tyrolean ham. *Genome Announc.* 3, e00456-15.
- Nascimento, J.S., Coelho, M.L.V., Ceotto, H., Potter, A., Fleming, L.R., Salehian, Z., Nes, I.F. e Bastos, M.C.F. (2012). Genes involved in immunity to and secretion of aureocin A53, an atypical class II bacteriocin produced by *Staphylococcus aureus* A53. *J. Bacteriol.* 194, 875-883.
- Navaratna, M.A., Sahl, H.-G. e Tagg, J.R. (1998). Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4803-4808.
- Netz, D.J.A., Sahl, H.-G., Marcolino, R., Nascimento, J.S., Oliveira, S.S., Soares, M.B. e Bastos, M.C.F. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311, 939-949.
- Netz, D.J.A., Bastos, M.C.F. e Sahl, H.-G. (2002). Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5274-5280.
- Netz, D.J.A., Pohl, R., Beck-Sickinger, A.G., Selmer, T., Pierik, A.J., Bastos, M.C.F. e Sahl, H.-G. (2002). Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 319, 745-756.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J. e Kruse, H. (2010). Food-borne diseases— the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* 139, S3-S15.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H.S. e Kristiansen, P.E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 10-37.
- Noordhout, C.M., Devleeschauwer, B., Angulo, F.J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., Havelgar, A. e Speybroeck, N. (2014). The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 14, 1073-1082.
- Nunes, R.S.C., Souza, C.P., Pereira, K.S., Del Aguila, E.M., e Paschoalin, V.M.F. (2016). Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. *J. Dairy Sci.* 99, 2641-2653.
- Oliver, W.T. e Wells, J.E. (2015). Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6, 1-7.
- Ostyn, A., De Buyser, M.L., Guillier, F., Groult, J., Felix, B., Salah, S., Delmas, G. e Hennekinne, J.A. (2010). First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Euro Surveill.* 15, 1-4.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*-the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 555-567.
- Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64, 175-88.
- Pantosti, A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Front. Microbiol.* 3, 1-12.
- Passos, A.D., Ferreira, G.K.L., Juliani, G.L., Santana, E.H.W. e Aragon-Alegro, L.C. (2009). Avaliação microbiológica de queijos Minas frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina-PR. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes* 64, 48-54.
- Peacock, S.J. e Paterson, G.K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu.*

Rev. Biochem. 84, 577-601.

Perry, K.S.P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Quím. Nova 27, 293-300.

Pimentel-Filho, N.J., Martins, M.C., Nogueira, G.B., Mantovani, H.C. e Vanetti, M.C. (2014). Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. Int. J. Food Microbiol. 190, 1-8.

Pinto, F.G.S., Souza, M., Saling, S. e Moura, A.C. (2011). Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. Arq. Inst. Biol. 78, 191-198.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A. e Owen, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol. 8, 151-156.

Potter, A., Ceotto, H., Giambiagi-deMarval, M., Santos, K.R.N., Nes, I.F. e Bastos, M.C.F. (2009). The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. J. Microbiol. 47, 319-326.

Potter, A., Ceotto, H., Coelho, M.L.V., Guimarães, A.J. e Bastos, M.C.F. (2014). The gene cluster of aureocyclin 4185: the first cyclic bacteriocin of *Staphylococcus aureus*. Microbiology 160, 917-928.

Prabhu, K, Rao, S. e Rao, V. (2011). Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. J. Lab. Physicians 3, 25-27.

Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittal, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P. e Hill, C. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 9352-9357.

Rea, M.C., Dobson, A., O'sullivan, O., Crispie, F., Fouhy, F., Cotter, P.D., Shanahan, F., Kiely, B., Hill, C. e Ross, R.P. (2011). Effect of broad and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 4639-4464.

Recsei, P.A., Gruss, A.D. e Novick, R.P. (1987). Cloning, sequence and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1127-1131.

Riley, M.A. e Chavan, M.A. (2007). Bacteriocins: Ecology and Evolution. 1st ed. (New York: Springer), pp. 35-47.

Rivas, F.P., Castro, M.P., Vallejo, M., Marguet, E. e Campos, C.A. (2014). Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: functionality characterization and antilisterial activity on cooked meat surface. Meat Sci. 97, 475-479.

Roberson, J.R. (2012). Treatment of clinical mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 28, 271-288.

Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J.H., Ferro-Luzzi, A. e James, W.P. (2003). Food and health in Europe: a new basis for action. WHO Reg. Publ. Eur. Ser. 96, i-xvi.

