

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação do potencial antimicrobiano da bacteriocina sakacina P frente a isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes

Cristiano Tavares Vieira

Pelotas, 2015

Cristiano Tavares Vieira

Avaliação do potencial antimicrobiano da bacteriocina sakacina P frente a isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Orientador de estágio: MSc. Louise Haubert

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V658a Vieira, Cristiano Tavares
Avaliação do potencial antimicrobiano da bacteriocina sakacina P frente a isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes / Cristiano Tavares Vieira. – 67f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador Wladimir Padilha da Silva.

1.Biotecnologia. 2.Microbiologia de alimentos.
3.Bacteriocina. 4.Conservação de alimentos
5.Multirresistência. I.Silva, Wladimir Padilha da. II.Título.

CDD: 664.001579

Cristiano Tavares Vieira

Avaliação do potencial antimicrobiano da bacteriocina sakacina P frente a isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 04 de Dezembro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)
Doutor em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Doutor em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin – Madison

Dr. Marcelo Mendonça
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho a minha
mãe, minha maior incentivadora.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar um curso de graduação de qualidade;

Ao meu orientador de estágio, Prof. Wladimir Padilha da Silva, pela orientação e oportunidade de estágio, fundamental na minha formação;

À minha orientadora de estágio, Louise Haubert e “tutora” Carla Pohl Sehn, pela paciência, pelo incentivo e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos durante esse período;

Aos meus colegas e amigos da 5ª turma de Biotecnologia, em especial, aos amigos Vinicius, Éverton, Daniel, Martin, Rafael e Natã;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela ajuda (e descontração) durante os experimentos realizados;

Aos amigos, colegas, funcionários e professores do Núcleo de Biotecnologia, pela boa convivência, amizade e aprendizado;

À minha namorada Karina, pelo incentivo, companheirismo, dedicação e carinho que me tem passado por esses quase dois anos de namoro;

À FAPERGS, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Muito Obrigado!

Resumo

VIEIRA, Cristiano Tavares. **Avaliação do potencial antimicrobiano da bacteriocina sakacina P frente a isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes**. 2015. 66f. Trabalho de Conclusão – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Os alimentos podem atuar como vetores na transmissão de bactérias multirresistentes. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. estão entre as mais importantes em alimentos, destacando-se *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*, os quais são estafilococos coagulase positiva (ECP). O uso difundido dos antimicrobianos foi logo seguido pelo surgimento da resistência a múltiplas drogas (MDR). Bactérias MDR são, frequentemente, detectadas em humanos e em animais de países desenvolvidos e em desenvolvimento e constituem uma séria preocupação para a saúde humana. Peptídeos antimicrobianos têm ocupado posição de destaque nas pesquisas como alternativa aos antimicrobianos já utilizados, embora ainda não se tenha conseguido explorar adequadamente todo seu potencial. Entre os peptídeos antimicrobianos de origem bacteriana, destacam-se as bacteriocinas. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano da bacteriocina sakacina P, produzida pelo isolado *Lactobacillus curvatus* LC254, frente a isolados multirresistentes de ECP. Para isso, foram utilizados 12 isolados de *S. aureus*, provenientes de mastite, já identificados, fenotípica e molecularmente, em nível de espécie e caracterizados quanto sua multirresistência e 24 ECPs provenientes de salaminho, caracterizados apenas fenotipicamente. Os 24 isolados de ECP foram submetidos ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos. A atividade antimicrobiana da sakacina P foi quantificada pelo método de diluição crítica, na proporção 1:1 em tampão fosfato salino (PBS), utilizando o método de difusão em ágar. Houve resistência a, pelo menos, um antimicrobiano em 44,8% dos 24 isolados de ECP, enquanto 8,3% apresentaram multirresistência. Dessa forma, foram avaliados 12 *S. aureus* e 3 ECP multirresistentes. A bacteriocina inibiu a multiplicação de 57,1% dos isolados multirresistentes avaliados. A inibição da multiplicação de isolados de ECP multirresistentes obtidas nesse estudo, indica o potencial de utilização da sakacina P como alternativa e/ou como coadjuvante aos compostos sintéticos normalmente utilizados para a conservação de alimentos.

Palavras-chave: Bacteriocina, conservação de alimentos, multirresistência.

Abstract

VIEIRA, Cristiano Tavares. **Evaluation of antimicrobial potential of bacteriocin sakacin P against multi drug-resistant coagulase-positive staphylococci strains.** 2015. 66f. Final Project – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Food can act as vectors in transmission of multidrug-resistant bacteria. Bacteria of the genus *Staphylococcus* spp. are among the most important in food, especially *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus intermedius*, which are coagulase-positive staphylococci (ECP). The widespread use of antimicrobials was soon followed by the emergence of multidrug resistance (MDR). MDR bacteria are often detected in humans and animals from developed and developing countries and constitute a serious concern for human health. Antimicrobial peptides have occupied a prominent position in the polls as an alternative to antibiotics, but their have not yet been adequately explore their full potential. Among the antimicrobial peptides of bacterial origin, there are the bacteriocins. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial potential of sakacin P bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LC254 strain, against multiresistant ECP strains. For this, we used 12 isolates of *S. aureus* from mastitis, already identified phenotypic and genotypic at the species level and characterized as multidrug-resistance and 24 ECPs from salami, characterized only phenotypically. The 24 isolates of ECP were submitted to antimicrobial susceptibility testing. The antimicrobial activity of sakacin P was quantified by the critical dilution method, in the proportion 1:1 in phosphate buffered saline (PBS) using the agar diffusion method. There was resistance to at least one antimicrobial in 44.8% of the 24 isolates ECP while 8.3% were multidrug resistance. Thus, we evaluated 12 *S. aureus* and 3 ECP multigrug resistant strains. The bacteriocin inhibited the multiplication of 57.1% of the evaluated multiresistant strains. The inhibition of proliferation of ECP multiresistant strains obtained in this study indicate the potential use of sakacin P as an alternative and/or as an adjunct to synthetic compounds normally used in food preservation.

