



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
MESTRADO**

TAIZ SIQUEIRA PINTO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADAS DE QUEIJOS RICOTA**

**JOÃO PESSOA - PB
2011**

TAIZ SIQUEIRA PINTO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADAS DE QUEIJOS RICOTA**

JOÃO PESSOA-PB
2011

TAIZ SIQUEIRA PINTO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADAS DE QUEIJOS RICOTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadores:

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA-PB
2011

P659c Pinto, Taiz Siqueira.

Caracterização fenotípica de Cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijos ricota/ Taiz Siqueira Pinto.- - João Pessoa : [s.n.], 2011.

75f. : il.

Orientadores: José Pinto de Siqueira Júnior, Evandro Leite de Souza.

Dissertação(Mestrado) – UFPB/CCS

1.Ciências da Nutrição. 2.Staphylococcus aureus. 3.Fenotipagem. 4.Atividade lipolítica. 5. Bacteriocinotipagem. 6.Queijo Ricota

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

TAIZ SIQUEIRA PINTO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADAS DE QUEIJOS RICOTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Dissertação aprovada em: 25/03/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior – Orientador
Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Ramos de Egypto Queiroga – Examinador interno
Departamento de Nutrição/CCS/UFPB

Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro Vieira Pereira - Examinador externo
Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB

JOÃO PESSOA-PB
2011

Aos meus pais, **Waldir Siqueira Pinto** e
Mirtes Cleide Sanches Pinto, meus
exemplos de vida, minha fortaleza e meu
porto seguro,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me proporciona cada momento da minha vida transformando-a num eterno aprendizado. Foi com Sua permissão que eu realizo mais um sonho e alcanço mais um objetivo. É Ele quem me dá forças para ultrapassar desafios, respostas para minhas dúvidas, conforto para minhas aflições, felicidade em todas as minhas vitórias até então alcançadas;

Aos meus pais, Waldir Siqueira Pinto e Mirtes Cleide Sanches Pinto e meu irmão, Cassandro Siqueira Pinto, os quais por toda minha vida, sempre serão meus alicerces, pessoas que devo tudo o que tenho. Agradeço também por acreditarem em mim, me dando força, incentivo, amor e confiança para que eu alcançasse mais uma conquista;

Ao meu orientador, professor Dr. José Pinto de Siqueira Júnior, por acreditar em mim desde o início, mesmo sabendo sobre minhas limitações. Também, por compartilhar seus conhecimentos e experiências de vida, pelo empenho, amizade e paciência ao decorrer deste trabalho;

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, pela sua co-orientação, dedicação, colaborações, sugestões e atenção ao transmitir seus conhecimentos durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos Sul-Mato-Grossenses: Natália Cardoso Dal Molin, Paula Fabiana Saldanha Tschinkel, Adriana Azambuja Marcondes, Rafael Almeida Saldanha e José Amarildo Avanci Júnior, os quais sempre estiveram me apoiando, e mesmo distantes, me deram forças, incentivo e principalmente suas amizades para que de alguma forma eu me sentisse segura para seguir em frente;

Aos meus grandes amigos, Quênia Gramile Silva Meira e André Luiz Gomes Meira, por estenderem suas mãos em todos os momentos que eu precisei e até os que eu não precisei. Ainda, pelo conforto oferecido quando eu mais sentia falta da minha família, por suas gentilezas, atenção e alegria. Por sempre se lembrarem de mim ao me convidar para passear ou até mesmo para passar tardes de finais de semanas nos laboratórios;

À grande amiga, Mayara Queiroga Barbosa, pela sua amizade, por sempre me ouvir com toda atenção e me aconselhar em momentos que me exigiam calma. Pelas horas de almoços compartilhados, onde dividíamos nossas conquistas e aflições;

Aos amigos, Isabella Medeiros, Gustavo Ravy, Carlos Eduardo Vasconcelos e Maria Elieidy Oliveira, os quais me proporcionaram sua amizade, companheirismo, dividindo alegrias e alguns momentos difíceis, fazendo com que eu me sentisse acolhida, onde para mim era tudo novo e diferente;

Às amigas Laura Camila Pereira Liberalino e Maria de Fátima Pereira Liberalino, que me acolheram em sua casa logo quando cheguei a João Pessoa, dando-me um lar acolhedor, atenção e companheirismo;

À grande amiga Renata Mesquita Marinho, que durante um ano de convivência, soube dividir momentos confusos, decisivos e tristes, também momentos divertidos, comemorativos e alegres, me ajudando com seus atos e palavras sinceras;

À colega, Ana Caroliny Vieira da Costa, pela sua ajuda, paciência e ensinamentos de seus conhecimentos teóricos e práticos durante os experimentos realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos;

À amiga e companheira assídua de laboratório, Cybelle Pereira de Oliveira, que durante e após os experimentos realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos, me proporcionou seus conhecimentos científicos, além de sua amizade, dedicação, companheirismo e paciência;

Às colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos: Vivyanne Falcão, Emanuele Batista, Suellen Menezes, Ísis Caroline, Nathalie Paes e Carolina Benato pela amizade, convivência e companheirismo; pela troca de informações e conhecimentos durante e após o desenvolvimento da pesquisa;

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Biologia Molecular/CCEN, Sr. Bosco e D. Severina, pela ajuda constante durante os experimentos;

Aos meus colegas da turma de Mestrado: Alana Quintans, Bárbara Melo, Clerya Alvino, Élide Mara, Eliseuda Marinho, Estevam Luiz, Fernanda Patrícia Torres, Laura Camila, Mayara Queiroga, Mussara Monteiro, Noádia Priscila, Quênia Gramile, Rafaella Pordeus e Talita Maria, pela união em momentos de descontração e de muitos estudos, dividindo conhecimentos e experiências no decorrer deste Mestrado;

Ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, pelos ensinamentos partilhados de forma a contribuir com minha formação científica;

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Ramos de Egypto Queiroga, Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro Vieira Pereira, Prof.^a Dr.^a Hilzeth Luna de Freire Pessoa e Prof.^a Dr.^a Francisca Inês de Sousa Freitas; pelas suas disponibilidades e brilhantes considerações na finalização deste trabalho;

Aos secretários do curso, Sr. Carlos e Sr. Marcos, pela atenção e dedicação ao solicitar seus serviços;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por ter concedido a bolsa de estudos durante o Mestrado;

E a todas as pessoas, que aqui não mencionadas, mas que de alguma forma participaram e contribuíram durante esta caminhada.

Muito Obrigada!

"Construí amigos, enfrentei derrotas,
venci obstáculos, bati na porta da vida e
disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la."

(Augusto Cury)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo isolar cepas de *Staphylococcus aureus* de queijos ricota e caracterizá-las com relação a marcadores fenotípicos de atividade lipolítica, bacteriocinotipagem e resistotipagem. Para o isolamento, foram adquiridas 11 amostras de queijo ricota de diferentes marcas comercializadas em supermercados da cidade de João Pessoa-PB. Entre as 41 cepas isoladas, 82,9% revelaram-se lipase positiva (Lip⁺) e 17,1%, lipase negativa (Lip⁻). Com relação à bacteriocinotipagem, 9,76% mostraram-se produtoras de bacteriocinas frente a uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de superfícies de processamento de alimentos e 55% mostraram-se sensíveis a uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de queijo ricota. Para resistotipagem, 87,8% das cepas apresentaram-se resistentes a estreptomicina, 26,59% a penicilina e 19,51% a eritromicina. Nenhuma das cepas foi resistente a tetraciclina. Observou-se a variabilidade entre as Concentrações Inibitórias Mínimas, tanto em cepas resistentes como sensíveis, sendo tal variabilidade mais predominante com penicilina (variação de 0,015625 a 16 µg/mL), bem como a variabilidade entre cepas do mesmo queijo. Apenas cepas resistentes a eritromicina foram submetidas ao "D-teste" a fim de determinar o tipo de resistência, das quais todas as cepas mostraram-se com resistência indutiva. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que embora os fenótipos revelem uma resposta adaptativa relacionada às peculiaridades das pressões ambientais locais, é evidente a importância destes marcadores genéticos a fim de se distinguir novas linhagens de *S. aureus* daquelas endêmicas, bem como investigar possíveis impactos epidemiológicos e na segurança alimentar.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Fenotipagem. Atividade lipolítica. Bacteriocinotipagem. Resistotipagem. Ricota.

ABSTRACT

This study aimed to isolate strains of *Staphylococcus aureus* in ricotta cheeses and to characterize them respecting phenotypic markers of lipolytic activity, and bacteriocin typing and resistance typing. For isolation, were acquired 11 samples of different brands of ricotta cheese sold in supermarkets in João Pessoa - Paraíba. Among the 41 strains, 82.9% proved positive lipase (Lip⁺) and 17.1%, negative lipase (Lip⁻). In relation to bacteriocin typing, 9.76% showed bacteriocin producing against a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from surfaces processing food and 55% were susceptible to a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from ricotta cheese. For resistance typing, 87.8% of strains were resistant to streptomycin, 26.59% to penicillin and 19.51% to erythromycin. None of the strains were resistant to tetracycline. Variability was observed between the minimal inhibitory concentrations (MIC), both in resistant strains as sensitive ones, so the variability showed more prevalent with penicillin (ranging from 0.015625 to 16 mg / mL) and the variability between strains of the same cheese. Only erythromycin-resistant strains were subjected to "D-test" to determine the type of resistance, of which all presented inductive resistant. From this results obtained, can conclude that although the phenotypes show an adaptive answer on related to the peculiarities of local environmental pressures, it is clear the importance of these genetic markers to discern new strains of *S. aureus* for those endemic, as well as to investigate possible epidemiological impacts and on food safety.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Phenotyping. Lipase activity. Bacteriocin typing. Resistance typing. Ricotta.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Coloração de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Figura 2 - Demonstração da atividade lipolítica utilizando Tween 80 como substrato. (a) cepa sem atividade lipolítica; (b), (c) e (d) cepas com atividade lipolítica	26
Figura 3 - Apresentação do D-teste	31

FIGURAS DO APÊNDICE C

Figura 1 - Atividade bacteriocinogênica da cepa QR10-9 de <i>S. aureus</i> frente à cepa S54	68
Figura 2 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de penicilina frente a cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de queijos ricota. <input type="checkbox"/> Sensível, <input checked="" type="checkbox"/> Resistente	72
Figura 3 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de eritromicina frente a cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de queijos ricota. <input type="checkbox"/> Sensível, <input checked="" type="checkbox"/> Resistente	72
Figura 4 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de estreptomicina frente a cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de queijos ricota. <input type="checkbox"/> Sensível, <input checked="" type="checkbox"/> Resistente	73
Figura 5 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de tetraciclina frente a cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de queijos ricota. <input type="checkbox"/> Sensível	73

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA METODOLOGIA

Tabela 1 - Relação das amostras de queijos ricota com suas respectivas marcas e codificação das cepas isoladas	34
Tabela 2 - Classificação das cepas de <i>S. aureus</i> quanto aos valores de CIM	37

TABELA DO APÊNDICE C

Tabela 1 - Bacteriocinotipagem de 41 cepas de <i>S. aureus</i> isolados de queijos ricota (diâmetro dos halos em mm)	69
Tabela 2 - Bacteriocinotipagem de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas de 07 amostras de queijo ricota (número de cepas)	70
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de 41 amostras de <i>S. aureus</i> frente a 4 antibióticos	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	QUEIJOS	16
2.1.1	Queijo ricota	17
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.2.1	Características gerais	18
2.2.2	Fatores de patogenicidade	19
2.2.3	Contaminação alimentar	21
2.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	23
2.3.1	Atividade lipolítica	23
2.3.2	Atividade bacteriocinogênica e sensibilidade à bacteriocina	27
2.3.3	Resistência bacteriana a antibióticos	29
3	METODOLOGIA	33
3.1	DELINEAMENTO AMOSTRAL	33
3.2	ISOLAMENTO DE <i>S. aureus</i> EM QUEIJOS RICOTA	33
3.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	35
3.3.1	Atividade lipolítica	35
3.3.2	Ensaio da atividade bacteriocinogênica	35
3.3.3	Resistotipagem	36
3.3.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
3.3.3.2	Deteção do tipo de resistência a antibióticos macrolídeos pelo método de Weisblun e Demohn (1969)	37
	REFERÊNCIAS	38
	APÊNDICES	47
	APÊNDICE A – ARTIGO 1	48
	APÊNDICE B – ARTIGO 2	58
	APÊNDICE C – RESULTADOS A SEREM PUBLICADOS	68
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

1 INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos tem sido frequentemente envolvidos em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos em todo o mundo. Muitos microrganismos patogênicos podem ser veiculados ao homem através do consumo de leite e seus derivados.

O queijo ricota é um produto de grande consumo nas dietas alimentares devido à ausência de sal, pouca quantidade de gordura e alta digestibilidade, além de ser um produto fresco e com baixa quantidade de conservantes e aditivos. Por ser um alimento rico em nutrientes, o queijo ricota favorece o crescimento de diferentes microrganismos, principalmente aqueles que provocam Doenças Transmitidas por Alimentos, a citar *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*.

S. aureus é reconhecido como uma das espécies microbianas de maior importância clínica e para Microbiologia de Alimentos. Sua incidência em queijos é alta e muitas vezes tornam estes produtos impróprios para o consumo humano, quando as contagens apresentam-se acima do permitido pela Legislação (BORGES *et al.*, 2008; BRASIL, 1996; BRASIL, 2001).

S. aureus exerce sua patogenicidade através da ação da enzima coagulase, bem como através da liberação de substâncias extracelulares principalmente toxinas, as quais provocam doenças como Síndrome de Choque Tóxico (*Toxic Shock Syndrome* - TSS) e Intoxicação Alimentar Estafilocócica (IAE), sendo esta última de grande impacto para a Saúde Pública.

Muitos métodos têm sido utilizados em linhagens bacterianas a fim de caracterizá-las a partir de sua tipagem fenotípica. Como exemplo destes métodos pode citar: fagotipagem, bacteriocinotipagem, resistotipagem, atividade lipolítica e auxotipagem.