Rodríguez, J.M., Martínez, M.I. e Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42, 91-121.

Růžičková, V., Karpíšková, R., Pantůček, R., Pospíšilová, M., Černíková, P. e Doškař, J. (2008). Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. Int. J. Food Microbiol., 121, 60-65.

Sabioni, J.G. e Maia, A.R.P. (1998). Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease, em queijos Minas Frescal. R. Hig. Alim. 54, 48-50.

Sahl, H.-G. e Brandis, H. (1981). Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Microbiol. 127, 377-384.

Sahl, H.-G. e Brandis, H. (1982). Mode of action of the staphylococin-like peptide Pep 5 and culture conditions affecting its activity. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. A 252, 166-175.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 2-110.

Sandford, S. e Upton, M. (2012). Identification, characterization and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 1539-1547.

Santos, A.L., Santos, D.O., Freitas, C.C., Ferreira, B.L.A., Afonso, I.F., Rodrigues, C.R. e Castro, H.C. (2007).

- Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J. Bras. Patol. Med. Lab. 43, 413-423.
- Sarno, F., Claro, R.M., Levy, R.B., Bandoni, D.H. e Monteiro, C.A. (2013). Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. Rev. Saúde Públ. 47, 571-578.
- Sato'o, Y., Hisatsune, J., Nagasako, Y., Ono, H.K., Omoe, K. e Sugai, M. (2015). Positive regulation of staphylococcal enterotoxin H by Rot (Repressor of Toxin) protein and its importance in clonal complex 81 subtype 1 lineage-related food poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 81, 7782-7790.
- Sauer, K., Richard, H. e Davies, D.G. (2007). Biofilms and biocomplexity. Microbe 2, 347- 353.
- Scharff, R.L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. J. Food Prot. 75, 123-131.
- Schmid, D., Fretz, R., Winter, P., Mann, M., Höger, G., Stöger, A., Ruppitsch, W., Ladstätter, J., Mayer, N., de Martin, A. e Allerberger, F. (2009). Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. Wien. Klin. Wochenschr. 121, 125-131.
- Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Götz, F., Zähner, H., Kellner, R. e Jung, G. (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. Nature 333, 276-278.
- Seral, C., Sáenz, Y., Algarate, S., Duran, E., Luque, P., Torres, C. e Castillo, F.J. (2011). Nosocomial outbreak of methicillin-and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. Int. J. Med. Microbiol. 301, 354-358.
- Seyoum, E.T., Mekonene, T.K., Woldetsadik, D.A., Zewudie, B.M. e Gebreyes, W.A. (2016). Enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine milk produced in central Ethiopia. J. Infect. Dev. Ctries, 10, 138-142.
- Shand, R.F. e Leyva, K.J. (2007). Peptide and protein antibiotics from the domain *Archaea*: halocins and sulfolobocins. In: Bacteriocins: Ecology and Evolution. Riley, M.A. e Chavan, M.A., eds. 1st ed. (New York: Springer), pp. 93–110.
- Silva, A.S., Honjoya, E.R., Cardoso, S.C., Souza, C.H.B., Costa, M.D.R., Santana, E.H.W. e Aragon-Alegro, L.C. (2012). Antimicrobial action of lactoferrin on *Staphylococcus aureus* inoculated in Minas frescal cheese. Arch. Latinoam. Nutr. 62, 68-71.
- Silva, G.O. (2013). Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no Estado de São Paulo. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 74f.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S. e Gomes, R.A.R. (2007). Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos, 3^a ed. (São Paulo: Livraria Varela), pp. 137-148.
- Snyder, A.B. e Worobo, R.W. (2014). Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. J. Sci. Food Agr. 94, 28-44.
- Souza, C.H., e Saad, S.M. (2009). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. LWT - Food Sci. Technol. 42, 633-640.
- Stamford, T.L.M., Silva, C.G.M., Mota, R.A. e Cunha Neto, A. (2006). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* spp. isolated from milk in natura. Food Sci. Technol. (Campinas) 26, 41-45.
- Stepanović, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. e Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 115, 891-899.
- Taormina, P. J. (2010). Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50, 209-227.
- Taponen, S., Supré, K., Piessens, V., van Coillie, E., de Vliegheer, S. e Koort, J.M. (2012). *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62, 61-65.