Keywords: Bacteriocin, food preservation, multidrug resistance.

Lista de Figuras

- Figura 1 Mecanismo de ação de bacteriocinas representativas.....29
- Figura 2 Atividade da bacteriocina sakacina P frente ao micro-organismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644 em diferentes diluições. A diluição 1:1 (SLC puro) representou a maior atividade e a atividade se manteu até a diluição 1:3239
- Figura 3 Atividade da bacteriocina sakacina P frente ao isolado ECPu de estafilococos em diferentes diluições. A diluição 1:1 representa a atividade da bacteriocina no SLC puro, o qual apresentou a maior atividade. A atividade se manteu até a diluição 1:841

Lista de Tabelas

Tabela 1	Perfil de resistência e identificação molecular de isolados <i>Staphylococcus aureus</i> (Sm) isolados de leite de vacas com mastite	35
Tabela 2	Perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de estafilococos coagulase positiva	37
Tabela 3	Atividade antimicrobiana da sakacina P contra diferentes isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes	40

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Bactéria ácido láctica
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
ECP	Estafilococos coagulase positiva
EMA	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
ESBL	Beta-lactamases de amplo espectro
IA	Intoxicação alimentar
Lan	Lantionina
Man-PTS	Manose fosfotransferase associado ao envelope celular
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MH	Mueller Hinton
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
SLC	Sobrenadante livre de células
SSm	<i>Staphyococcus aureus</i> de mastite
TSA	Triptona de soja
VRE	Enterococos resistentes a vancomicina
IMI	Infecção intramamária

Sumário

1 Introdução	13
2 Objetivo	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 Revisão bibliográfica	16
3.1 Multirresistência	16
3.2 Mecanismos de resistência	18
3.2.1 Prevenção do acesso ao alvo	19
3.2.1.1 Permeabilidade reduzida.....	19
3.2.1.2 Efluxo do antimicrobiano	19
3.2.2 Alteração no alvo do antimicrobiano induzido por mutação	20
3.2.3 Modificação e proteção de alvos	21
3.2.4 Inativação enzimática da droga.....	21
3.2.4.1 Inativação de antimicrobianos por hidrólise.....	22
3.2.4.2 Inativação do antimicrobiano por transferência de um grupo químico	23
3.2.4.3 Inativação de antimicrobiano por processo redox	23
3.2.5 Multirresistência causada por alteração no estado fisiológico	23
3.3 Bacteriocinas.....	24
3.3.1 Potencial terapêutico das bacteriocinas	25
3.3.1.1 Potencial <i>in vitro</i>	25
3.3.1.2 Atividade <i>in vivo</i> contra patógenos.....	26
3.3.1.3 Toxicidade	26
3.3.1.4 Bacteriocinas de estreito e amplo espectro	27
3.3.2 Mecanismos de ação.....	27
3 3.2.1 Mecanismos associados ao envelope celular	28

3.3.2.2 Inibição da expressão gênica e produção proteica	28
3.3.3 Resistência a bacteriocinas.....	29
3.3.4 Sakacinas.....	30
3.4 <i>Staphylococcus</i> spp	31
4 Material e Métodos.....	33
4.1 Isolados bacterianos	33
4.2 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos	33
4.3 Obtenção do sobrenadante livre de células (SLC)	34
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana da sakacina P	36
5 Resultados	37
5.1 Suscetibilidade dos isolados de ECP aos antimicrobianos	37
5.2 Atividade antimicrobiana e espectro de ação da sakacina P.....	38
6 Discussão.....	42
7 Considerações finais	45
Referências	46

1 Introdução

A era do antibiótico começou com a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming. O cirurgião norte americano Willian H. Stewart declarou, em 1967, que as doenças infecciosas haviam sido derrotadas e a antibiotico-terapia não precisava ser mais utilizada, entretanto, a era de ouro dos antibióticos (1944-1972) não durou nem meio século (OVERBYE; BARRETT, 2005; VERHOEF, 2003). Contudo, vivenciamos um aumento da preocupação em saúde pública no mundo inteiro devido ao surgimento de patógenos resistentes aos antimicrobianos (OVERBYE; BARRETT, 2005).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos foi logo seguido pelo surgimento da resistência a múltiplas drogas (MDR), devido a vários fatores, incluindo o uso abusivo e crescente nos ambientes biomédicos e agrícolas. Anualmente, um grande número de pacientes é infectado por esses micro-organismos resistentes a antimicrobianos, tais como os enterococos resistentes à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) e bactérias MDR. Como exemplo, entre 1999 e 2005, o número de hospitalizações associadas a infecções por MRSA, nos hospitais norte-americanos, aumentou em 119% ao ano (KLEIN et al., 2007). Além disso, a partir do início de 2005, o número de mortes no Reino Unido, atribuídas ao MRSA, foi estimado em 3.000 por ano (JOHNSON et al., 2005).

As pesquisas em antimicrobianos permaneceram ativas entre a era de ouro e a introdução da linezolida, em 2000. O desenvolvimento de novos antimicrobianos não representa um investimento atrativo para as grandes indústrias farmacêuticas (KRESSE et al., 2007). Essa é uma das razões pelas quais os maiores avanços na pesquisa por novos antimicrobianos podem ser provenientes/originados de laboratórios acadêmicos e de pequenos e médios laboratórios de biotecnologia (MOELLERING, 2011).

Por décadas os peptídeos antimicrobianos têm ocupado a dianteira na busca de alternativas aos antibióticos, porém, seu uso não conseguiu ser adequadamente explorado. Entre esses, destacam-se as bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos de origem bacteriana, as quais têm significativo potencial para

mudar esse paradigma, devido à ampla variedade de bacteriocinas e bactérias produtoras desses peptídeos existentes (CAVERA, 2015).