O interesse pela atividade lipolítica em *S. aureus* originou-se da correlação entre tal atividade e a patogênese, bem como de seu significado epidemiológico, visto que microrganismos produtores de lipase seriam mais comuns entre isolados de infecções profundas, enquanto que microrganismos não produtores desta enzima seriam mais comuns entre isolados de infecções superficiais. Além da patogenicidade, tem-se a preocupação com a qualidade dos

alimentos, pois a presença de microrganismos com atividade lipolítica neste substrato pode causar deterioração mais acentuada em decorrência da sua ação sobre os lipídeos, com subsequente acúmulo de produtos intermediários e finais que provocam alteração de características organolépticas, principalmente o sabor e odor.

A bacteriocinotipagem é a técnica utilizada para detectar se a bactéria produz bacteriocinas (substâncias protéicas antimicrobianas sintetizadas por algumas cepas bacterianas) ou se apresenta sensibilidade a bacteriocinas produzidas por outra cepa. Quando as bactérias têm ação bacteriocinogênica, conseguem-se bons resultados na prevenção e/ou tratamento de infecções bacterianas. Por sua vez, a resistotipagem avalia a resistência bacteriana frente a um determinado antibiótico, além de caracterizar em nível de fenótipo e verificar variabilidade entre as cepas.

No Brasil, a fenotipagem de cepas de *S. aureus* trata-se de um assunto relativamente pouco investigado, embora seja amplamente reconhecida a importância destas informações e das suas variações em isolados de diferentes origens. No estado da Paraíba já foram analisadas cepas de origem bovina (PEREIRA, 1992), humana hospitalar (FREITAS, 1993) e humana comunitária (LIMA, 2002), entretanto há uma carência de estudos de caracterização dos aspectos fenotípicos de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos, particularmente de produtos lácteos. Assim, esta pesquisa tem como objetivo isolar cepas de *Staphylococcus aureus* de vários lotes de marcas de queijo ricota comercializadas na cidade de João Pessoa-PB, a fim de caracterizá-las através de marcadores fenotípicos de ação lipolítica, bacteriocinotipagem e resistotipagem.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 QUEIJOS

O queijo surgiu há mais de oito mil anos e atualmente existem mais de mil variedades em todo o mundo nas mais diferentes formas, sabores, aromas, produzidos por diferentes processos químicos e microbiológicos. Entre o grupo dos produtos lácteos, o queijo é indiscutivelmente o produto mais diversificado e instável em suas características e por este motivo tem grande interesse em pesquisas científicas (BERESFORD *et al.*, 2001; FOX; McSWEENEY, 2004).

O consumo anual de queijos no Brasil é em torno de 2,3 kg *per capita*, entretanto, este número está aumentando, visto que 60% do total de leite produzido no país é destinado à produção queijeira, chegando a quatrocentos e cinquenta mil toneladas por ano. O estado que mais produz queijos no Brasil é Minas Gerais e a produção se concentra em pequenas e médias queijarias empregando aproximadamente trinta mil famílias (PERRY, 2004).

De acordo com Perry (2004), os queijos são fontes ricas em nutrientes como proteínas, gorduras, carboidratos (lactose), assim como cálcio, fósforo e magnésio. O líquido residual da sua produção é chamado de lactosoro o qual é empregado na produção de iogurtes, ricotas e demais produtos lácteos.

Falhas tanto no controle da qualidade da matéria-prima para a produção queijeira quanto na estocagem podem resultar em um produto de má qualidade provocada pela presença de microrganismos. A contaminação por microrganismos pode resultar em alterações físico-químicas e sensoriais no queijo, além de causar infecções e intoxicações nos consumidores (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007). Kousta *et al.* (2010) evidenciam *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E.coli* O157:H7 como sendo os microrganismos patogênicos mais documentados em surtos de origem alimentar causados pelo consumo de vários tipos de queijos, representando assim uma ameaça à saúde humana devido ao aumento de casos e gravidade dos sintomas.

2.1.2 Queijo ricota

O interesse pelo consumo de alimentos *in natura*, com quantidades pequenas de aditivos e conservantes e também a preferência por alimentos frescos e semiprocessados tem aumentado entre os consumidores. O queijo ricota, por ser um produto fresco, por apresentar baixo teor de gordura, ausência de sal e ser de fácil digestão, tornou-se um dos alimentos mais consumidos nas dietas alimentares (RIBEIRO *et al.*, 2005).

O queijo ricota originou-se na Itália e hoje já é produzido em vários países, onde recebe diferentes denominações, como “queijo de albumina”, visto que os componentes majoritários são albumina e lactoglobulina. Este queijo é elaborado pela acidificação do soro do queijo, obtido durante o processamento de outros queijos, de leite ou ambos, a partir de leite de cabra, ovelha, vaca e búfala, podendo ou não ter adição de leite integral depois de ser aquecido em torno de 92 °C (PIZZILLO *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005). A acidificação é provocada pela adição de ácido láctico ou cítrico que coagula as proteínas do soro ou a caseína (MODLER; EMMONS, 2001).

Em sua composição, a ricota fresca apresenta 72% de matéria seca, onde 8-12% são de proteínas e 3% de lactose. O pH é de aproximadamente 5,6 e possui elevada Atividade de água (A_w) tornando-se um substrato favorável ao crescimento microbiano. A vida de prateleira varia entre uma a quatro semanas, quando mantido em baixa temperatura (4 °C) (ALARCÓN, 2007). Maia, Ferreira e Abreu (2004) relatam que o queijo ricota é um produto rico em nutrientes e sais minerais, e por isto apresenta ótimas condições para o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, os quais quando presentes, comprometem o tempo de vida de prateleira dos alimentos bem como podem provocar intoxicação e toxinfecção alimentares.

Tebaldi *et al.* (2008b) ao avaliar a qualidade microbiológica de três amostras de queijos ricota, sendo cada uma representada por quatro unidades experimentais de diferentes laticínios, verificaram que todas as marcas apresentaram bactérias da família Enterobacteriaceae acima dos padrões estabelecidos pela legislação durante todo o período de vida de prateleira.

2.2 *Staphylococcus aureus*

2.2.1 Características gerais

Staphylococcus foram descritos em 1880 em pus de abscessos cirúrgicos pelo médico Alexandre Ogston (SANTOS *et al.*, 2007). Bactérias do gênero *Staphylococcus* compreendem em mais de 42 espécies registradas no banco de dados *Taxonomy Browser* (NCBI, 2009), sendo que 20 espécies estão associadas a infecções em humanos e animais. São Gram-positivas, de formato esférico, com tamanho entre 0,5 a 1,0 μm e agrupam-se em forma de “cacho” (Figura 1). São aeróbias e anaeróbias facultativas, e por isso apresentam metabolismo fermentativo e respiratório produzindo ácidos provenientes de carboidratos. A temperatura ótima para seu crescimento é entre 30 °C a 37 °C, porém podem crescer entre 7 °C a 48 °C. O pH ideal para seu crescimento é de 6,0 a 7,0 podendo crescer entre 4,0 a 10,0, enquanto a Atividade de água ótima para o seu crescimento é de até 0,86 (ALARCÓN, 2007; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002). Crescem em meios de cultura com cloreto de sódio (NaCl), variando de 7% a 10%, porém algumas cepas crescem em até 20% de NaCl. Utilizam aminoácidos como fonte de nitrogênio, a tiamina e ácido nicotínico como fontes de vitaminas do complexo B, mas quando crescem em anaerobiose, utilizam uracil. Para a produção de enterotoxinas, em meio mínimo e em crescimento aeróbio, utilizam glutamato monossódico como fonte de carbono, nitrogênio e energia (JAY, 2005).

O gênero se divide em dois grupos: coagulase positiva e coagulase negativa. As espécies coagulases positivas (*Specie Coagulase Positive* - SCP) são reconhecidas como patogênicas potencialmente sérias devido sua capacidade de coagulação do plasma sanguíneo. Dentre as SCP se destacam *S. hyicus*, *S. intermedius* e principalmente *S. aureus*, por associarem-se mais a doenças estafilocócicas (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

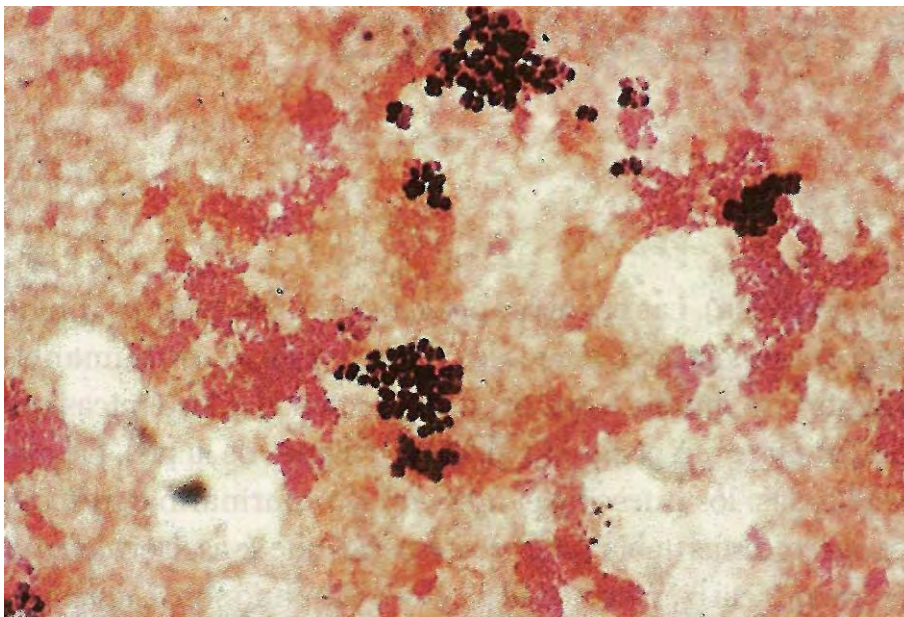


Figura 1 - Coloração de Gram de *Staphylococcus aureus* (MURRAY; ROSENTHAL; PFAUER, 2006)

O principal hospedeiro de *S. aureus* é o homem, podendo se encontrar na garganta, faringe, glândulas mamárias, trato intestinal e urinário. Sua contaminação pode ser de indivíduo para indivíduo ou de indivíduo para o alimento. Além disso, *S. aureus* pode ter como hospedeiro alguns animais, como o gado leiteiro, trazendo então a problemática sobre a contaminação de leite e derivados que posteriormente serão consumidos pela população (LIMA, 2005).

2.2.2 Fatores de patogenicidade

Além da capacidade de transmitir doença pela multiplicação e disseminação nos tecidos, *S. aureus* causa doenças pela produção de substâncias extracelulares, destacando-se a produção de enterotoxinas. Alimentos ricos em carboidratos e proteínas contaminados por *S. aureus* são reconhecidos como favoráveis para a produção de enterotoxinas (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

Murray, Rosenthal e Pfauer (2006) relatam que a patogenia das infecções provocadas por *S. aureus* depende da produção de proteínas de superfície que intervêm na adesão do microrganismo aos tecidos do hospedeiro e da produção de

proteínas extracelulares como determinadas toxinas e enzimas hidrolíticas desta espécie.

As toxinas são da família das Toxinas Pirogênicas Superantígenos (PTSAgs), sendo as principais a Toxina da Síndrome de Choque Tóxico (*Toxic Shock Syndrome* - TSS) e Enterotoxinas Estafilocócicas, esta última é responsável pela intoxicação alimentar, patogenia de grande impacto para Saúde Pública (BLAIOTTA *et al.*, 2006). Uma população de 10^5 UFC de *S. aureus*/g ou mL, ou então, 1µg de toxina pura já é suficiente para provocar intoxicação alimentar (LAMAITA *et al.*, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal enterotoxin* - SE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis, termoestáveis (100 °C durante 30 minutos) e possuidoras de resistência às enzimas do Sistema Digestório (BORGES *et al.*, 2008). Cerca de 30-50% das cepas de *S. aureus* são produtoras de enterotoxinas. As SEs classificam-se em oito tipos (A-E, e G-I), sendo que a enterotoxina C se divide em 3 subtipos. Os sorotipos mais envolvidos em surtos de intoxicação alimentar são de SEA a SEE. A enterotoxina A é a toxina mais envolvida em surtos de intoxicação estafilocócica, enquanto as enterotoxinas C e D são particularmente as mais envolvidas em surtos relacionados ao consumo de produtos lácteos (MURRAY; ROSENTHAL; PFAUER, 2006). Chokesajjawatee *et al.* (2009) afirmam que atualmente há outros tipos de sorotipos de enterotoxinas, as SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU, porém ainda há pouco conhecimento sobre seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar.

Outro fator de patogenicidade são as enzimas, dentre elas: **catalase**, que tem como função inativar radicais livres e peróxidos de hidrogênio formados pelo sistema mieloperoxidase dentro dos fagócitos dos hospedeiros, convertendo em oxigênio e hidrogênio; **fibrinolisin**a que dissolve coágulos de fibrina; **termonucleases** (TNase) que são exo e endonucleases termoestáveis com função de hidrolisar o DNA e o RNA das células dos hospedeiros; **hialuronidase**, capaz de degradar a matriz intercelular de mucopolissacarídeos presentes no tecido conjuntivo do hospedeiro por meio de hidrólise do ácido hialurônico, o qual promove a disseminação de *Staphylococcus* nas áreas próximas; **coagulase** que promove a coagulação do plasma por ativação da protrombina com posterior conversão de fibrinogênio em fibrina, com envolvimento da célula bacteriana protegendo-a contra a fagocitose e a opsonização; e por fim as **lipases**, que hidrolisam componentes

estruturais lipídicos dos tecidos pela ação da fosfolipase C fosfatidilinositol-específica (MURRAY; ROSENTHAL; PFAUER, 2006; SANDEL; MCKILLIP, 2004; SANTOS *et al.*, 2007).

2.2.3 Contaminação alimentar

A incidência de *S. aureus* é alta em quase todos os alimentos, principalmente aqueles de origem animal, produtos que foram manipulados, ou que não passaram por processamento térmico. Frequentemente, estes microrganismos são encontrados em pequenas quantidades, mas isto já indica um risco para a qualidade do alimento (JAY, 2005). Atualmente, um dos maiores problemas em Saúde Pública está relacionado com a segurança alimentar e para isso têm-se tomado medidas para controlar os riscos de contaminação de alimentos como a implantação do sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e as Boas Práticas de Fabricação (BPF) (CHOKESAJJAWATEE *et al.*, 2009).