- Tashirev, A.B., Romanovskaia, V.A., Rokitko, P.V., Shilin, S.O., Chernaia, N.A. e Tashireva, A.A. (2010). Microbiological analysis of terrestrial biotopes of the Antarctic region. *Mikrobiol. Z.* 72, 3-9.
- Thompson, J.K., Collins, M.A. e Mercer, W.D. (1996). Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 338-348.
- Tong, Z., Ni, L., e Ling, J. (2014). Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides* 60, 32-40.
- Trabulsi, L.R. e Alterthum, F. (2008). *Microbiologia*. 5ª ed. (São Paulo: Atheneu), pp.175-183.
- Trentin, D.S., Giordani, R.B. e Macedo, A.J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Ver. Liberato* 14, 213-236.
- van Belkum, M.J., Martin-Visscher, L.A. e Vederas, J.C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol.* 19, 411-418.
- Veras, J.F., Carmo, L.S., Tong, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C., Santos, D.A., Cerqueira, M.M., Cantini, A., Nicoli, J.R. e Jett, M. (2008). 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.
- Vermassen, A., Dordet-Frisoni, E., de La Foye, A., Micheau, P., Laroute, V., Leroy, S. e Talon, R. (2016). Adaptation of *Staphylococcus xylosus* to nutrients and osmotic stress in a salted meat model. *Front. Microbiol.* 7, 20-26.
- WHO (2003). World Health Organization. Reported of Joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: Switzerland. Disponível em http://www.who.int/hpr/NPH/docs/who_fao_experts_report.pdf. Acesso em 05 jun. 2016.
- Wieneke, A.A., Roberts, D. e Gilbert, R.J. (1993). Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiol. Infect.* 110, 519-531.
- Wyness, L.A., Buttriss, J.L. e Stanner, S.A. (2012). Reducing the population's sodium intake: the UK Food Standards Agency's salt reduction programme. *Public Health Nutr.* 15, 254-261.
- Xiao, H., Chen, Y., Liu, Z., Huang, K., Li, W., Cui, X., Zhang, L. e Yi, L. (2009). Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with a sea anemone from coast of the Naozhou island in Zhanjiang, China. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 49, 246-250.
- Xu, J., Shi, C., Song, M., Xu, X., Yang, P., Paoli, G. e Shi, X. (2014). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates from Shanghai. *J. Food Sci.* 79, 635-642.
- Yang, X., Zhang, J., Yu, S., Wu, Q., Guo, W., Huang, J. e Cai, S. (2016). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail ready-to-eat foods in China. *Front. Microbiol.* 7, 816.
- Zhao, X., Shi, C., Meng, R., Liu, Z., Huang, Y., Zhao, Z. e Guo, N. (2016). Effect of nisin and perilla oil combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Food Sci. Technol.*, 1-10.
- Zocche, F., Bastos, C.P., Bassani, M.T., França, R.C., Lima, A.S.D. e Silva, W.P.D. (2012). Estafilococos coagulase positiva em queijos minas frescal e minas padrão comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul. *B. Cent. Pesq. Proc. A.* 30, 119-124.

9. ANEXO

Durante o desenvolvimento deste trabalho, houve a participação nos seguintes eventos, com a apresentação de trabalho na forma de pôster:

1. XX Semana de Microbiologia e Imunologia (2014), apresentando-se o trabalho intitulado “Estudo de sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos frente a estafilococcinas”;
2. XXXVI Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ (2014), apresentando-se o trabalho intitulado “Estudo de sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos frente a estafilococcinas”;
3. XXI Semana de Microbiologia e Imunologia (2015), apresentando-se o trabalho intitulado “Estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio”;
4. XXXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ (2015), apresentando-se o trabalho intitulado “Estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio”;
5. 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia (2015), apresentando-se o trabalho intitulado “Inhibitory activity of staphylococcins against *Staphylococcus aureus* strains isolated from food”;
6. XXII Semana de Microbiologia e Imunologia (2016), apresentando-se o trabalho intitulado “Estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio”;
7. XXXVIII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ (2016), apresentando-se o trabalho intitulado “Estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio”.

Também foi outorgado ao trabalho os seguintes prêmios:

1. Menção Honrosa pela apresentação do trabalho intitulado “Estudo de sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos frente a estafilococcinas” na XX Semana de Microbiologia e Imunologia, IMPG (2014);

2. Melhor trabalho da Sessão “Microbiologia Geral e Ambiental – Painei”. Menção honrosa pela apresentação do trabalho intitulado “Estudo de sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos frente a estafilococcinas” na XXXVI Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, CCS (2014);
3. Menção Honrosa pela apresentação do trabalho intitulado “Estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio” na XXI Semana de Microbiologia e Imunologia, IMPG (2015);
4. Menção Honrosa pela apresentação do trabalho intitulado “Estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio” na XXII Semana de Microbiologia e Imunologia, IMPG (2016);
5. Melhor trabalho da Sessão “Diversidade de micro-organismos e seu potencial biotecnológico – Painei”. Menção honrosa pela apresentação do trabalho intitulado “Estudo da efetividade de estafilococcinas na biopreservação de queijo Minas frescal com teor reduzido de sódio” na XXXVIII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, CCS (2016).