Os alimentos podem atuar como vetores na transmissão de bactérias multirresistentes aos seres humanos além de gerar transmissão de genes de resistência entre as bactérias (VERRAES et al., 2013). Bactérias MDR podem representar um perigo para os seres humanos através de alimentos, como carne bovina e avícola, peixes, ovos e produtos lácteos, entre outros, assim como pelo contato direto com animais ou, mais indiretamente, via ambiente (ANGULO et al., 2004). Em alimentos, entre as bactérias MDR de maior importância, se destaca o gênero *Staphylococcus* spp. (SU; WONG, 1997; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Sendo *S. aureus* a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar (IA), representando, em média, 98% dos surtos de IA atribuídos a este gênero (SANTANA et al., 2010).

Durante muito tempo, os estafilococos foram associados ao ambiente hospitalar, no entanto, o acúmulo de evidências sobre a resistência aos antimicrobianos e os mecanismos de transmissão tem feito pesquisadores examinar sua epidemiologia, a partir de uma perspectiva mais ampla (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al., 2014). Nesse sentido, este trabalho objetivou avaliar a ação antimicrobiana da bacteriocina sakacina P, produzida por *Lactobacillus curvatus* LC254, frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes isolados de salaminho e mastite.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana da bacteriocina sakacina P frente isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de estafilococos coagulase positiva provenientes de salaminho;
- Obter um sobrenadante livre de células, contendo a bacteriocina sakacina P, a partir do cultivo do isolado *Lactobacillus curvatus* LC254;
- Determinar o espectro de atividade antimicrobiana da bacteriocina sakacina P frente a isolados de *S. aureus*, provenientes de mastite, e estafilococos coagulase positiva, provenientes de salaminho, com perfil de multirresistência a antimicrobianos.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Multirresistência

A resistência às drogas antimicrobianas é definida como a capacidade adquirida por um organismo de resistir a um agente quimioterápico ao qual este é normalmente sensível (MADIGAN et al., 2004). Este mecanismo tornou-se um grande desafio de nosso tempo, ameaçando a saúde da população mundial. A diminuição na mortalidade e morbidade causadas pelas doenças infecciosas, desde o início da utilização dos antimicrobianos, levou a comunidade médica e científica a uma grande euforia e satisfação. Entretanto, o uso impróprio e abusivo dos antimicrobianos em detrimento às medidas preventivas de infecção levou ao surgimento de bactérias resistentes que, sob a pressão seletiva dos antimicrobianos, se disseminaram por todas as regiões do planeta (KAPIL, 2005).

Foi demonstrado que os genes de resistência às drogas antimicrobianas foram encontrados em micro-organismos em uma das áreas mais remotas do planeta, o Ártico (SJÖLUND et al., 2008). Isolados resistentes, bem como multirresistentes de *Escherichia coli* foram detectados na microbiota normal de aves do Ártico. Esta descoberta destaca a natureza única de adaptação bacteriana e a complexidade da disseminação da resistência aos compostos antimicrobianos (SJÖLUND et al., 2008).

Existem muitas explicações para o surgimento de bactérias multirresistentes na microbiota normal de aves do Ártico (SJÖLUND et al., 2008). Entre as quais, destacam-se: mutação espontânea (MARTINEZ; BAQUERO, 2000), transferência horizontal de outros micro-organismos, como fungos e bactérias, pois constituem fontes naturais de genes de resistência (MAIDEN, 1998) e, ainda, através de outras aves migratórias ou dejetos humanos (WINKER et al., 2007).

O aumento da resistência às drogas no ambiente clínico tem sido uma ameaça constante desde o início da era de ouro dos antibióticos. Por exemplo, cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina foram isoladas já em 1944, apenas dois

anos após a introdução deste antibiótico no mercado (KIRBY, 1944). Uma tendência semelhante foi observada para praticamente todos os antimicrobianos desenvolvidos até hoje, com resistência observada antes ou logo após a primeira utilização clínica e um aumento gradual da proporção de isolados resistentes ao longo do tempo (LEVY; MARSHALL, 2004).

Entretanto, a origem da resistência aos antimicrobianos tem sido questionada. Genes de resistência aos antimicrobianos foram encontrados em sedimentos de 30.000 anos de idade, indicando que a resistência aos antimicrobianos não é apenas antiga, mas também pode se originar a partir do meio ambiente (D’COSTA et al., 2011; WRIGH; POINAR, 2012). Genes de resistência também foram detectados em amostras bacterianas da cavidade oral de restos antigos de humanos (WARINNER et al., 2014) e em bacteriófagos de um coprólito europeu do século 14 (APPELT et al., 2014). Estudos recentes demonstraram, ainda, a presença de genes de resistência a antimicrobianos na microbiota de povoados indígenas isolados da América do Sul (CLEMENTE et al., 2015) e na microbiota intestinal de uma múmia do século 11, originária dos Andes peruanos (SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2015).

A presença de genes de resistência aos antibióticos em amostras antigas, claramente indicam que esses genes são anteriores à introdução dos antibióticos no mercado, entretanto, não indicam, necessariamente, estar associados à pressão seletiva dos mesmos. A exposição aos micro-organismos produtores desses antibióticos é a causa mais provável para a presença desses genes (SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2015).

A mutação, seleção e os mecanismos de troca genética entre os micro-organismos, possibilitam a muitas espécies bacterianas se adaptarem rapidamente à introdução de agentes antibacterianos em seu ambiente. Uma única mutação em um gene chave bacteriano, pode reduzir ligeiramente a susceptibilidade para um agente antibacteriano, porém, isto pode ser o suficiente para permitir a sua sobrevivência inicial até adquirir mutações adicionais ou informação genética adicional, resultando na resistência para este agente. No entanto, em casos raros, uma única mutação pode ser suficiente para conferir nível de resistência clinicamente significativa pelo organismo (TENOVER, 2006).