Nos países subdesenvolvidos ocorrem mais de 1 bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos e, destes casos, 5 milhões chegam ao óbito, sendo que a principal causa é a contaminação bacteriana dos alimentos. Estima-se que até 100 milhões de pessoas no mundo adoecem devido a infecções e intoxicação provocadas por microrganismos veiculados por alimentos, visto que nos Estados Unidos, 12 milhões de casos são registrados anualmente, embora apenas 10% dos casos sejam registrados devido à perda de informações (GERMANO; GERMANO, 2003).

A contaminação por *S. aureus* está entre as principais causas de doenças veiculadas por alimentos (NORMANNO *et al.*, 2007) e ocorre quando um alimento (laticínios, crustáceos, pratos preparados, carnes cozidas) é manipulado por um indivíduo portador, ficando exposto a temperaturas adequadas (20-40 °C) para o crescimento microbiano; ou então, em alimentos como salames, salsichas e queijos que ao passar pelo processo de fermentação inadequada torna-se propício ao crescimento de *S. aureus* (LIMA, 2005). Outra forma de contaminação é pela mastite estafilocócica que afeta rebanhos leiteiros, aumentando a possibilidade de

intoxicação alimentar pelo consumo de leite ou pelo seu uso para a fabricação de queijos e produtos derivados (JAY, 2005).

Os sintomas provenientes da intoxicação por *S. aureus* aparecem dentro de quatro horas após a ingestão de um alimento contaminado, no entanto há alguns relatos que apontam o aparecimento dos sintomas entre uma a seis horas após a ingestão. Alguns dos sintomas de intoxicação são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, os quais geralmente desaparecem em torno de 24 a 48 horas, sendo sua ocorrência maior em crianças e idosos (JAY, 2005; NORMANNO *et al.*, 2007).

Sandel e McKillip (2004) relatam que a maioria dos surtos que envolvem doenças transmitidas por alimentos é causada por *S. aureus*, sendo que o primeiro surto registrado foi por contaminação em queijo Cheddar no ano de 1884. Após alguns anos, em 1914, reconheceu-se *S. aureus* como causador de doenças em indivíduos devido ao consumo de leite obtido de vacas acometidas por mastite. Estes mesmos autores enfatizam que os surtos ocorrem devido à presença de enterotoxinas pré-formadas, as quais são produzidas não apenas por *S. aureus*, mas também por outros microrganismos como *S. intermedius* e *S. hyicus*.

O queijo, mesmo sendo um alimento pouco freqüente na mesa da população ao comparar com outros alimentos como a carne, está envolvido em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos, as quais em sua grande maioria podem apresentar *S. aureus* como agente etiológico (GERMANO; GERMANO, 2003).

Borges *et al.* (2008) ao pesquisarem o perfil de contaminação por *Staphylococcus* sp. em uma linha de produção de queijo coalho, verificaram que 100% das amostras de leite cru apresentaram elevada população de *Staphylococcus* sp., onde as contagens variaram de $3,3 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL⁻¹ e especificamente para *Staphylococcus* coagulase-positiva, uma variação de $8,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹, indicando o comprometimento deste produto para o consumo humano devido ao perigo da presença de enterotoxinas.

2.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Uma variedade de métodos bioquímicos e moleculares vem se tornando ferramentas cada vez mais importantes para se estudar melhor as diferenças e características de cepas bacterianas de relacionamento clonal e de patogenicidade (BLAIOTTA *et al.*, 2006). Exemplos destes métodos são fagotipagem, biotipagem, bacteriocinotipagem, resistotipagem, perfil de DNA plasmidial e cromossômico. Outras técnicas moleculares têm sido utilizadas em *S. aureus* para investigações epidemiológicas ou ainda para a classificação de amostras em biotipos e ecovares hospedeiro-específicos (FREITAS, 1993; KAPUR *et al.*, 1995; PEREIRA, 1992), assim como para avaliar possíveis fontes de contaminação em alimentos (MURRAY *et al.*, 1999).

2.3.1 Atividade lipolítica

A atividade lipolítica vem sendo estudada desde 1901 por Eykman. Esta atividade ocorre pelo lançamento de enzimas (lipases e fosfolipases) que clivam ácidos graxos do meio. A lipase de *S. aureus* é capaz de degradar ácido octadecenóico no plasma humano. Por vários anos, as lipases de *S. aureus* receberam classificações diferentes como esterases ou mesmo lipases, pelo fato de hidrolisarem triglicerídeos e Tween em solução aquosa. Por fim, a classificação ficou definida como hidrolase de éster de glicerol (EC 3.1.1.3) (GOTZ; VERHEIJ; ROSENSTEIN, 1998).

As lipases estão presentes em várias plantas, animais e microrganismos, principalmente bactérias e fungos e seu interesse está na aplicação para a química orgânica e biotecnologia (indústrias de alimentos lácteos, farmacêutica, cosmética, de detergentes, de debiodiesel e têxtil). Exemplos de microrganismos produtores de lipase são *S. aureus*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* e *Pseudomonas* (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; EGGERT, 2002; SAXENA *et al.*, 1999). Uma destas aplicações consiste na modificação de produtos alimentícios devido à produção de ésteres de ácidos

graxos de cadeia curta e alcoóis, que são conhecidos pelos seus compostos que determinam sabor e aroma (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Lipases de microrganismos podem ser divididas em três classes: (i) não específica; (ii) região-específica e (iii) ácido graxo-específica, baseando-se pelo tipo de substrato. As lipases não específicas atuam aleatoriamente na molécula de triacilglicerol, resultando num desarranjo de glicerol e ácido graxo. Como exemplos de microrganismos produtores de lipases são *S. aureus* e *S. hycus*. O segundo tipo citado, as lipases região-específica, também chamadas de 1-3-específicas, são lipases que hidrolisam somente as ligações éster primárias, ou seja, ligações do carbono 1 (C1) e carbono 3 (C3) do glicerol. Microrganismos produtores deste tipo de lipase são *Bacillus* sp. THL027, *B. subtilis* 168, *Pseudomonas* sp. f-B-24, *P. aeruginosa* EF2 e *P. alcaligenes* 24. E por fim, as lipases ácido graxo-específicas, as quais mostram especificidade em relação aos ácidos graxos, como por exemplo: as lipases de *Bacillus* sp., que mostram especificidade para triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que lipases de *Pseudomonas* sp. e *Aeromonas hydrophila* preferem triacilgliceróis formados por ácidos graxos de cadeia média; e, lipases de *S. aureus* 226 preferem triacilgliceróis formados por ácidos graxos insaturados (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

Conforme previamente mencionado, *S. aureus* produz vários tipos de proteínas extracelulares, sendo que estas são produzidas principalmente no final do crescimento exponencial. Assim, pesquisadores se interessaram em estudar quais eventos regulatórios estão associados à produção dessas proteínas extracelulares e, dessa forma descobriram cinco diferentes genes responsáveis pela produção de lipase no gênero *Staphylococcus*, sendo dois de *S. aureus*, dois de *S. epidermidis* e um de *S. hycus*. Os genes de *S. aureus* são denominados como *geh* (gene cromossomal encontrado em uma cepa de *S. aureus* PSS4) e o gene *lip* (gene isolado de *S. aureus* NCTC 8530) (ARVIDSON, 2000; NIKOLEIT *et al.*, 1995; SMELTZER; GILL; IANDOLO, 1992).

Duas lipases foram descritas em *S. aureus*, sendo que apenas uma é capaz de hidrolisar triglicerídeos de cadeia longa, assim como trigliceróis solúveis em água (codificada pelo gene *geh*), reconhecida como lipase verdadeira. Por sua vez, a segunda enzima só pode hidrolisar trigliceróis de cadeia curta e é referida como hidrolase ester glicerol de cadeia curta (codificada pelo gene *lip*) (ARVIDSON, 2000).

A importância da atividade lipolítica em *S. aureus* originou-se da correlação entre tal atividade e a patogênese, bem como de seu significado epidemiológico (LACEY, 1975). Embora o preciso papel da lipase no desenvolvimento de infecções estafilocócicas não tenha sido bem esclarecido, constatou-se que o caráter Lipase positiva (Lip⁺) é mais comum entre os isolados de infecções mais profundas; enquanto que o caráter Lipase negativa (Lip⁻) é mais comum em infecções superficiais. Além disso, tem sido relatado que a lipase estafilocócica pode afetar a resposta imune eliminando a quimiotaxia dos granulócitos e reduzindo, assim, a fagocitose (SMELTZER; HART; IANDOLO, 1992).

Outro motivo pelo qual se tem estudado a atividade lipolítica em *S. aureus* consiste na preocupação com a qualidade dos alimentos. Tebaldi *et al.* (2008a) relatam que, leites armazenados em tanques de refrigeração permanecem numa temperatura de 14 °C por mais de 24 h, propiciando assim a multiplicação de microrganismos mesófilos, como *S. aureus*, produtores de enzimas extracelulares como proteases e lipases as quais provocam a deterioração do leite.

Pesquisas realizadas na década de 50 indicam vários métodos a serem realizados a fim de caracterizar linhagens quanto à produção de lipase. Dentre estes métodos utiliza-se a gema de ovo e/ou o Tween 80 contidos no meio de cultura. Essas pesquisas verificaram que o método com Tween é mais sensível ao comparar com o método realizado com gema de ovo, visto que apresentou características mais idênticas entre as linhagens (JESSEN *et al.*, 1959).

Sierra (1957) considerou os Tweens como substratos de grande vantagem para caracterização lipolítica de microrganismos. Dentre as vantagens: (i) provimento do ótimo contato entre células e substrato; (ii) possibilidade de uso para testar substratos específicos a exemplo de ácidos graxos pelo fato de sua composição já ser conhecida e; (iv) desenvolvimento de hidrólises, evitando dessa forma o uso de corantes tóxicos.

Shelley, Deeth e Macrae (1987) afirmam que o meio Agar com emulsão de gema de ovo ou lecitina não detectam a atividade lipolítica especificamente, pois sua degradação pode acontecer pela fosfolipases e/ou lípases. Ademais os autores relataram uma dificuldade na interpretação dos resultados, pois as reações de lecitina no Agar envolvem fosfolipase C (zonas opacas) e fosfolipase A (zonas claras) e isto não indica precisamente a presença de lipase. Por outro lado, a degradação em Tween 80 é específica para atividade lipolítica. Lipólise de Tween 80

é caracterizada pelo aparecimento de uma zona opaca devido à precipitação da liberação de ácidos graxos que combinam com cálcio para formar sal (Figura 2) (NOSTRO *et al.*, 2001).

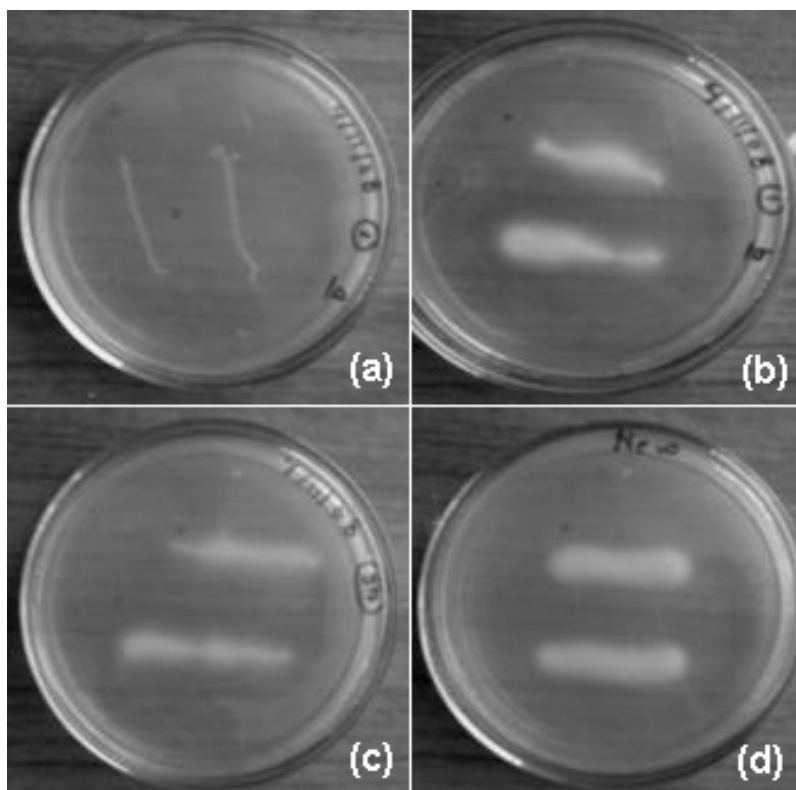


Figura 2 - Demonstração da atividade lipolítica utilizando Tween 80 como substrato. (a) cepa sem atividade lipolítica; (b), (c) e (d) cepas com atividade lipolítica (GUPTA; UPADHYAY; SHRIVASTAVA, 2011)

Outro método muito utilizado é a adição de tributirina ao Agar. A tributirina é um substrato conveniente, pois se incorpora facilmente ao Agar e quando ocorre hidrólise permite fácil visualização. Este método não tem sido indicado para detectar microrganismos produtores de lipase isolados de produtos lácteos devido à baixa correlação entre a atividade da tributirinase e a hidrólise de lipídeos (SHELLEY; DEETH; MACRAE, 1987).

Hasan, Shah e Hameed (2009) relatam que além das características do meio de cultura (disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio e a presença de ativadores, estimulantes e inibidores) exercer influência sobre a síntese lipolítica em microrganismos, outras condições também podem influenciar como a temperatura

de incubação; o pH e o inóculo. Já para Shelley, Deeth e Macrae (1987), três fatores devem funcionar simultaneamente: (i) o microrganismo precisa crescer, (ii) o microrganismo tem que produzir e liberar lipase nas condições de cultivo existentes e, (iii) o método de detecção deve ser suficientemente sensível.