Também foram publicados os seguintes artigos:

1. Fagundes, P.C., **Farias, F.M.**, Santos, O.C.S., Oliveira, N.E.M., Paz, J.A.S., Ceotto-Vigoder, H., Alviano, D.S., Romanos, M.T.V. e Bastos, M.C.F. (2016a). Aureocin A53, an antimicrobial peptide, as an alternative agent for food biopreservation of dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 121, 435-444.
2. Fagundes, P.C., **Farias, F.M.**, Santos, O.C.S., Paz, J.A.S., Ceotto-Vigoder, H., Alviano, D.S., Romanos, M.T.V. e Bastos, M.C.F. (2016b). The four-component aureocin A70 as a promising agent for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 237, 39-46.

ORIGINAL ARTICLE

The antimicrobial peptide aureocin A53 as an alternative agent for biopreservation of dairy products

P.C. Fagundes¹, F.M. Farias¹, O.C.S. Santos¹, N.E.M. de Oliveira¹, J.A.S. da Paz¹, H. Ceotto-Vigoder^{1,*}, D.S. Alviano¹, M.T.V. Romanos² and M.C.F. Bastos¹

¹ Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords

aureocin A53, bacteriocin, biocontrol, biopreservative, dairy, *Listeria monocytogenes*.

Correspondence

Maria do Carmo de F. Bastos, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS - Bloco I - Cidade Universitária - sala I-1-059, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail: mcbastos@micro.ufrj.br or carminhafbastos@gmail.com

*Present address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

2016/0695: received 9 April 2016, revised 9 May 2016 and accepted 24 May 2016

doi:10.1111/jam.13189

Abstract

Aims: The aim of this study was to investigate the potential of aureocin A53, a staphylococcal antimicrobial peptide, for improving food safety.

Methods and Results: The antimicrobial activity of aureocin A53 against strains of *Listeria monocytogenes* isolated from food was tested and the bacteriocin proved to be bactericidal and bacteriolytic against the listerial strains. Aureocin A53 was neither toxic to eukaryotic cell lines nor haemolytic against sheep erythrocytes. It also exhibited a remarkable stability during storage at different temperatures and sensitivity to both simulated gastric juice and bile salts. When the antibacterial activity of aureocin A53 (256 AU ml⁻¹) was tested in skimmed milk artificially inoculated with a *L. monocytogenes* strain (1.0 × 10⁸ CFU ml⁻¹) isolated from food, during storage at 4°C, the bacteriocin reduced the viable counts by 7.7-log₁₀ units up to 7 days of incubation, when compared with the controls not treated with the bacteriocin.

Conclusions: Aureocin A53 exhibited several features considered important for biopreservation and remained fully active in a food matrix.

Significance and Impact of the Study: Taken together, the results confirmed that aureocin A53 has potential to be used as a food preservative, representing an alternative to the use of nisin in biopreservation of dairy products.

Introduction

Milk and dairy products are largely consumed by humans worldwide because they are considered as balanced and nutritive foods (Pereira 2014), but if consumed unpasteurized, they pose risks to human health as they could be contaminated by food-associated pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, among others (Zhao *et al.* 2014). *L. monocytogenes* is the aetiological agent of a disease called listeriosis with associated high mortality (Freitag *et al.* 2009). Therefore, a zero tolerance policy is implemented in many countries concerning *L. monocytogenes* presence in food (Iseppi *et al.* 2008). On the other hand, *Staph. aureus* strains can produce enterotoxins (SE) or

enterotoxin-like toxins (SEI) which cause food poisoning (Otto 2014).