Os agentes antibacterianos atuam sobre as bactérias alterando processos essenciais, como inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática, inibição da síntese proteica nos ribossomos, alterações na síntese dos ácidos nucleicos e alteração de metabolismos celulares (NEU, 1992). Alguns destes agentes, tais como os que inibem a síntese da parede celular, agem diretamente na morte de células bacterianas e, são denominados bactericidas. Outros, tais como as tetraciclinas, que inibem a síntese de proteínas, são referidos como bacteriostáticos, pois simplesmente impedem a multiplicação bacteriana (COATES et al., 2002).

Alguns agentes antibacterianos só são eficazes contra um espectro estreito de bactérias que exibem atividade apenas contra micro-organismos Gram-positivos, enquanto que outros agentes antibacterianos, tais como os β -lactâmicos, agem em alvos que são comuns entre as espécies e são classificados como agentes antibacterianos de amplo espectro (KOHANSK et al., 2010).

3.2 Mecanismos de resistência

Existem três tipos principais de resistência aos antimicrobianos, a resistência intrínseca, a adquirida, e a adaptativa (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A resistência intrínseca compreende todas as propriedades naturais fornecidas pelas características de um micro-organismo, que limitam a ação de agentes antimicrobianos (COX et al., 2013). A resistência adquirida ocorre quando um micro-organismo originalmente suscetível pode tornar-se resistente por incorporação de material genético novo, como plasmídeos, *transposons*, *integrons* e DNA puro, ou como resultado de mutações (VAN HOEK et al., 2011). Por fim, a resistência adaptativa envolve um aumento temporário da capacidade de uma bactéria em sobreviver a uma injúria devido a alterações nos genes e/ou na expressão das proteínas, como um resultado da exposição a um fator ambiental, por exemplo, o estresse, condições nutricionais adversas e níveis sub-inibitórios dos próprios agentes antimicrobianos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Em contraste aos mecanismos de resistência intrínseca e adquirida, que são estáveis e podem ser

transmitidos verticalmente às gerações subsequentes, a resistência adaptativa tem uma natureza transitória e, geralmente, é revertida com a remoção da condição de indução (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

3.2.1 Prevenção do acesso ao alvo

3.2.1.1 Permeabilidade reduzida

Diferente das espécies Gram-positivas, bactérias Gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antimicrobianos, pois sua membrana externa forma uma barreira, dificultando a permeabilidade (VARGIU; NIKAIDO, 2012; KOJIMA; NIKAIDO, 2013). Antimicrobianos hidrofílicos atravessam a membrana externa por difusão através de proteínas, denominadas porinas. Na maioria das *Enterobacteriaceae*, as porinas principais, tais como as proteínas de membrana externa *OmpF* e *OmpC* de *E. coli*, funcionam como canais não específicos. Evidências anteriores que sugeriram sítios de ligação da droga presentes dentro desses canais agora parecem ser incorretos (KOJIMA; NIKAIDO 2013, TRAN et al., 2013). Portanto, a redução da permeabilidade da membrana externa e a limitação da entrada de antimicrobianos na célula bacteriana são alcançadas pela regulação negativa das porinas ou pela substituição das porinas por canais mais seletivos (BLAIR et al., 2015).

3.2.1.2 Efluxo dos antimicrobianos

Bombas de efluxo bacterianas transportam ativamente diversos antimicrobianos para fora da célula e são as principais contribuintes para a resistência intrínseca de bactérias Gram-negativas (BLAIR et al., 2015). Quando super expressas, as bombas de efluxo também podem conferir elevados níveis de resistência a antimicrobianos, antes clinicamente eficazes. Algumas bombas de efluxo possuem uma especificidade estreita ao substrato, mas muitas transportam

uma ampla gama de substratos estruturalmente diferentes e são conhecidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (BLAIR et al., 2015).

Existem exemplos bem estudados de bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas, porém, novas bombas que exportam antimicrobianos continuam a ser descritas (BLAIR et al., 2015). Nos últimos 2 anos, foram descritas MdeA em *Streptococcus mutans*, FuaABC em *Stenotrophomonas maltophilia*, KexD em *Klebsiella pneumoniae* e LmrS em *S. aureus* (FLOYD et al., 2010; OGAWA et al., 2012; KIM, 2013).

A expressão elevada dos genes de efluxo em bactérias multirresistentes é muitas vezes, devido a uma mutação na região reguladora da expressão das bombas de efluxo (KAATZ et al., 2005). Estas mutações podem estar dentro de um repressor local, de um fator de transcrição global, ou em locais que alterem a expressão de genes das bombas ou seus reguladores (KACZMAREK, 2004; VAN DER STRAATEN et al., 2004; WARNER et al., 2008; WEBBER et al., 2005; WEBBER; PIDDOCK, 2001). O aumento da expressão de bombas de efluxo, também pode ocorrer como resultado de indução em resposta a sinais ambientais e em condições que sua função é necessária (DENG, 2012; MERCANTE, 2012).

3.2.2 Alteração no alvo do antimicrobiano induzido por mutação

A maioria dos antimicrobianos liga-se especificamente aos seus alvos com alta afinidade, prevenindo, assim, a sua atividade normal (LAMBERT, 2005). Alterações na estrutura do alvo que impedem a ligação eficiente aos antimicrobianos, mas que ainda permitem ao alvo realizar sua função normal, podem conferir resistência.

Durante a infecção há, frequentemente, populações grandes do patógeno, portanto, uma única mutação pontual no gene que codifica um alvo antimicrobiano pode conferir resistência ao mesmo e, isolados com esta mutação podem, então, proliferar (BLAIR et al., 2015). Um exemplo de alteração no alvo é a aquisição de um gene homólogo ao gene do alvo original, como em *S. aureus* resistente à meticilina

(MRSA), no qual a resistência à meticilina é conferida por aquisição do cassete cromossômico de estafilococos, *mec* (SCC*mec*) (KATAYAMA; HIRAMATSU, 2000).