2.3.2 Atividade bacteriocinogênica e sensibilidade à bacteriocina

Como anteriormente mencionado, os consumidores vem buscando alimentos naturais, frescos, minimamente processados, com boa palatabilidade e altamente seguro, de modo que para alcançar todas estas exigências, os produtos nem sempre passam pelos métodos de tratamentos convencionais para conservação, optando assim por tratamentos alternativos, como por exemplo, os antibióticos naturais, dentre eles, as bacteriocinas (SOBRINO-LÓPEZ; MARTIN-BELLOSO, 2008). A ação inibitória das bactérias faz-se útil na prevenção e/ou tratamento de infecções bacterianas, podendo complementar ou substituir compostos antimicrobianos clássicos (NACIMENTO *et al.*, 2006).

Bacteriocinas são proteínas produzidas por peptídeos antimicrobianos, sintetizados nos ribossomos da célula bacteriana. Podem ser codificadas por genes encontrados nos cromossomos, mas a maioria parece ser mediada por transposon ou plasmídeo, onde as características de seus genes parecem estar associadas em estruturas multigênicas semelhantes ao operon. Além disso, há algumas diferenças destas bacteriocinas ao compará-las com as características das colicinas, visto que o seu espectro de atividade não está limitado a microrganismo da mesma espécie ou de espécies relacionadas (JACK; TAGG; RAY, 1995).

Geralmente são classificadas de acordo com as diferenças de suas moléculas, e são divididas em até quatro classes, embora nem todas tenham sido bem elucidadas. As mais estudadas são as Classes I e II. A Classe I são moléculas de 19 a 50 peptídeos ou mais e são caracterizadas por conter aminoácidos não usuais. A Classe II consiste em peptídeos pequenos, de alta estabilidade e não modificados. Entretanto, há poucos registros sobre as Classes III e IV, de modo que tem se estabelecido que as bacteriocinas da Classe III são termolábeis e a Classe IV são aquelas que formam complexos de grandes dimensões com outras

macromoléculas (CLEVELAND *et al.*, 2001). Nascimento *et al.* (2006) afirmam que as aureucinas são bacteriocinas típicas da Classe II.

Gratia (1925) foi o pioneiro a estudar a atividade bacteriocinogênica, quando demonstrou o efeito inibidor de *Escherichia coli* V (CA7) no crescimento de *E. coli* (CA81), sendo denominada então de “colicina” por Fredericq (1948). Tempos depois, verificou-se que esta é uma característica relativa ao universo bacteriano, pois, tal atividade é característica de várias espécies conhecidas. Desta forma, a denominação pôde ser baseada no gênero das cepas produtoras, como por exemplo, “rizobiocina” de *Rhizobium* spp. (VINCENT, 1977), ou então baseada na espécie, como, por exemplo: “mutacina” de *Streptococcus mutans* (HAMADA; OOSHINA, 1975). Alguns pesquisadores sugeriram que a nomenclatura continuasse a ser “colicina” para a bacteriocina produzida por *E. coli*, por ser mais estudada e caracterizada ou reservando-se a denominação mais geral de “bacteriocina” (Bac) para as substâncias com atuação semelhante à produzida por *E. coli*. Assim, Reeves (1972) propôs que à medida que tais bacteriocinas fossem mais estudadas, sua denominação partiria do segundo critério, isto é, do nome específico.

Desde a década de 70, estudos epidemiológicos recebem uma importância através de esquemas de tipagem com base na produção de bacteriocinas e na sensibilidade a estas substâncias (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976). Nos últimos anos, técnicas moleculares têm avançado em novas ferramentas para estudos sobre o potencial bacteriocinogênico, e a capacidade de proliferação e inibição de microrganismos indesejáveis ou mesmo sobre resposta a fatores de *stress* em ecossistemas de alimentos (GÁLVEZ *et al.*, 2007).

Sabe-se que a maioria das bacteriocinas é transportada para o meio extracelular pelo sistema ABC (sistema transportador). Este sistema possui uma cadeia de aminoácidos N-terminal que exerce atividade proteolítica, clivando a dupla glicina com simultânea ativação da bacteriocina que, por sua vez, inibe a célula-alvo através da formação de poros na membrana, esgotando seu potencial transmembrânico e/ou seu gradiente do pH, resultando desta forma na perda de material celular. Além deste mecanismo, estudos indicam que partículas hidrofóbicas das bacteriocinas com cargas positivas se ligam aos grupos fosfato de cargas negativas presentes na membrana da célula-alvo, favorecendo assim a formação de poros (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Uma das bactérias mais conhecidas como produtoras de bacteriocinas são as bactérias ácido lácticas. Bacteriocinas destas bactérias podem ser antagônicas a inúmeros agentes patogênicos veiculados por alimentos, tais como *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*. Atualmente, a nisina é a única bacteriocina aceita como conservante de alimentos, já sendo permitido seu uso em mais de 45 países (ASLIM *et al.* 2005; RILEY; WERTZ, 2002).

Muito tem se pesquisado sobre bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, entretanto, pesquisas com bactérias Gram positivas vem sendo evidenciadas. No Brasil, Netz *et al.* (2001) identificaram bacteriocina produzida por *S. aureus* (A70) isolado de leite comercial, a qual foi denominada A70, que demonstrou atividade contra bactérias Gram positivas, incluindo *Listeria monocytogenes*. Este mesmo grupo de pesquisadores identificou outra aureucina, a A53, produzida por *S. aureus* (A53) isolado de leite pasteurizado, a qual demonstrou atividade bactericida também frente a cepas de *L. monocytogenes* e de *S. aureus* envolvidas em mastite bovina (NETZ, 2002).

Ainda em relação aos estudos citados acima, os pesquisadores verificaram que o determinante genético para a produção tanto da aureucina A53 como da aureucina A70 está localizado num único plasmídeo (pRJ9 para A53 e pRJ6 para A70) encontrado em cada microrganismo produtor.

2.3.3 Resistência bacteriana a antibióticos

Os antibióticos são usados há mais de cinquenta anos pela medicina humana e veterinária, pela indústria e agricultura para preservação de alimentos e para suplementação de rações, sendo também utilizados para ambiente hospitalar e doméstico a fim de minimizar e/ou tratar infecções e intoxicações. O uso destes antibióticos de forma repetitiva e, às vezes inadequada, vem provocando a seleção de microrganismos que por meio de vários mecanismos tornam-se resistentes. Além disso, os antibióticos provocam efeitos sobre a microbiota normal dos organismos podendo também provocar problemas de saúde como reações alérgicas (pelo uso da penicilina), lesões da medula óssea (pelo cloranfenicol), distúrbios ósseos e

odontológicos em crianças (pela tetraciclina), entre outros (AZEVEDO, 2008; FREITAS *et al.*, 2004; GERMANO; GERMANO, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Na década de 40, com o surgimento da penicilina e seu uso clínico ocorreu uma diminuição dos casos de infecção. No entanto, poucos anos depois já foram detectadas cepas de *S. aureus* resistentes. Logo, nos anos 60 a meticilina foi descoberta. Esta droga é do grupo das penicilinas e foi a primeira droga das penicilinas semi-sintéticas a ser utilizada para fins clínicos, porém nos anos 70 verificou-se que algumas cepas de *S. aureus* apresentavam-se resistentes a esta droga e a outras drogas betalactâmicas. Essas cepas foram denominadas como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Já a vancomicina foi descoberta em 1956, mas teve pouco uso por causa da ótima eficácia da meticilina e de outros agentes antiestafilococos como cefalosporina, tetraciclina e eritromicina A. Da mesma forma, cepas criaram resistência também sobre a vancomicina, registrada no ano de 1997 no Japão. Estas cepas foram denominadas como *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) (AFONSO, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana ocorre por mutações ou por marcadores, os quais permitem que este fenótipo seja transferível para outros microrganismos por meio de conjugação, transdução e transformação (TAVARES, 2000). Há três tipos de mecanismos de resistência: um deles é pelo bombeamento do fármaco para o meio extracelular, conhecido como o mecanismo de “bomba de efluxo”, onde o fármaco é lançado para fora da célula antes que ele atinja o meio intracelular; outro é pelo mecanismo de inativação do fármaco, quando sua estrutura é alterada, geralmente ocasionado por ação enzimática, e por último, o mecanismo de modificação da enzima ou estrutura-alvo, quando a bactéria resistente “reprograma” o alvo onde o antibiótico agiria. Desta forma, a biossíntese bacteriana não é afetada, apenas a ação do antibiótico (AFONSO, 2008).

Ademais, a resistência bacteriana pode ser classificada em dois tipos: (i) natural ou intrínseca, típica da espécie, sendo transmitida verticalmente para as células-filhas, de caráter hereditário; e (ii) adquirida, surgindo de maneira espontânea, por seleção ou por transferência de genes. Estes genes podem estar no cromossomo ou em partículas extracromossomais, como por exemplo, os plasmídeos e transposons (AFONSO, 2008; KONEMAN, 2008).

A forma mais comum de resistência a macrolídeos em *S. aureus* é causada pela metilação de um resíduo de adenina no rRNA, o que diminui a afinidade entre o antibiótico e o ribossomo. A síntese da enzima de metilação (metilase) é induzida por concentrações sub-inibitórias de eritromicina ou oleandomicina, tornando a linhagem resistente não só ao indutor, mas também a vários antibióticos macrolídeos, às lincomicinas e às estreptogaminas B (MLS). Também, em várias linhagens a expressão da metilase é constitutiva, independente da presença de eritromicina, levando a resistência a todos os antibióticos macrolídeos (DORNBUSCH; DAHLSTRON, 1973; DUBNAU, 1984).

As cepas que possuem o gene *erm* induzível (gene codificador deste fenótipo) são resistentes ao indutor e permanecem sensíveis aos macrolídeos não indutores e lincosamidas. A eritromicina em baixos níveis é indutora do fenótipo MLS induzível, que é a base do D-teste (NCCLS, 2005; WEISBLUM; DEMOHN, 1969), ilustrado na Figura 3, a qual se observa o efeito da eritromicina reduzindo o halo de sensibilidade à clindamicina, resultando na formação de um halo com forma da letra “D”.

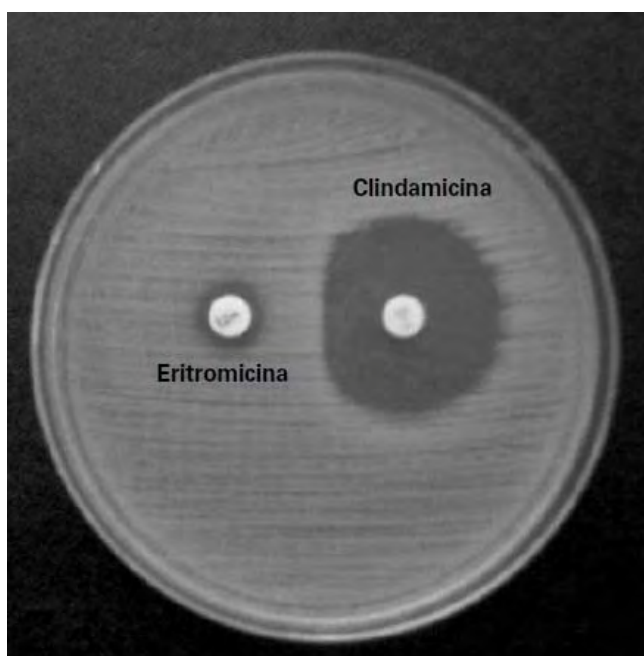


Figura 3 - Representação do D-teste (AMORIM *et al.*, 2009)

A resistência bacteriana aos antibióticos envolve vários mecanismos. O principal é provocado pela transferência de genes das bactérias para humanos ou para outros microrganismos, sendo o alimento uma das vias utilizadas. Isto acontece quando há, no alimento, bactérias portadoras de genes codificadores de resistência. Ao ingerir o alimento, e este ao chegar ao trato gastrointestinal, estas bactérias passam seus genes para outras bactérias da mesma espécie ou até de espécies diferentes, relacionadas ou não à patogenicidade. Um dos gêneros que se destacam na aquisição desta resistência é o gênero *Staphylococcus*, cujas espécies representam grande perigo para a saúde humana. Mas ainda, o perigo maior está naquelas cepas multirresistentes, ou seja, cepas que resistem a vários antibióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006; RAPINI *et al.*, 2004; SIMEONI *et al.*, 2008).

A resistência microbiana a antibióticos é um dos maiores problemas da Saúde Pública em todo o mundo, pois a circulação destas cepas resistentes está em todo o ambiente, principalmente na água e nos alimentos. Para verificar a resistência/sensibilidade utiliza-se antibiograma (resistotipagem), que é um teste realizado em laboratório muito importante para a terapêutica clínica e para o controle rápido de infecções em surtos epidemiológicos. Além disso, usa-se o antibiograma a fim de caracterizar o fenótipo destes microrganismos e para complementar os dados fenotípicos obtidos pela resistotipagem, faz-se útil o uso de técnicas moleculares como PCR, hibridação com sondas de DNA e RNA, análise por proteínas de restrição, as quais servem para identificar precisamente genes de resistência (LIMA, 2002; NORMANNO *et al.*, 2007).

A importância da resistotipagem tem sido ressaltada, inclusive com drogas sem uso terapêutico, como por exemplo, sais de metais pesados, ou drogas já de baixo valor terapêutico, como antibióticos clássicos, mas cujas resistências são importantes marcadores genéticos e epidemiológicos, a fim de se distinguir novas linhagens de *S. aureus*, daquelas endêmicas, bem como para um melhor entendimento da evolução da resistência a drogas em um ambiente particular (GILLESPIE *et al.*, 1990; PEREIRA; SIQUEIRA-JUNIOR, 1995).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO AMOSTRAL

Foi realizado um levantamento prévio sobre quais marcas de queijos ricota eram comercializadas em 10 supermercados situados na cidade de João Pessoa-PB durante o mês de agosto de 2009. Após o levantamento, foi estabelecido que o período de coleta das amostras e o isolamento das cepas seriam realizados nos meses de outubro a novembro do mesmo ano.