Due to transmission of foodborne diseases and the food contamination by spoilage micro-organisms, food preservation is an essential issue to be considered during food manufacturing (Gálvez *et al.* 2007). The strong opposition by consumers to chemical additives used in food preservation started a growing demand for alternative treatments with antimicrobial action. The use of bacteriocins (Bac), bacterial antimicrobial peptides or proteins, for food preservation is increasingly attracting the attention of researchers, since these substances are recognized as 'natural' compounds used to improve food safety and quality (Gálvez *et al.* 2007). To date, only two bacteriocins produced by Gram-positive bacteria are



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

The four-component aureocin A70 as a promising agent for food biopreservation



Patrícia Carlin Fagundes^a, Felipe Miceli de Farias^a, Olinda Cabral da Silva Santos^a, Juliana Aparecida Souza da Paz^a, Hilana Ceotto-Vigoder^{a,1}, Daniela Sales Alviano^a, Maria Teresa Villela Romanos^b, Maria do Carmo de Freire Bastos^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2016

Received in revised form 1 August 2016

Accepted 11 August 2016

Available online 12 August 2016

Keywords:

Bacteriocin
Aureocin A70
Biocontrol
Biopreservation
Listeria monocytogenes
Milk

ABSTRACT

Aureocin A70 is the only four-component bacteriocin described to date. As it inhibits the growth of a wide range of Gram-positive bacteria, including *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, its potential for improving food safety was investigated in this study. Aureocin A70 (10,240 AU/ml) proved to be bactericidal, but not extensively lytic, against listerial strains. The antibacterial activity of aureocin A70 (16 AU/ml) was then tested in UHT-treated skimmed milk inoculated with the food-associated *L. monocytogenes* L12 strain (4-log CFU/ml) during storage at 4 °C for one week. Aureocin A70 caused a time-dependent reduction in the listerial viable cell counts (5.51-log units) up to 7 days of incubation. Aureocin A70 was neither toxic to the Vero and the L-929 cell lines nor exhibited a hemolytic activity against sheep red blood cells. Aureocin A70 proved to be completely stable for one month at 25 °C, 16 weeks at 4 °C and 20 weeks at –20 °C. Aureocin A70 exhibited a time-dependent susceptibility to simulated gastric juice and bile salts mimicking gastrointestinal conditions. The entrapment of aureocin A70 in an alginate/gelatin matrix revealed that this bacteriocin can be released from this matrix. Moreover, it remained adsorbed to and active on a low-density polyethylene plastic surface suggesting that aureocin A70 may be employed in bioactive packaging to control the growth of undesirable bacteria. Taken together these results suggest that aureocin A70 is a promising alternative to be used in food applications.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As most bacteria, staphylococci can produce a variety of bioactive products which help them to establish in a given habitat by modulating interactions with hosts and potential competitors (Rosenstein and Götz, 2013). Among these products, staphylococcal bacteriocins produced by staphylococci, have been the focus of many studies (Bastos et al., 2009). Bacteriocins are bacterial peptides or proteins that exhibit antimicrobial activity generally towards other bacteria (Heng et al., 2007). Due to their antagonistic activity against several bacterial species, many bacteriocins possess great biotechnological potential in food, medical and veterinary applications (Cotter et al., 2005, 2013).

Currently, bacteriocins produced by Gram-positive bacteria can be separated into at least five different classes. Most bacteriocins described to date belong to either class I (linear peptides which possess post-translationally modified amino acids) or class II (linear peptides with no post-translationally modified amino acids) (Bierbaum and Sahl, 2009; Nissen-Meyer et al., 2009). Aureocin A70 is a class II bacteriocin produced by *Staphylococcus aureus* A70, a strain isolated from pasteurized commercial milk (Giambiagi-deMarval et al., 1990). It is the only bacteriocin described to date whose antimicrobial activity is due to four cationic and hydrophobic peptides with molecular masses ranging from 2797 Da to 3086 Da (Netz et al., 2001). Differently from most class II bacteriocins, aureocin A70 peptides (AurA, AurB, AurC and AurD) are not synthesized as precursor peptides that undergo proteolytic cleavage of a leader peptide to generate the mature peptides (Netz et al., 2001). For most target micro-organisms investigated to date, all four peptides are required for inhibition by aureocin A70 (Bastos et al., 2009), which is active towards a wide range of species of Gram-positive bacteria, including pathogens (Bastos et al., 2009; Oliveira et al., 1998).

In food industry, bacteriocins can be used to prevent the growth of either pathogenic or food-spoilage micro-organisms and to promote quality (Bastos and Ceotto, 2011). Among the pathogenic micro-

Abbreviations: AU, arbitrary units; Bac, bacteriocin; SRBC, sheep red blood cells.

* Corresponding author at: Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ, Departamento de Microbiologia Geral, Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS - Bloco 1 - Cidade Universitária - sala 1-1-059, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail addresses: mcbastos@micro.ufrj.br, caminhafabastos@gmail.com (M.C. de Freire Bastos).

¹ Present address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.