Um alelo *mecA* divergente, denominado *mecC*, foi recentemente identificado em isolados provenientes de animais e de seres humanos no Reino Unido, Dinamarca e Irlanda (COLEMAN, 2013; GARCIA-ÁLVAREZ, 2011; SHORE, 2011). O gene *mecC* compartilha 70% de identidade de nucleotídeos com *mecA*. A presença de MRSA *mecC* representa um problema potencial para diagnóstico, uma vez que não é detectado por ensaios convencionais de PCR, levando a falsos positivos na busca do gene *mecA*. Entretanto, esse problema foi resolvido pelo desenvolvimento de novos *primers* específicos para o gene *mecC* (STEGGER, 2012).

3.2.3 Modificação e proteção de alvos

Proteção por modificação do alvo do antimicrobiano pode, também, ser um meio eficaz para aquisição de resistência aos antimicrobianos, e que não exige mutação nos genes que codificam as moléculas alvo (SPRATT, 1994). Nos últimos anos, a proteção de alvos tem sido caracterizada como um mecanismo clinicamente relevante de resistência para vários antimicrobianos importantes, como por exemplo, o gene *erm*, da família dos genes 16S rRNA, que alteram o local de ligação das drogas, evitando assim, a ligação de macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas (KUMAR, 2014).

3.2.4 Inativação enzimática da droga

Bactérias podem evitar que antimicrobianos entrem na célula, bem como podem alterar os alvos das drogas. Além disso, elas podem destruir ou modificar os antimicrobianos e, assim, resistir a sua ação. Entre esses mecanismos, destaca-se a

inativação de antimicrobianos por hidrólise, inativação por transferência de um grupo químico e, ainda, a inativação por processo redox (DŽIDIĆ et al., 2008).

3.2.4.1 Inativação do antimicrobiano por hidrólise

A hidrólise de antimicrobianos catalisada por enzimas é um importante mecanismo de resistência a essas drogas e tem sido relevante desde a primeira utilização dos antibióticos, com a descoberta da penicilinase, uma β -lactamase, em 1940 (ABRAHAM; CHAIN, 1988). Desde então, milhares de enzimas que podem degradar e modificar antimicrobianos de classes diferentes foram identificadas, as quais alteram β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos e fenicóis (BLAIR et al., 2015).

Há, também, subclasses de enzimas que podem degradar antimicrobianos diferentes dentro de uma mesma classe como, os antibióticos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e monobactamas), que são hidrolisados por uma gama diversificada de β -lactamases (LIVERMORE, 2008; NORDMANN et al., 2011; WOODFORD et al., 2011; VOULGARI et al., 2013).

A expansão das classes de antimicrobianos e seus derivados, tem refletido no aparecimento de enzimas hidrolíticas com o espectro de atividade alterado. As primeiras β -lactamases, que eram eficazes contra a primeira geração de β -lactâmicos, foram seguidas por β -lactamases de amplo espectro (ESBLs), que têm atividade contra oximino-cefalosporinas (JOHNSON; WOODFORD, 2013).

A presença de diversos ESBLs e carbapenemases em bactérias Gram-negativas, tais como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, serviu de base para o aparecimento de isolados que são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos. Isso tem sérias implicações no tratamento de infecções graves, particularmente, em pacientes hospitalizados (JOHNSON; WOODFORD, 2013; LYNCH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013).

3.2.4.2 Inativação do antimicrobiano por transferência de um grupo químico

A adição de grupos químicos nos locais vulneráveis da molécula do antimicrobiano por enzimas bacterianas gera resistência aos antimicrobianos (DŽIDIĆ et al., 2008). Vários grupos químicos diferentes podem ser transferidos, incluindo acilo, fosfato, grupos de nucleotídeos e ribitol. As enzimas responsáveis por transferências de um grupo químico formam uma família grande e diversificada de enzimas de resistência aos antimicrobianos (WRIGHT, 2005).

3.2.4.3 Inativação de antimicrobianos por processo redox

A oxidação ou redução de antimicrobianos tem sido raramente explorada por bactérias patogênicas. No entanto, existem alguns exemplos desta estratégia (ANDERSEN et al., 1997; GUENGERICH, 2001; YANG et al., 2004). Uma é a oxidação de antibióticos tetraciclina pela enzima TetX. O micro-organismo *Streptomyces virginiae*, produtor do antibiótico estreptogramina virginiamicina M₁ do tipo A, protege-se do seu próprio antibiótico por redução de um grupo cetona na posição 16 a um álcool, gerando, assim, um composto inativo (DŽIDIĆ et al., 2008).

3.2.5 Multirresistência causada por alteração no estado fisiológico

A sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos é afetada pelo seu estado fisiológico. Uma consequência importante desse fenômeno é a ocorrência de células *persister* (NIKAIDO, 2009). Assim, descobriu-se que, mesmo no início, altas concentrações de antimicrobianos não inativam toda a população bacteriana, sobrevivendo uma população persistente que é geneticamente idêntica às células sensíveis (LEWIS, 2005). Quando se observou que bactérias organizadas em

biofilmes são mais resistentes à maioria dos antimicrobianos, houve tentativas iniciais para interpretar este aumento na resistência com base em uma difusão mais limitada de drogas através da estrutura do biofilme (NIKAIDO, 2009).

Segundo LEWIS (2005), esse aumento na resistência é resultado da presença de um grande número de células persistentes na população do biofilme. A presença de células persistentes é agora considerada um exemplo de estratégia, segundo a qual, as bactérias geram naturalmente misturas fenotipicamente diferentes de populações, para que, assim, uma delas tenha vantagem para alterações ambientais (DHA; MCKINNEY, 2007).