Então, no período estabelecido para os procedimentos, foram adquiridas 11 amostras de 07 marcas de queijos ricota comercializadas em 04 supermercados da cidade de João Pessoa-PB. As marcas foram codificadas de A-G, sendo que duas amostras das marcas A e C e três amostras da marca B eram de lotes diferentes. Cada amostra foi representada por uma unidade de 200g a 500g do queijo. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas e transportadas em recipiente isotérmico e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

3.2 ISOLAMENTO DE *S. aureus* EM QUEIJOS RICOTA

O isolamento de *Staphylococcus aureus* foi realizado de acordo com Bennett *et al.* (1986), Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995) e Downes e Ito (2001). Inicialmente, realizou-se a homogeneização de cada amostra (porção de 25 g) em água peptonada 0,1% esterilizada (225 mL) utilizando homogenizador de amostras tipo *Stomacher*. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-4}) das amostras utilizando água peptonada 0,1% esterilizada. Fez-se o plaqueamento das diluições seriadas em Agar Baird-Parker (Difco), adicionado de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (meio seletivo e diferencial para *Staphylococcus*), sendo as placas incubadas em estufa a 37 °C por 18 a 24 horas. Colônias características foram selecionadas (colônias circulares,

pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, apresentando massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca).

Após a seleção das cepas características, cada colônia foi isolada em Agar Brain Heart Infusion (BHI, Difco), sendo em seguida submetidas a testes confirmatórios por meio de provas morfológicas (coloração de Gram) e bioquímicas (testes de catalase, termonuclease, coagulase e fermentação de manitol). As cepas selecionadas foram estocadas sob refrigeração (7 °C) em tubos de ensaio contendo Blood Agar Base (BAB, Difco) inclinado. Ao fim desta etapa, obteve-se um total de 41 cepas de *S. aureus* conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Relação das amostras de queijos ricota com suas respectivas marcas e codificação das cepas isoladas

Queijos	Marcas	Cepas isoladas
QR1	A	QR1-1
QR2	B	QR2-1, QR2-2, QR2-4, QR2-5, QR2-6, QR2-7
QR3	C	QR3-3, QR3-4, QR3-5, QR3-7
QR4	D	Ausência de <i>S. aureus</i>
QR5	E	Ausência de <i>S. aureus</i>
QR6	B	QR6-1, QR6-2, QR6-4, QR6-5, QR6-6, QR6-7, QR6-8, QR6-9, QR6-10
QR7	F	QR7-1, QR7-2, QR7-3, QR7-4, QR7-5, QR7-8
QR8	G	QR8-3, QR8-5, QR8-6, QR8-7, QR8-8, QR8-9, QR8-10
QR9	A	Ausência de <i>S. aureus</i>
QR10	B	QR10-1, QR10-2, QR10-3, QR10-4, QR10-6, QR10-7, QR10-9, QR10-10
QR11	C	Ausência de <i>S. aureus</i>

QR: queijo ricota

3.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

3.3.1 Atividade lipolítica

As cepas ensaiadas foram inicialmente semeadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, um alíquota (100 µL) da cultura do microrganismo foi semeada em Agar Tween-cálcio e incubadas a 37 °C por 48 horas.

Para a verificação da atividade lipolítica das cepas foi utilizado o Agar Tween-cálcio (SIERRA, 1957 - peptona, 10g/L; cloreto de sódio, 5 g/L; cloreto de cálcio, 0,1 g/L; Agar, 15g/L; Tween 80, 10ml/L; autoclavado separadamente e adicionado ao meio a 45 °C, com rigorosa agitação; pH 7,4). O Tween 80 é um éster do ácido oléico, substrato para lípase, o qual quando hidrolisado pela lípase forma uma halo visível (constituído de cristais de sal de cálcio do ácido graxo liberado por lipólise) ao redor de colônias com atividade lipolítica. A leitura foi efetuada considerando um halo constituído de cristais de sabão de cálcio ao redor do crescimento.

3.3.2 Ensaio da atividade bacteriocinogênica

O método utilizado foi baseado no clássico descrito por Fredericq (1957), que envolve o cultivo seqüencial, numa mesma placa, da cepa produtora e de uma cepa indicadora sensível a bacteriocina. Foi utilizado meio de cultura tamponado - Buffered Peptone Water (BPW, Difco) - a fim de evitar eventuais resultados falsos positivos devido à produção de ácidos orgânicos.

Suspensão de 18-24 h da cepa bacteriocinogênica (ou a ser avaliada como tal) foi inoculada como um inóculo circular (1 cm de diâmetro) em placa contendo BPW solidificado com Agar 1,5%. Após incubação a 37 °C, por 24 horas, as bactérias foram mortas por exposição a vapor de clorofórmio durante 30 minutos. A seguir, 0,1 mL de uma suspensão de 18-24 horas da cepa indicadora (ou a ser

avaliada como sensível) foi adicionado a 3 mL de meio semi-sólido (BPW com Agar 0,75%) e vertido sobre as placas. Após incubação a 37 °C, por 24 horas, a atividade bacteriocinogênica foi indicada por uma zona de inibição da cepa indicadora ao redor de cada inóculo.

3.3.3 Resistotipagem

3.3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi feita de acordo com as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). Este método tem como finalidade verificar se as cepas a serem pesquisadas possuem resistência ou sensibilidade aos antibióticos testados e também verificar sua variabilidade entre isolados do mesmo queijo. Foram utilizados os antibióticos eritromicina, penicilina G, estreptomicina e tetraciclina, os quais são considerados clássicos por Watts e Salmon (1997).

Placas de Petri descartáveis contendo BAB foram preparadas com concentrações dobradas e crescentes, numa escala de 256 a 0,015625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para cada antibiótico. Logo após, suspensões de 18-24 h das cepas em caldo BHI foram semeadas com multi-alça (17 inóculos por placa, sendo dois destes o controle positivo e outro o controle negativo). Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa com temperatura em torno de 37 °C, por um período de 18-24 h.

Considerou-se como CIM a concentração do antibiótico ($\mu\text{g}/\text{mL}$) que inibiu totalmente o crescimento das cepas testadas e a partir dos valores de CIM, as cepas foram classificadas como resistente (R) ou sensível (S) de acordo com critérios apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação das cepas de *S. aureus* quanto aos valores de CIM

Antibióticos	CIM (µg/mL)	Referência
Eritromicina	S ≤ 0,5; R ≥ 8	NCCLS, 2003
Estreptomicina	R ≥ 16	GILLESPIE <i>et al.</i> , 1990
Penicilina	S ≤ 0,125	NCCLS, 2003
Tetraciclina	S ≤ 4; R ≥ 16	NCCLS, 2003

3.3.3.2. Detecção do tipo de resistência a antibióticos macrolídeos pelo método de Weisblun e Demohn (1969)

As cepas que se revelaram resistentes a eritromicina foram ensaiadas com o objetivo de verificar o tipo de resistência apresentada (indutiva ou constitutiva). Para cada cepa foi utilizada uma placa contendo 20 mL de Agar Muller Hinton (Difco) preparada no dia anterior. Para o preparo do inóculo, 4 a 5 colônias foram transferidas para 0,5 mL de BHI e inoculadas por 24 horas a 37 °C. O crescimento bacteriano resultante foi diluído a 10⁻² em solução salina (0,85% NaCl) esterilizada e semeada com *swab*. Em seguida, foi feita a aplicação dos discos de eritromicina (15 µg, Laborclin), clindamicina (2 µg, Laborclin). e lincomicina (2 µg, Laborclin). Os discos foram colocados um ao lado do outro, sendo que o disco de eritromicina foi colocado entre os outros dois discos, mantendo-se entre eles a distância de 1 cm. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas.

A resistência foi caracterizada como indutiva quando ocorria uma diminuição do raio do halo de inibição de lincomicina e/ou clindamicina ao lado em que ficava próximo ao eixo da eritromicina (halo em “D”), e como resistência constitutiva, quando não ocorria a formação do halo em “D”

REFERÊNCIAS

- AFONSO, I. F. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana**. 2008, 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- ALARCÓN, M. M. V. **Efeito Inibitório dos Óleos Essenciais no Crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em Queijo Ricota**. 2007, 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007
- AMORIM, D. M. R.; PERSON, O. C.; AMARAL, P. J.; TANAKA, I. I. Resistência induzível à clindamicina entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 401-405, 2009.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists International. **Official methods of analysis**, 16th. sec. 975.55. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, V.A. 1995.
- ARVIDSON, S. Extracellular enzymes. In FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P.; FERRETTI, J. J.; PORTNOY, D. A.; ROOD, I. R. **Gram-Positive Pathogens**, ASM Press, Washington, DC, p. 379-386, 2000.
- ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z. N.; SARIKAYA, E.; BEYATLI, Y. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 691-694, 2005.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de Microrganismos**. 2. ed., ver. ampl., Goiânia, Ed. UFG, 2008, 535p.
- BENNETT, R. W.; YETERIAN, M.; SMITH, W.; COLES, C. M.; SASSAMAN, M.; MCCLURE, F. D. *Staphylococcus aureus*: identification characteristics and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 5, p. 1337-1339, 1986.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. N. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; EIF, C.; VILLANI, F.; BECKER, K. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin Gene Cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6117-6123, 2006.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.

BRASIL. Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996. Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília-DF, 11 mar. 1996, p. 3977-3978.

BRASIL. Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília-DF, 02 jan. 2001, p. 1-54.

CHOKESAJJAWATEE, N.; PORNAEM, S.; ZO, Y.; KAMDEE, S.; LUXANANIL, P.; WANASEN, S.; VALYASEVI, R. Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 547-551, 2009.

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

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco. Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DORNBUSCH, K.; DAHLSTRON, A. A genetic study of inducible erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 81, n. 5, p. 497-507, 1973.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association (APHA), 4th ed. Washington, 2001, 676p.

DUBDAU, D. Translational attenuation: the regulation of streptogramin B antibiotics. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 16, n. 2, p. 103-132, 1984.

FREDERICQ, P. Actions antibioques reciproques chez le Enterobacteriaceae. **Revue Belge de Pathologie et de Medicine Experimentale**, [Supl. 4], v. 19, p. 1-107, 1948.

FREDERICQ, P. Colicins. **Annual Review of Microbiology**, v.11, p. 7-22, 1957.

FREITAS, F. I. S. **Caracterização Fenotípica de amostras hospitalares de *Staphylococcus aureus* isoladas no estado da Paraíba**. 1993, 54f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1993.

FREITAS, M. F. L.; MOTA, R. A.; LEÃO, A. D. E. S.; FIGUEIREDO, M. L.; FONTE, M. M.; VIEIRA, R. F. C. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.3, p. 405-407, 2004.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3th ed., v. 1, Academic Press, 2004, 640p.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUL, H.; LÓPES, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**, 2. ed., ver. ampl., São Paulo. Varela, 2003, 665p.

GILLESPIE, M. T.; LYON, B. R.; SKURRAY, R. A. Typing of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* by antibiotic resistance phenotypes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 31, p. 57-64, 1990.

GOTZ, F.; VERHEIJ, H. M.; ROSENSTEIN, R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-3, p. 15-25, 1998.

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de *Colibacille*. **Comptes Rendy de la Sovietê de Biologie**, Paris, 1925.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GUPTA, P.; UPADHYAY, L. S. B.; SHRIVASTAVA, R. Lipase catalyzed-transesterification of vegetable oils by lipolytic bacteria. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 281-288, 2011.

HAMADA, S. T.; OOSHIMA. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. **Journal of Dental Research**, v. 54, n. 10, p. 140-145, 1975.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

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

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. trad. Eduardo César Tomás... [et al.]. 6. ed. Arned, Porto Alegre, 2005, 712p.

JESSEN, O.; FABER, V.; ROSENDAL, K.; ERIKSEN, K. R. Some properties of *Staphylococcus aureus*, possibly related to pathogenicity. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 47, n. 1, p. 316-326, 1959.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 376-380, 1995.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C.; PROCOP, G. W.; WOODS, G. L. **Diagnóstico Microbiológico**, 6. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008, 1608p.

KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIN, P.; DROSINOS, E. H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 805-815, 2010.

LACEY, R. W. Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. **Bacteriological Review**, v. 39, n. 1, p. 1-32, 1975.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S., SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da Síndrome do Choque Tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

LIMA, A. F. ***Staphylococcus coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de coalho***. 2005, 85f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005

LIMA, Z. N. **Resistotipagem de Amostras Humanas Comunitárias de *Staphylococcus aureus* Isoladas no Estado da Paraíba**. 2002, 77f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

MAIA, S. R.; FERREIRA, A. C.; ABREU, L. R. Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 28, n. 2, p. 358-365, 2004.

MODLER, H. W.; EMMONS, D. B. The use of continuous ricotta processing to reduce ingredient cost in further processed cheese products. **International Dairy Journal**, v. 11. n. 4-7, p. 517-523, 2001.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFAUER M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 7th ed., DC: American Society for Microbiology, Washington, 1999, 116-137p.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAUER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2006, 962p.

NASCIMENTO, J. S.; CEOTTO, H.; NASCIMENTO, S. B.; GIAMBIAGI-DEMARVAL; SANTOS, K. R. N.; BASTOS, M. C. F. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 215-221, 2006.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 27 mai. 2009.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standard. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, Approved Standard, 6th. ed. NCCLS document, M7-A6, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, [15th Informational Suppl.]. NCCLS document M100-S15, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005.

NETZ, D. J. A.; POHL, R.; BECK-SICKINGER, A. G.; SELMER, T.; PIERIK, A. J.; BASTOS, M. C. F.; SAHL, H. G. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 3, p. 745-756, 2002.

NETZ, D. J. A.; SAHL, H. G.; MARCOLINO, R.; NASCIMENTO, J. S.; OLIVEIRA, S. S.; SOARES, M. B.; BASTOS, M. C. F. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 311, n. 3, p. 939-949, 2001.

NIKOLEIT, K.; ROSENSTEIN, R.; VERHEIJ, H. M.; GÖTZ, F. Comparative biochemical and molecular analysis of the *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* and a hybrid lipase. Indication for a C-terminal phospholipase domain. **European Journal of Biochemical**, v. 228, n. 3, p. 732-738, 1995.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 290-296, 2007.

NOSTRO, A.; CANNATELLI, M. A.; CRISAFI, G.; ALONZO, V. The effect of *Napeta cateria* extract on adherence and enzyme production of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, n. 6, p. 583-585, 2001.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, M. H. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 510-516, 2006.

PEREIRA, M. S. V. **Alguns aspectos genéticos da resistência a drogas em amostras bovinas de *Staphylococcus aureus* isoladas no estado da Paraíba.** 1992, 87f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1992.

PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 391-395, 1995.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIZZILLO, M.; CLAPS, S.; CIFUNI, G. F.; FEDELE, V.; RUBINO, R. Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. **Livestock Production Science**, v. 94, n. 1-2, p. 33-40, 2005.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. [Comunicação]. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.1, p.130-133, 2004.

REEVES, P. **The bacteriocins.** Springer Veriag, New York, 1972, 141p.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SIDRÉ, A. F.; ABREU DE, L. R.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de Ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 29, n. 1, p. 113-117, 2005.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, p. 117-137, 2002.

SANDEL, M. K.; MCKILLIP, J. L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v. 15, n. 1, p. 5-10, 2004.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FEITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. L.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. A. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 4, n. 6, p. 413-423, 2007.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101-115, 1999.

SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C.; MACRAE, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, n. 3, p. 123-137, 1987.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek: International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 23, n. 1, p.15-22, 1957.

SIMEONI, D.; RIZZOTTI, L.; CONCCONCELLI, P.; GAZZOLA, S.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 196-201, 2008.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SMELTZER, M. S.; GILL, S. R.; IANDOLO, J. J. Localization of a chromosomal mutation affecting expression of extracellular lipase in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 174, n.12, p. 4000-4006, 1992.

SMELTZER, M. S.; HART, M. E.; IANDOLO, J. J. Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, n. 9, p. 2815-2819, 1992.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTIN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 4, p. 329–343, 2008.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICOLLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; RAMALHO, G. C. A.; PICCOLI, R. H. Bactérias da família Enterobacteriaceae isoladas durante a vida de prateleira de ricota. **Higiene Alimentar**, v. 22, n. 166-167, p. 100-104, 2008.

VINCENT, J. M. *Rhizobium*: General microbiology. In: HARDY, R. W. F.; SILVER, W. S. A. **Treatise on dinitrogen fixation**, John Wiley & Sons, New Work, 1977, 278-355p.

WATTS, J. L.; SALMON, S. A. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce β -Lactamase. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 4, p. 788-791, 1997.

WEISBLUM, B.; DEMOHN, V. Erytromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved. **Journal of Bacteriology**, v. 98, n. 2, p. 447-452, 1969.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO 1

ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO RICOTA

Artigo elaborado a partir de resultados obtidos da presente dissertação, a ser submetido ao ***Brazilian Journal of Microbiology***, ISSN: 1517-8382, Qualis B2 (Ano-base: 2008), área: Medicina II.

ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO RICOTA

Taiz Siqueira Pinto¹, Cybelle Pereira de Oliveira¹, Ana Carolina Vieira da Costa², Evandro Leite de Souza^{2*}, José Pinto de Siqueira-Junior¹

¹ Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

² Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

RESUMO

O queijo ricota por ser um alimento rico em nutrientes e possuir elevada atividade de água caracteriza-se como um substrato com condições satisfatórias para o crescimento de microrganismos patogênicos, incluindo *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* tem revelado de grande importância para Saúde Pública, devido sua patogenicidade provocada pela ação de toxinas e enzimas extracelulares, como, a lipase. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade lipolítica de cepas de *S. aureus* isoladas de queijos ricota da cidade de João Pessoa-PB, Brasil. De um total de 41 cepas testadas, verificou que 34 (82,9%) mostraram-se lipase positivas, revelando a sua importância na deterioração dos alimentos, em soma ao seu potencial de atuação como agente patogênico quando considerado a participação da enzima lipase no estabelecimento da virulência das cepas do microrganismo.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, lípase, virulência, ricota

INTRODUÇÃO

O queijo ricota tornou-se um dos alimentos mais consumidos nas dietas alimentares devido ao seu baixo teor de gordura, ausência de sal e fácil digestão (17). Por ser um alimento rico em nutrientes e possuir elevada atividade de água caracteriza-se como um substrato com ótimas condições para o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, os quais quando presentes podem comprometer o seu tempo de vida de prateleira, bem como atuarem como causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (10).

A incidência de *Staphylococcus aureus* em alimentos é alta, principalmente em alimentos de origem animal que foram manipulados ou então naqueles que não passaram por processamento térmico. Frequentemente, estes microrganismos são encontrados em pequenas quantidades, o que já indica um risco para a qualidade do alimento (7). *S. aureus* tem sido reconhecido como agente etiológico da maioria dos casos de surtos de doenças de origem microbiana transmitidas por alimentos, tornando-se assim um dos microrganismos de maior interesse para a segurança microbiológica de alimentos (3, 18).

A patogenia das infecções provocadas por *S. aureus* depende, principalmente, da produção de proteínas de superfície que agem na adesão do microrganismo aos tecidos do hospedeiro e da produção de proteínas extracelulares (6), dentre as quais podem ser citadas as enzimas catalase, termonuclease, coagulase e lipase. A enzima lipase hidrolisa componentes estruturais lipídicos dos tecidos pela ação da fosfolipase C fosfatidilinositol-específica (18, 11, 19).

O interesse pela atividade lipolítica em *S. aureus* originou-se da correlação entre tal atividade e a patogênese, bem como de seu significado epidemiológico (8).

A atividade lipolítica em *S. aureus* é devida a atividade do gene *geh* (de glicerol ester hidrolase), o qual pode ser negativamente regulado por conversão fágica (9). Embora o preciso papel da lipase no desenvolvimento de infecções estafilocócicas não tenha sido bem esclarecido, foi constatado que o caráter Lip⁺ seria mais comum entre os isolados de infecções profundas, enquanto que o Lip⁻ seria mais comum entre os isolados de infecções superficiais. Além disso, a lipase estafilocócica pode afetar a resposta imune eliminando a quimiotaxia dos granulócitos reduzindo, assim, a fagocitose (21).

Além da patogenicidade, tem-se a preocupação da influência da lipase sobre a qualidade dos alimentos, quando considerado que a presença de microrganismos com atividade lipolítica pode provocar uma deterioração mais acentuada devido a sua ação sobre os lipídeos, com subsequente acúmulo de produtos intermediários e finais que provocam alteração nas características organolépticas, particularmente no sabor e odor dos alimentos (2, 16, 22).

Considerando estes aspectos, o presente estudo teve como objetivo caracterizar cepas de *S. aureus* isoladas de queijos ricota comercializados na cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil) quanto a sua atividade lipolítica.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de queijo ricota

Onze amostras de queijo ricota de diferentes marcas comercializadas na cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil) foram coletadas no período de outubro a novembro de 2009. Após a coleta, as amostras foram codificadas e transportadas ao laboratório em recipiente isotérmico, sendo mantidas em temperatura de

refrigeração (7 °C) até o início dos procedimentos relacionados ao isolamento das cepas de *S. aureus*.

Isolamento de cepas de *S. aureus*

A metodologia empregada para o isolamento de *S. aureus* a partir das amostras de queijo foi a descrita por (4) e (15), que consistiu em: enriquecimento seletivo das amostras (25 g) em caldo Infusão Cérebro Coração (225 mL) adicionado de NaCl (75 g/1000 mL) por 24 horas; preparação de diluições seriadas (10^{-1} – 10^{-4}) do líquido do enriquecimento em água peptonada (10 g/1000 mL) estéril; plaqueamento (alíquota de 100 μ L) das diluições seriadas em Agar Baird-Parker adicionado de telurito de potássio (10 g/1000mL) e emulsão de gema de ovo (50 mL/1000 mL); isolamento das colônias típicas em tubos inclinados contendo ágar nutriente. Em seguida, as cepas isoladas foram submetidas aos testes de identificação através de provas bioquímicas (coloração de Gram, atividade de catalase, reação de coagulase, testes de produção de termonuclease, fermentação do manitol e fermentação de glicose). As cepas confirmadas como *S. aureus* (41 cepas) foram mantidas sob refrigeração (7 °C) em tubos de ensaio contendo ágar nutriente inclinado.

Atividade Lipolítica

Para a verificação da atividade lipolítica das cepas teste foi utilizada a metodologia descrita por Sierra (20). Para tal, foi realizado inicialmente um rejuvenescimento das cepas através da inoculação em caldo infusão cérebro coração por 24 horas a 35 °C. Em seguida, um alíquota (100 μ L) da cultura do microrganismo foi inoculada (plaqueamento em superfície) em placas de Petri

esterilizadas contendo ágar Tweem-cálcio (10g/L; cloreto de sódio, 5 g/L; cloreto de cálcio, 0,1 g/L; ágar, 15g/L; Tweem 80, 10mL/L) por 48 horas a 35 °C. Após o período de incubação, foram consideradas como cepas produtoras de lipase àquelas que apresentaram um halo constituído de cristais de sabão de cálcio em volta de suas colônias, decorrente da ação da lipase sobre o Tween 80 (éster de ácido oléico). Os resultados foram expressos como percentual de cepas produtoras de lipase (Lip⁺) e de cepas não produtoras de lipase (Lip⁻).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cepas isoladas das amostras de queijo ricota incluídas neste estudo, 82,9% (34 cepas) se revelaram lipase positivas (Lip⁺), e 17,1% (07 cepas) se revelaram lipase negativa (Lip⁻). Tebaldi et al. (22) detectaram que 100% das cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite bovino mostraram-se produtoras de lipase. De outra forma, Drosino et al. (5) não encontraram atividade lipolítica em cepas de *Staphylococcus* isoladas de amostras de salsichas fermentadas.

Alguns pesquisadores reportaram que cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos, em contraste com humanas, não apresentam o caráter Lip⁺ (13, 12). Estudos prévios encontraram alta prevalência do caráter Lip⁻ em cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos no Brasil, principalmente naquelas isoladas de fossas nasais e, em menor magnitude naquelas oriundas de úbere (1, 14). De outra forma, em cepas de *S. aureus* isoladas de humano em ambiente hospitalar tem sido detectado alta prevalência de amostras Lip⁺, principalmente naquelas isoladas de ferida cirúrgica (6).

Considerando-se o incipiente número de estudos que abordem a avaliação da atividade lipolítica de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos, e mesmo reconhecendo-se que a deterioração dos alimentos é provocada, principalmente, por enzimas de microrganismos psicrófilos, os resultados encontrados no presente estudo tornam-se relevantes por revelar destacável atividade lipolítica das cepas de *S. aureus* isoladas de queijo ricota, evidenciando sua possível atuação na deterioração de alimentos, bem como seu potencial de atuar como agente causador de doenças quando considerado a participação da enzima lípase no estabelecimento da virulência das cepas do microrganismo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) e FAPESQ (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba, Brasil) pelo apoio financeiro.

REFRÊNCIAS

1. Araújo, M.L.C.; Ito, I.Y.; Santiago, M.E.B.; Cardoso, M.S.; Cunha, E.C. (1986). *Staphylococcus aureus*: Pesquisa de portadores bovinos em lactação e antibiograma das cepas isoladas. *Revista de Microbiologia*, 17, 350-355.
2. Chen, L.; Daniel, R.M.; Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.*, 13(4), 255-275.
3. Cunha Neto. A.; Silva, C.G.M.; Stamford, T.L.M. (2002). *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco. Brasil. *Cienc. Technol. Alim.* 22(3), 263-271.

4. Downes; F.P.; Ito, K. (2001) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. APHA, Washington.
5. Drosinos, E.H.; Paramithiotis, S.; Kolvos, G.; Tsikouras, I.; Metaxopoulos, I. (2007). Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiol.*, 24, 260-270.
6. Freitas, F.I.S. (1993). *Caracterização Fenotípica de amostras hospitalares de Staphylococcus aureus isoladas no estado da Paraíba*. João Pessoa, Brasil, 54p. (M.Sc. Dissertation, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba).
7. Jay, J.M. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. 6th ed. Arned, Porto Alegre.
8. Lacey, R.W. (1975) Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol. Rev.*, 39, 1-32.
9. Lee, C.Y., Iandolo, J.J. (1985). Mechanism of Bacteriophage Conversion of Lipase Activity in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 164(1), 288-293.
10. Maia, S.R.; Ferreira, A.C.; Abreu, L.R.. (2004). Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. *Ciênc. Agrotec.*, 28(3), 358-365.
11. Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Pfauer, M.A. (2006). *Microbiologia Médica*. Elsevier, Rio de Janeiro.
12. O'Toole, D.K. (1987). Differences in egg yolk reaction on Baird-Packer medium between bovine and human strains of coagulase-positive staphylococci. *Lett. Appl. Microbiol.*, 4, 111-112.
13. Owens, J.J.; John, P.C.L. (1975). The egg yolk and lipolytic reaction of coagulase positive staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.*, 39, 23-30, 1975.

14. Pereira, M.S.V. (1992) *Alguns aspectos genéticos da resistência a drogas em amostras bovinas de Staphylococcus aureus isoladas no estado da Paraíba*. João Pessoa, Brazil, 87p. (M.Sc. Dissertation, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba).
15. Pereira, M.S.V.; Siqueira-Júnior, J.P. (1995). Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 391-395.
16. Perry, K.S.P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, 27(2), 293-300.
17. Ribeiro, A.C.; Marques, S.C.; Sidré, A.F.; Abreu De, L.R.; Piccoli, R.H. (2005). Controle Microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. *Ciênc. Agrotec.*, 29(1), 113-117.
18. Sandel, M.K.; Mckillip, J.L. (2004). Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Cont.*, 15, 5-10.
19. Santos, A.L.; Santos, D.O.; Feitas, C.C.; Ferreira, B.L.A.; Afonso, I.L.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.A. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 4(6), 413-423.
20. Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substratos. *Antonie van Leeuwenhoek: Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, 23, 15-22.
21. Smeltzer, M.S.; hart, M.E.; iandolo, J. J. (1992). Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9), 2815-2819.

22. Tebaldi, V.M.R.; Oliveira, T.L.C.; Boari, C.A.; Picolli, R.H. (2008). Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Cienc. Technol. Alim.*, 28(3), 753-760.