3.3 Bacteriocinas

As bacteriocinas compreendem uma grande família de peptídeos, sintetizados nos ribossomos das bactérias, que possuem atividade antibacteriana contra espécies correlacionadas ou distintas (CLEVELAND et al., 2001; KEMPERMAN et al., 2003; DE VUYST; LEROY, 2007). Na última década, o interesse pela investigação das bacteriocinas, especialmente as produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL), ganhou um grande impulso devido ao seu potencial de utilização, tanto como conservante de alimentos, quanto como antibióticos terapêuticos (CLEVELAND et al., 2001; CHEN; HOOVER, 2002; COTTER et al., 2013; VAN et al., 2011). Bacteriocinas produzidas por BAL são, em sua grande maioria, termoestáveis e estáveis à uma grande faixa de pH. Esses peptídeos antimicrobianos são também incolores, inodoros e insípidos, o que aumenta ainda mais a seu potencial comercial (PEREZ, 2015).

DEEGAN et al. (2006), consideram difícil a classificação das bacteriocinas. Dada sua natureza heterogênea, a classificação passa por constante atualização, conforme a estrutura e modo de ação das bacteriocinas. Diversas classificações foram propostas para as bacteriocinas, sendo a mais recente proposta por HENG et al. (2007), resultante de uma adaptação da classificação de COTTER et al. (2005). Os autores agrupam as bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas em quatro classes, de acordo com a sua estrutura química e função biológica: **classe I:**

peptídeos lantibióticos (que possuem o aminoácido lantionina (Lan) em sua estrutura), e são subdivididos em três grupos: Ia - bacteriocinas com estrutura linear, Ib - bacteriocinas com estrutura globular, Ic - bacteriocinas formadas por mais de um componente; **classe II**: peptídeos não modificados (não -lantibióticos e não cíclicos), de peso molecular inferior a 10 kDa, também subdivididos em três grupos: IIa - bacteriocinas ativas contra *L. monocytogenes*, IIb - bacteriocinas multi-componentes, que precisam de dois ou mais peptídeos para ser ativas, IIc - bacteriocinas variadas, de baixo peso molecular e que não se enquadram em IIa e IIb; **classe III**: peptídeos de peso molecular superior a 10 kDa, subdivididos em dois grupos: IIIa - peptídeos que agem causando lise celular, IIIb - bacteriocinas de alto peso molecular que matam as células alvo por outros meios que não a lise celular; e a classe **IV**: proteínas cíclicas.

3.3.1 Potencial terapêutico das bacteriocinas

Bacteriocinas possuem muitas propriedades que as colocam como possíveis alternativas viáveis aos antimicrobianos. Estas incluem baixa toxicidade em humanos e animais e atividade em estreito e amplo espectro, determinadas tanto *in vitro* como *in vivo* (COTTER et al., 2012).

3.3.1.1 Potencial *in vitro*.

O potencial de utilização das bacteriocinas contra patógenos de importância clínica varia tanto entre as classes como entre as várias subclasses. Em geral, as bacteriocinas da classe I, incluindo lantibióticos, são mais ativas contra patógenos Gram-positivos (COTTER et al., 2012). Lantibióticos apresentam notável atividade *in vitro* contra patógenos de importância clínica, tais como *S. pneumoniae*, os estafilococos (incluindo *S. aureus* resistentes à meticilina), enterococos resistentes à vancomicina (VRE), várias micobactérias, *Propionibacterium acnes* e *Clostridium difficile* (PIPER et al., 2009).

Há, também, muitos exemplos de bacteriocinas não modificadas da classe II com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Isto inclui algumas bacteriocinas da classe IIa, que são ativas contra *L. monocytogenes* (EIJSSINK et al., 1998) e outros patógenos Gram-positivos (DRIDER et al., 2006). Peptídeos de classe IIc, tais como bacteriocina AS-48 (enterocina), de enterococos, foram investigadas principalmente com o objetivo de utilização não-clínica, no entanto, possuem atividade antimicrobiana, o que sugere a necessidade de estudar outras aplicações (SÁNCHEZ-HIDALGO et al., 2011).

3.3.1.2 Atividade *in vivo* contra patógenos

Embora estudos *in vitro* tenham destacado o valor potencial das bacteriocinas como alternativas aos antimicrobianos, é crucial avaliar essa atividade em circunstâncias clinicamente mais relevantes. Dentre as diferentes categorias de bacteriocinas descritas, os lantibióticos e tiopeptídeos (classe I) foram mais amplamente investigados nesse sentido. Por exemplo, demonstrou-se que lantibióticos controlaram a multiplicação de estafilococos e/ou enterococos em tubos de cateter (FONTANA et al., 2006). Além disso, a nisina (pertencente à classe dos lantibióticos), demonstrou atividade contra *S. pneumoniae* sendo 8 a 16 vezes mais eficiente que a vancomicina em um regime de administração intravenosa em ratos (GOLDSTEIN et al., 1998).

3.3.1.3 Toxicidade

Outro benefício de muitas bacteriocinas é a sua baixa toxicidade via oral para o hospedeiro. De fato, muitas bacteriocinas, particularmente as produzidas por BAL, têm sido consumidas em alimentos fermentados por milênios (COTTER et al., 2012). Em virtude da sua utilização em larga escala como conservante em alimentos, a nisina tem recebido atenção especial a este respeito. A ausência de toxicidade da nisina, e de outros lantibióticos, tem sido demonstrada em alguns estudos (MAHER;

MCCLEAN, 2006; CASTIGLIONE et al., 2007). Deve-se ressaltar que a citolisina (um lantibiótico), associada a *Enterococcus* spp., exibe atividade citotóxica, mas é o único lantibiótico, até agora, que foi demonstrado possuir citotoxicidade (COX et al., 2005).

3.3.1.4 Bacteriocinas de estreito e amplo espectro

Existem muitas bacteriocinas que apresentam atividade antimicrobiana de amplo espectro (REA et al., 2010). Tal como acontece com antimicrobianos de amplo espectro, esta é uma característica atraente, uma vez que nos permite direcionar o tratamento para infecções de etiologia desconhecida. No entanto, os antimicrobianos de amplo espectro são conhecidos por danificar a microbiota comensal humana, por isso, existe valorização no uso de antimicrobianos de espectro estreito em circunstâncias específicas (COTTER et al., 2012). Por exemplo, a atividade da bacteriocina subtilosina A (lantibiótico) contra o patógeno vaginal *Gardnerella vaginalis* e a falta de atividade contra isolados *Lactobacillus* spp., sugerem futuras investigações afim de testar a capacidade deste peptídeo para o tratamento de vaginose (SUTYAK et al., 2008).