APÊNDICE B – ARTIGO 2

**Inhibition of *Staphylococcus aureus* by bacteriocins-like substances produced
by *Staphylococcus pseudintermedius***

Artigo elaborado a partir de resultados obtidos da presente dissertação, a ser submetido ao ***International Journal of Food Microbiology***, ISSN: 0168-1605,

Qualis A1 (Ano-base: 2008), área: Medicina II.

Inhibition of *Staphylococcus aureus* by bacteriocins-like substances produced by *Staphylococcus pseudintermedius*

Taiz Siqueira Pinto^a, Cybelle Pereira de Oliveira^a, Ana Carolina Vieira da Costa^b, Humberto Medeiros Barreto^c, Evandro Leite de Souza^{b*}, José Pinto de Siqueira-Junior^a

^a Laboratory of Genetic of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^c Federal University of Piauí, Amílcar Ferreira Sobral Campus, Floriano, Piauí, Brazil

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

e-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telephone number: + 55 83 3216 7807

Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract:

This study was carried out with the aim of assessing the production of bacteriocin-like substance by *S. pseudintermedius* and evaluating its efficacy in inhibiting the growth of *S. aureus* strains isolated from foods and food processing environments. The ten assayed strains of *S. aureus* isolated from foods were sensitive to the bacteriocin

produced by *S. pseudintermedius* S28 revealing growth inhibition zones with diameter in a range of 14 – 23 mm. Two out of the three tested strains of *S. aureus* isolated from food processing plants were sensitive to the bacteriocin showing growth inhibition zones with diameter in a range of 17 – 23 mm. From these results, *S. pseudintermedius* S28 could be known as an interesting producer of like-bacteriocin substance capable of strongly inhibiting strains of *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus pseudintermedius*, bacteriocins, *Staphylococcus aureus*, food preservation.

1. Introduction

Bacteriocins are ribossomally synthesized antimicrobial peptides produced by some bacteria. In contrast to Gram negative bacteria, bacteriocins from Gram positive bacteria present a wide spectrum of inhibitory activity (Jack et al., 1995).

In *Staphylococcus* genera, the species *S. epidermidis* and *S. aureus* are known as the most important producers of bacteriocins (Nascimento et al., 2006). However, the production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci has already been described (Nascimento et al 2005), including rumen staphylococci (Lauková and Mareková, 1993) and the meat starter culture *Staphylococcus xylosus* (Lauková et al., 2010). Bacteriocins from *Staphylococcus* species have revealed some efficacy for inhibiting food-related bacteria being cited as potential antimicrobial substances for use in food preservation (Galvéz et al., 2007).

Among the most clinically relevant staphylococci in veterinary medicine are the coagulase positive members forming the *Staphylococcus intermedius* - group (SIG), i.e. *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. delphini*. (Weese and van Duijkeren,

2010). Due to its clinical importance, SIG has been subject of numerous studies because its clinical importance (Bannoehr et al, 2007; Fitzgerald, 2009; Blaiotta et al., 2010; Fazakerley et al, 2010), however there is a lack of studies emphasizing the production of bacteriocin-like substances by SIG members.

The aim of this study was to assess the production of bacteriocin-like substances by *Staphylococcus pseudintermedius* and evaluate its efficacy in inhibiting the growth of *S. aureus* strains isolated from foods and food processing environments.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains

The strain *S. pseudintermedius* S28 was assayed for production of like-bacteriocins substances. This strain was isolated from superficial lesions of dogs affected by pyoderma in a private veterinary clinic (Natal, Rio Grande do Norte, Brazil). The strain was identified as coagulase positive by standard procedures and differentiated from *S. aureus* by exhibiting sensitivity to polymyxin B and acriflavine, no production of acid from maltose aerobically and no production of acetoin aerobically (Raus and Love, 1983; Hebert et al, 1988; Roberson et al., 1992; Yang et al., 2006).

Ten strains of *S. aureus* isolated from different samples of ricotta cheese and three strains isolated from different surfaces of food processing plants were tested as revealed strains. These strains were isolated by the standard procedures (Bennett et al. 1986; AOAC, 1995; Downes and Ito, 2001).

Stock cultures of the strains were kept on nutrient agar (Sigma, France) slants under refrigeration, and prior to use they were grown overnight at 37°C in brain heart infusion broth (Sigma, France).

2.2. Assays for inhibitory activity of bacteriocins

The tests to detect bacteriocinogenic activity were performed as described by Giambiagi-deMarval et al. (1990) using buffered medium to avoid false positive results related to the production of organic acids. Briefly, approximately 10^7 cfu/mL of the test bacteriocin-producer strain was spotted on plates containing Buffered Peptone Water (BPW - Sigma, France) added of bacteriological agar (15 g/L). After incubation at 37 °C for 18 h, 3 mL of BPW soft agar (7.5 g/L) containing the indicator strain (approximately 10^5 cfu/mL) were sprayed over the plates previously inoculated with producer strain. The plates were incubated again at 37 °C for 18 h. After the incubation period, the inhibition zones around the spots of the producer strain were measured using calipers. *S. aureus* UT0017 was used as the indicator for production of bacteriocin-like substances by *S. pseudintermedius* (Rogolski and Wiley, 1977).

3. Results and discussion

In previous analysis aiming to assess the production of like-bacteriocin substances for eighteen strains of *S. pseudintermedius*, the strain S28 showed strong capacity for inhibiting *S. aureus* UT0017 forming grown inhibition zones of up to 45 mm diameter. From these findings, the present study was carried out in order to assess the efficacy of the like-bacteriocin substance produced by *S. pseudintermedius* S28 in inhibiting some strains of *S. aureus* isolated from foods and food processing plants. All strains of *S. aureus* isolated from foods were sensitive to

the bacteriocin produced by *S. pseudintermedius* S28 revealing growth inhibition zones with diameter in a range of 14 – 23 mm. Two out of the three tested strains of *S. aureus* isolated from food processing plants were sensitive to the bacteriocin showing growth inhibition zones with diameter in a range of 17 – 23 mm.

Several microorganisms have been identified as producers of bacteriocins (Riley and Wertz, 2002) including *Staphylococcus* species, such as *S. epidermidis* producing epidermin (Fontana et al., 2006), *S. simulans* producing nukacin 3299 (Ceotto et al., 2010), *S. hominis* producing hominicin (Kim et al., 2010) and *S. equorum* producing micrococin P₁ (Carnio et al., 2000) and Aureucin A70 (Netz et al., 2001). Although, some researchers have stated that staphylococcins may be used to avoid food contamination or spoilage, only nisin produced by *Lactococcus lactis* is currently approved for utilization as preservative in foods (Settani and Corsetti, 2008; Bastos et al., 2009).

The results found in this study revealed *S. pseudintermedius* S28 as an interesting producer of like-bacteriocin substance capable of inhibiting strains of *S. aureus* isolated from foods and food processing plants surfaces. These findings encourage further researches focusing on the purification and characterization of the like-bacteriocin substance produced by *S. pseudintermedius* S28 and its inhibitory effect toward other spoilage and pathogenic food-related bacteria regarding a possible use as antimicrobial in foods.

Acknowledgments

The authors thank to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de

, Brasil) and FAPESQ (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba, Brazil) for the financial support.

References

AOAC International, 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC International, Arlington, VA. sec. 975.55.

Bennett, R.W., Yeterian, M., Smith, W., Coles, C.M., Sassaman, M., McClure, F.D., 1986. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. Journal of Food Science 51, 1337-1339.

Bannoehr, J., Zakour, N.L.B., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., Broek, A.H.M., Fitzgerald, J.R., 2009. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. Journal of Bacteriology 189, 8685-8692.

Bastos, M.C.F., Ceotto, H., Coelho, M.L.V., Nascimento, J.S., 2009. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. Current Pharmaceutical Biotechnology 10, 38-61.

Blaiotta, G., Fusco, V., Ercolini, D., Pepe, O., Coppola, S., 2010, Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). Journal of Clinical Microbiology 48, 192-201.

Carnio, M.C., Hölzel, A., Rudolf, M., Henle, T., Jung, G., SchereR, S., 2000. The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P₁ is secreted by the food-borne bacterium

Staphylococcus equorum WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2378-2384.

Ceotto, H., Holo, H., Costa, K.F.S., Nascimento, J.S., Salehian, Z., Nes, I.F., Bastos, M.C.F., 2010. Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. *Veterinary Microbiology* 146, 124–131

Downes, F.P., Ito, K., 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, fourth ed. American Public Health Association (APHA), Washington, 676p.

Fazakerley, F., Williams, N., Carter, S., Mcewan, N., Nuttall, T., 2010. Heterogeneity of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from atopic and healthy dogs. *Veterinary Dermatology* 21, 578-585.

Fitzgerald, J.R., 2009. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Veterinary Dermatology* 20, 490-495.

Fontana, M.B.C., Bastos, M.C.F., Brandelli, A., 2006. Bacteriocins Pep5 and Epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. *Current Microbiology* 52, 350-353.

Gálvez, A., Abrioul, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51–70.

Giambiagi-DeMarval, M., Mafra, M.A., Penido, E.G.C., Bastos, M.C.D., 1990. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 136, 1591-1599.

Hébert, G.A., Crowder, C.G., Hancock, G.A., Jarvis, W.R., Thornsberry, C., 1998. Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these

species and other members of the family *Micrococcaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 1939-1949.

Jack, H.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59, 171–200.

Kim, P.I., Sohng, J.K., Sung, C., Joo, H., Kim, E., Yamaguchi, T., Park, D., Kim, B., 2010. Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, hominicin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399, 133-138.

Lauková, A., Mareková, M., 1993. Antimicrobial spectrum of bacteriocin-like substances produced by rumen staphylococci. *Folia Microbiologica* 38, 74-76.

Lauková, A., Simonivá, M., Stropfová, V., 2010. *Staphylococcus xylosus* S03/1M/1/2, bacteriocin-producing meat starter culture or additive. *Food Control* 21, 970–973.

Nascimento, J.S., Ceotto, H., Nascimento, S.B., Giambiagi-DeMarval, M., Santos, K.R.N., Bastos, M.C.F., 2006. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Letters in Applied Microbiology* 42, 215-221.

Nascimento, J.S., Fagundes, P.C., Brito, M.S.V.P., Santos, K.R.N., Bastos, M.C.F., 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 106, 61-71.

Netz, D.J.A., Sahl, H.G., Marcolino, R., Nascimento, J.S., Oliveira, S.S., Soares, M.B., Bastos, M.C.F., 2001. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular Biology* 311, 939-949.

- Raus, J., Love, D.N., 1983. Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from veterinary clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 18, 789-792.
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology* 56, 117-137.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Besser, T.E., 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 3217-3219.
- Rogolsky, M., Wiley, B.B., 1977. Production and properties of a staphylococcin genetically controlled by the staphylococcal plasmid for exfoliative toxin synthesis. *Infection and Immunity* 15, 726-732.
- Settanni, L., Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Microbiology* 121, 123-138.
- Weese, J.S., van Duijkeren, E., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 140, 418-429.
- Yang, S.J., Dunman, P.M., Projan, S.J., Bayles, K.W., 2006. Characterization of the *Staphylococcus aureus* CidR regulon: elucidation of a novel role for acetoin metabolism in cell death and lysis. *Molecular Microbiology* 60, 458-468.

APÊNDICE C - RESULTADOS A SEREM PUBLICADOS

1 BACTERIOCINOTIPAGEM

Para a realização da bacteriocinotipagem baseada na produção das cepas isoladas de ricota, foi utilizada como indicadora a cepa S54 de *S. aureus*. Essa cepa, pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/CCS/UFPB, foi isolada de superfícies de processamento de alimentos e é altamente sensível a bacteriocina produzida por *S. pseudintermedius* (APÊNDICE B), e também por aquelas produzidas por algumas cepas de *S. aureus* (OLIVEIRA, C. P., comunicação pessoal).

Foi então selecionada como produtora a cepa QR10-9 para a realização da bacteriocinotipagem baseada na sensibilidade das cepas isoladas de ricota. Essa cepa se revelou a melhor produtora de bacteriocina ativa contra a cepa S54 com relação ao diâmetro e aspecto límpido do halo (Figura 1).

Os resultados da bacteriocinotipagem estão apresentados na Tabela 1. Os resultados estão consolidados, por amostras de queijo, na Tabela 2, onde se pode verificar variabilidade entre cepas de um mesmo queijo, ou seja, de um mesmo queijo foram isoladas cepas diferentes quer quanto à produção de bacteriocina, quer quanto à sensibilidade a bacteriocina.



Figura 1 - Atividade bacteriocinogênica da cepa QR10-9 de *S. aureus* frente à cepa S54

Tabela 1 - Bacteriocinotipagem de 41 cepas de *S. aureus* isolados de queijos ricota (diâmetro dos halos em mm)

Cepas	Bacteriocinotipagem	
	Baseada na produção	Baseada na sensibilidade
QR1-1	0	18
QR2-1	0	14
QR2-2	17	0
QR2-4	0	0
QR2-5	17	0
QR2-6	0	0
QR2-7	0	0
QR3-3	0	0
QR3-4	0	18
QR3-5	0	0
QR3-7	0	19
QR6-1	0	0
QR6-2	0	14
QR6-4	0	0
QR6-5	0	17
QR6-6	0	19
QR6-7	0	16
QR6-8	0	0
QR6-9	0	18
QR6-10	0	18
QR7-1	0	18
QR7-2	0	17
QR7-3	0	19
QR7-4	0	16
QR7-5	0	0
QR7-8	0	15
QR8-3	0	0
QR8-5	0	0
QR8-6	0	0
QR8-7	0	0
QR8-8	0	0
QR8-9	0	0
QR8-10	0	0
QR10-1	0	14
QR10-2	0	18
QR10-3	0	0
QR10-4	0	15
QR10-6	20	0
QR10-7	0	0
QR10-9	21	0
QR10-10	0	0
TOTAL	4 (9,76%)	23 (56,1)

Tabela 2 – Bacteriocinotipagem de cepas de *S. aureus* isoladas de 07 amostras de queijo ricota (número de cepas)

Amostras	Bacteriocinotipagem			
	Baseada na produção		Baseada na sensibilidade	
	+	-	R	S
QR1	0	1	0	1
QR2	2	4	5	1
QR3	0	4	2	2
QR6	0	9	3	6
QR7	0	6	1	5
QR8	0	7	7	0
QR10	2	6	2	6

+ cepas produtoras de bacteriocina

- cepas não produtoras de bacteriocina

R cepas resistentes a bacteriocina

S cepas sensíveis a bacteriocina

2. RESISTOTIPAGEM

Ao realizar a resistotipagem através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), estreptomicina foi o antibiótico com maior frequência de resistência (36 cepas; 87,8%), seguido de eritromicina (08 cepas; 19,5%) e penicilina (15 cepas; 26,6%), sendo que tetraciclina foi o único antibiótico em estudo para o qual todas as cepas apresentaram-se sensíveis. Observa-se ainda variabilidade entre as cepas do mesmo queijo. (Tabela 3 e Figuras 2-5)

Tanto cepas resistentes como sensíveis a penicilina apresentaram uma extensa variabilidade com relação à CIM, com uma variação de 0,015625 a 16 µg/mL. Tal variabilidade pode ser entendida como reflexo do caráter multigênico da susceptibilidade de *S. aureus* a penicilina, o que de há muito vem sendo relatado (DEMEREC, 1945; McCALLUM *et al.*, 2010).