3.3.2 Mecanismos de ação

As bacteriocinas apresentam vários mecanismos de ação, distintos dos antibióticos. Estes mecanismos podem ser genericamente divididos entre os que apresentam atividade principalmente no envelope celular, os que são ativos dentro da célula, afetando a expressão de genes e a produção de proteínas (COTTER et al., 2012) (Figura 1).

3.3.2.1 Mecanismos associados ao envelope celular

A nisina e vários lantibióticos, além de algumas bacteriocinas da classe II, agem nos lipídios II (BIERBAUM; SAH, 2009; MARTIN; BREUKINK, 2007). Lipídio II é um intermediário chave na maquinaria da biossíntese dos peptidoglicanos dentro do envelope celular bacteriano e é, também, o alvo do antibiótico vancomicina. A nisina e outras bacteriocinas ligam-se ao lipídio II em local distinto da vancomicina e, assim, mantém atividade contra patógenos Gram-positivos resistentes à vancomicina (PIPER et al., 2009). Outras bacteriocinas também danificam ou matam células alvo através da formação de poros na membrana celular. Por exemplo, peptídeos classe IIa e outras bacteriocinas da classe II ligam-se ao sistema manose fosfotransferase associado ao envelope celular (Man-PTS), que levará a formação de poros (DIEP et al., 2007).

3.3.2.2 Inibição da expressão gênica e produção proteica

As bacteriocinas podem inibir as suas células alvo por interferência no metabolismo de DNA, RNA e proteínas. Por exemplo, a microcina B17 (MccB17) passa pela da membrana exterior através da porina OmpF e é transferida através da membrana interna de forma dependente de SbmA (um peptídeo transportador da membrana interna). A bacteriocina, então, age inibindo o superenrolamento do DNA mediada por DNA-girase, interferindo, assim, a replicação do DNA (PARKS et al., 2007).

A bacteriocina MccJ25 é reconhecida pelo receptor de ferro, sideróforo FhuA, na membrana externa, e utiliza TonB e SbmA, na membrana interna, para entrar na célula. Após entrar, MccJ25 inibe a transcrição através do bloqueio RNA polimerase (VINCENT; MORERO, 2009). No caso da MccC7-C51, a passagem através da camada interior da parede celular de *E. coli* ocorre via o transportador YejABEF (NOVIKOVA et al., 2007). Após o processamento da bacteriocina por uma das muitas aminopeptidases citoplasmáticas bacteriana (KAZAKOV et al., 2008), é

gerado uma aspartil-ciclase modificada, a qual, por sua vez, inibe a aspartil-tRNA sintetase, bloqueando, assim, a síntese de mRNA (COLLINS et al., 2010).