Para eritromicina, as cepas classificadas como sensíveis apresentaram uma CIM de 0,5 a 2 µg/mL e as resistentes de 64 e > 256 µg/mL, para estreptomicina, uma CIM de 8 a 128 µg/mL e para tetraciclina, CIM de 0,25 a 2 µg/mL. Em contraste com o verificado no caso da penicilina, essas faixas de valores devem apenas ser reflexo da variação intrínseca dos resultados que se obtém em ensaios para a determinação da CIM (SMITH *et al.*, 2007).

As cepas resistentes a eritromicina (08 cepas) foram submetidas ao teste de Weisblun e Demohn (1969), a fim de determinar o tipo de resistência – indutiva ou constitutiva, sendo que todas mostraram com resistência indutiva

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$) de 41 amostras de *S. aureus* frente a 4 antibióticos

Cepas	ANTIBIÓTICOS			
	Eritromicina	Estreptomicina	Penicilina	Tetraciclina
QR1-1	2	32	0,015625	2
QR2-1	1	32	0,03125	2
QR2-2	1	32	0,015625	0,25
QR2-4	2	128	4	0,5
QR2-5	1	16	0,0625	2
QR2-6	2	64	4	2
QR2-7	1	16	0,5	1
QR3-3	2	32	0,125	0,25
QR3-4	2	32	0,03125	0,25
QR3-5	1	32	2	2
QR3-7	1	8	0,015625	0,25
QR6-1	1	32	0,125	0,25
QR6-2	1	32	0,125	0,5
QR6-4	>256	16	0,25	0,5
QR6-5	1	32	0,125	0,5
QR6-6	2	32	2	2
QR6-7	1	32	0,25	2
QR6-8	1	8	0,125	2
QR6-9	1	64	0,0625	1
QR6-10	2	64	0,0625	2
QR7-1	0,5	16	0,03125	2
QR7-2	1	32	0,015625	0,5
QR7-3	1	32	0,125	0,5
QR7-4	0,5	32	0,015625	0,5
QR7-5	0,5	32	0,125	1
QR7-8	0,5	64	0,015625	1
QR8-3	64	64	4	1
QR8-5	>256	32	1	0,5
QR8-6	>256	64	8	0,5
QR8-7	>256	16	16	1
QR8-8	>256	32	8	2
QR8-9	>256	32	8	2
QR8-10	>256	64	8	0,5
QR10-1	2	32	0,125	0,5
QR10-2	1	8	0,015625	1
QR10-3	2	64	0,015625	2
QR10-4	1	32	0,0625	2
QR10-6	2	64	0,125	1
QR10-7	1	8	8	1
QR10-9	1	16	0,03125	1
QR10-10	1	8	0,015625	1

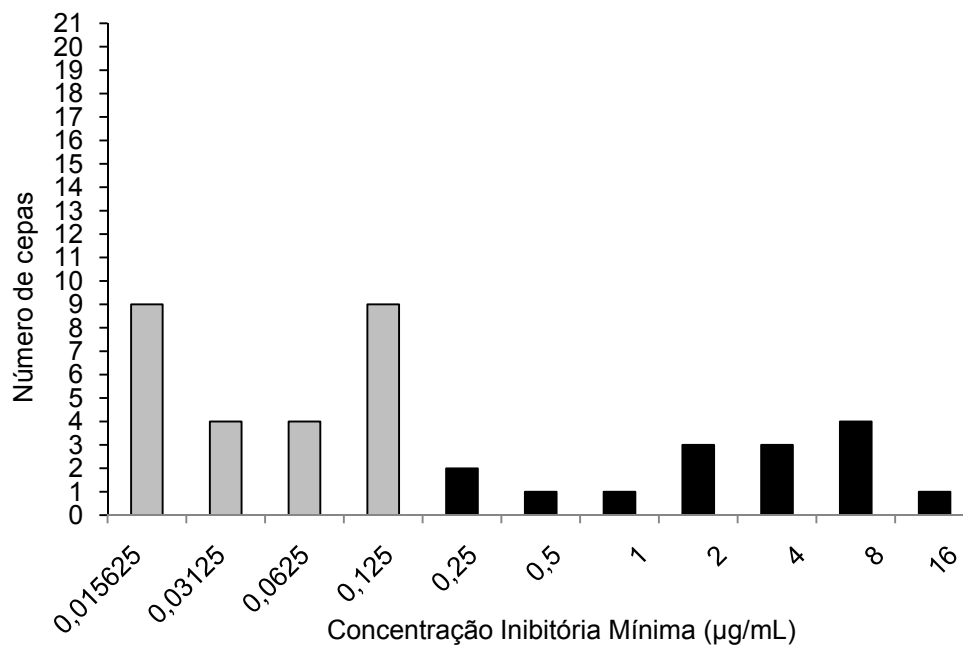


Figura 2 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) de penicilina frente a cepas de *S. aureus* isoladas de queijos ricota.

■ Sensível, ■ Resistente

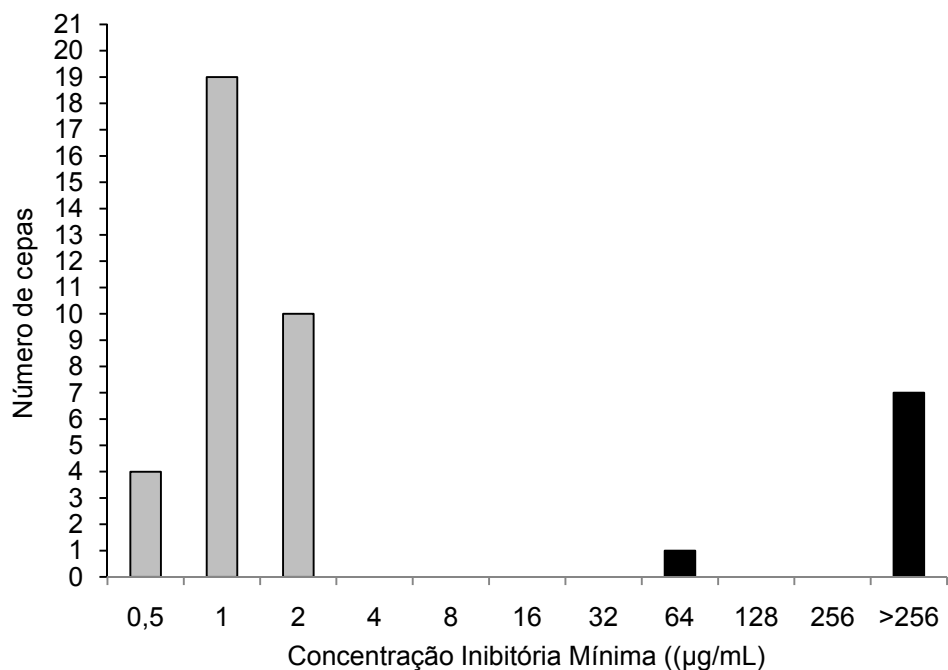


Figura 3 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) de eritromicina frente a cepas de *S. aureus* isoladas de queijos ricota.

■ Sensível, ■ Resistente

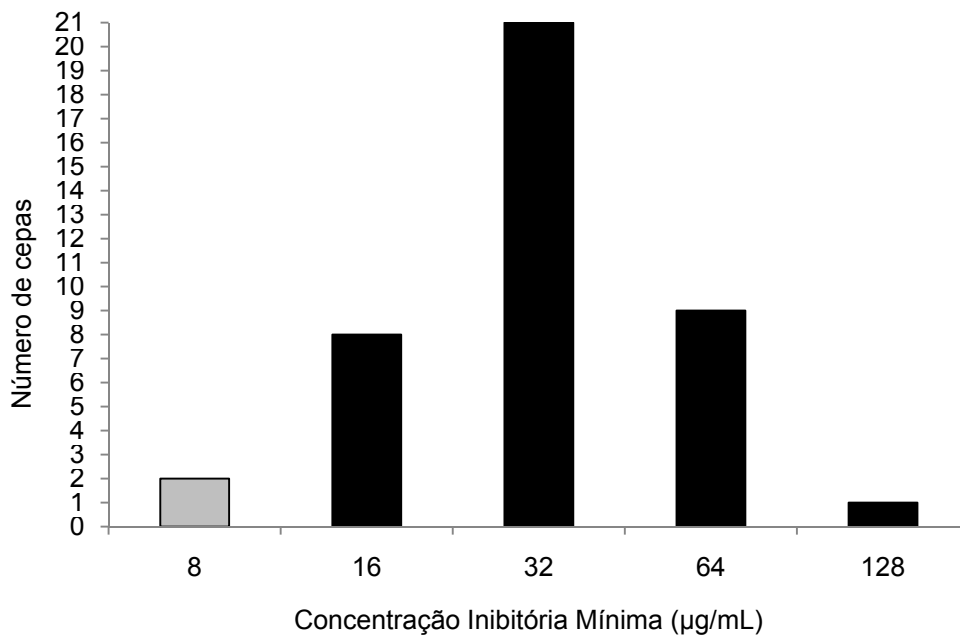


Figura 4 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) de estreptomicina frente a cepas de *S. aureus* isoladas de queijos ricota.
 ■ Sensível, ■ Resistente

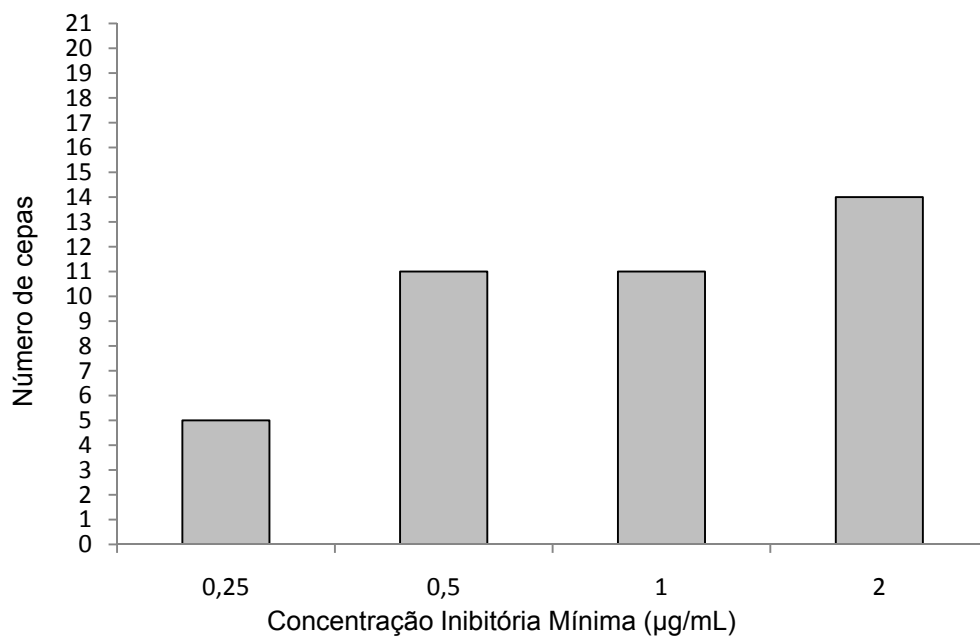


Figura 5 - Fenótipo de resistência e valores de Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) de tetraciclina frente a cepas de *S. aureus* isoladas de queijos ricota.
 ■ Sensível

REFERÊNCIAS

DEMEREK, M. Production of *Staphylococcus* strains resistant to various concentrations of penicillin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 31, n. 1. p. 16-24, 1945.

McCALLUM, N.; BERGER-BÄCHI, B; SENN, M. A. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2-3, p. 118-129, 2010.

SMITH, E. C. J.; WILLIAMSON, E. M.; WAREHAM, N.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 2, p. 210-217, 2007.

WEISBLUM, B.; DEMOHN, V. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved. **Journal of Bacteriology**, v. 98, n. 2, p. 447-452, 1969.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho revelou elevada prevalência de *Staphylococcus aureus* com atividade lipolítica, mostrando assim uma problemática tanto pela sua patogenicidade como pela sua possível atuação na deterioração de alimentos.

Algumas cepas de *S. aureus* revelaram-se produtoras de bacteriocinas, as quais foram capazes de inibir cepas da mesma espécie, inclusive aquelas isoladas do mesmo local, evidenciando assim seu potencial efeito inibitório o qual chama atenção para futuras pesquisas para seu possível uso como antimicrobianos.

A importância da resistotipagem com drogas sem uso ou com pouco uso terapêutico permite distinguir novas linhagens daquelas endêmicas, bem como para melhor esclarecimento da evolução da resistência a drogas em um determinado ambiente.

Sendo assim, marcadores fenotípicos são de extrema importância para caracterizar cepas bacterianas da mesma espécie, a fim de distinguir novas linhagens de *S. aureus* daquelas endêmicas e elucidar de maneira exata a sua evolução em um ambiente particular, além de contribuir para a investigação de seu impacto epidemiológico e na segurança alimentar.