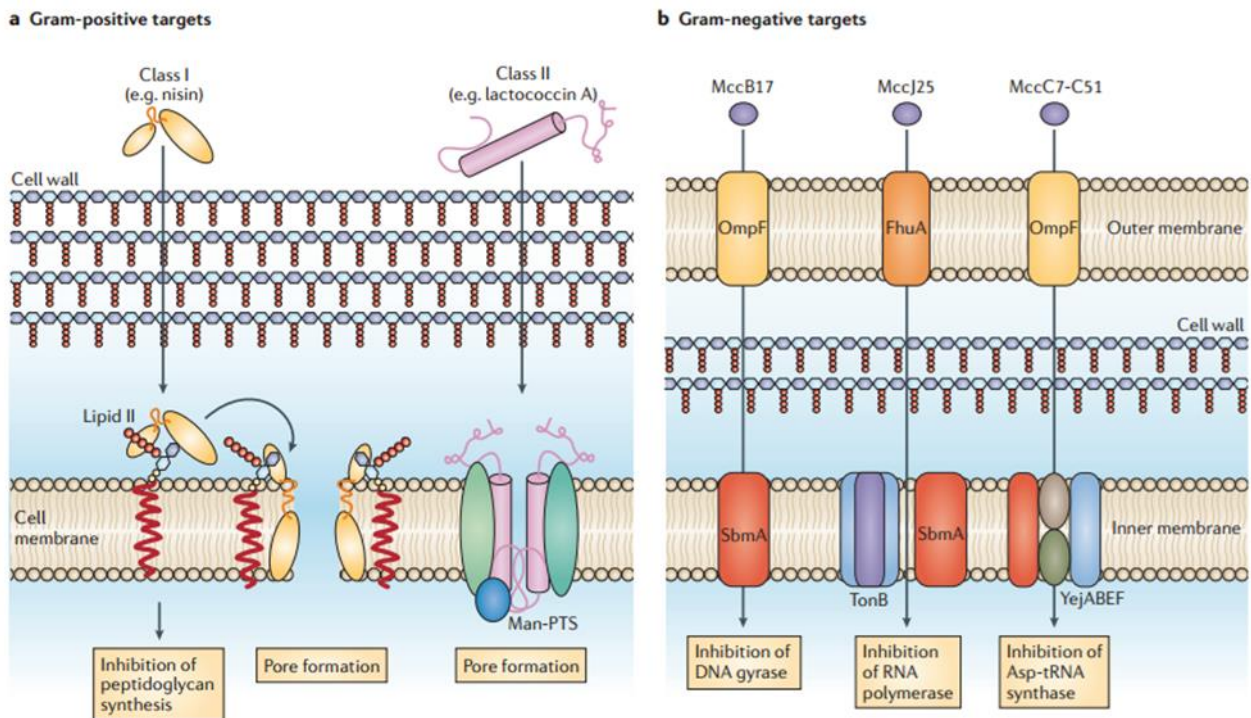


Figura 1: Mecanismo de ação de bacteriocinas representativas. a) Algumas bacteriocinas, em particular, as que inibem as bactérias Gram-positivas, agem na função do envelope celular. Algumas bacteriocinas da classe I inibem lípido II na membrana celular, impedindo, assim, a síntese do peptidoglicano. Bacteriocinas classe II, tais como lactococcina A, ligam ao receptor formador de poros do sistema manose fosfotransferase associado ao envelope celular (Man-PTS). b) Muitas bacteriocinas que inibem bactérias Gram-negativas controlam as suas bactérias alvo por interferência no DNA, RNA e metabolismo de proteínas. Por exemplo, microcina B17 (MccB17) inibe a DNA-girase, MccJ25 inibe a RNA-polimerase, e MccC7-C51 inibe aspartil-tRNA sintetase. (Adaptado de COTTER, et al. 2012)

3.3.3 Resistência a bacteriocinas

Bacteriocinas não têm sido utilizadas em ambiente clínico, por isso a compreensão sobre estes antimicrobianos foi obtida principalmente por meio de pesquisas em laboratórios. Possíveis mecanismos de resistência foram identificados para as bacteriocinas, principalmente, com ação no envelope celular (COTTER et al., 2013). Por exemplo, estudos indicam que resistência aos lantibióticos que agem

no lipídeo II podem surgir como uma consequência da redução da acessibilidade ao receptor (como é o caso em *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina) (PIPER et al., 2009) ou outras variações na composição do envelope celular (COLLINS et al., 2010; KRAMER et al., 2006; SOUDY et al., 2012).

Pesquisas mostraram que a resistência às bacteriocinas, que têm alvos intracelulares, pode ocorrer através de mutações nos genes que codificam os alvos das bacteriocinas (COTTER et al., 2013). Células bacterianas tornaram-se resistentes a MccJ25 devido a certas mutações nos genes das subunidades de RNA polimerase (que altera o canal secundário da polimerase) (YUZENKOVA et al., 2002). Para MccB17, como uma consequência de mutações pontuais no gene que codifica a DNA-girase (DEL CASTILLO et al., 2001) e, para tiopeptídeos com alvo ribossomal devido a mutações nos genes que codificam a proteína ribossômica L11 ou GTPase associada a região ribossomal bacteriana (BAUMANN et al., 2010).

Em alguns casos, a resistência a uma bacteriocina surge de forma suficientemente baixa, o que permite a comercialização do peptídeo na sua forma natural. Em outros casos, o conhecimento dos mecanismos de resistência potenciais poderia ser crucial para minimizar o aparecimento de resistência quando iniciarem as aplicações clínicas (COTTER et al., 2013).

3.3.4 Sakacinas

Sakacinas são bacteriocinas produzidas por linhagens de *Lactobacillus* spp. que mostram atividade inibitória contra *L. monocytogenes*, um patógeno de origem alimentar comumente isolado de leite e produtos lácteos, carnes e produtos cárneos, e legumes (VARABIOFF, 1992). Vários tipos de sakacinas foram identificadas e caracterizadas: sakacina A (HOLCK et al., 1992; LARSEN et al., 1993), sakacina H (SOBRINO et al., 1992), sakacina P (TICHACZEK et al., 1994), sakacina K (HUGAS et al., 1993), sakacina T (AYMERICH et al., 2000), sakacina L (SIMON et al., 2002), e a sakacina X (VAUGHAN et al., 2004). Além disso, sakacina Q, uma bacteriocina que parece ser estreitamente relacionada com a sakacina P, foi purificada e caracterizada (MATHIESEN et al., 2005). Entre estas bacteriocinas, a molécula que

tem sido mais intensivamente investigada é a sakacina P (COCOLIN; RANTSIOU, 2007).

Sakacina P é uma bacteriocina da classe IIa produzida por cepas de *Lactobacillus sakei* Lb674 e LTH673, que contêm grupamentos de genes *spp* idênticos (HOLCK et al., 1994; TICHACZEK et al., 1994). HUEHNE et al. (1996) demonstraram que a produção de sakacina P requer três grupos de genes e todos são precedidos por promotores induzíveis típicos. Além de *L. sakei*, a sakacina P também é produzida por *L. curvatus*. CASABURI et al. (2016) avaliaram a presença de genes das bacteriocinas curvacina A, sakacina T, X e P em *L. curvatus* 54M16 por PCR, e identificaram a presença de 3 genes de bacteriocinas: sakacina T, X e P. A presença do gene da sakacina P também foi descrita nos isolados *L. curvatus* MBSa2 e MBSa3 (BARBOSA et al., 2015).

3.4 *Staphylococcus spp.*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Staphylococcaceae*, são cocos, e tendem a formar grupamentos semelhantes a cachos de uva. São Gram-positivos, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μm , anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos (QUINN, 2005). São encontradas naturalmente na pele e nas mucosas dos animais de sangue quente e de humanos, e são, também, frequentemente isolados de uma grande variedade de alimentos, além de fontes como solo, areia e água (HEIKENS et al., 2005).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por 49 espécies e 26 subespécies (EUZÉBY, 2015), sendo a maioria coagulase negativa, ou seja, não apresentam a capacidade de produzir a enzima coagulase. A atividade da enzima coagulase é considerada um fator de virulência, pois a enzima age sobre o fibrinogênio formando um coágulo que se acumula ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada, o que dificulta o acesso das células do sistema imune do hospedeiro às bactérias (MADIGAN et al., 2004). Apenas *S. aureus*, *S. schleiferi* subsps. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* sintetizam essa enzima e são denominados estafilococos coagulase positiva (ECP) (BANNERMAN, 2003).

Os estafilococos são, frequentemente associados a casos de intoxicação alimentar em todo o mundo, devido à capacidade de algumas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (SANTANA et al., 2010). Os principais alimentos envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica são o leite, produtos de confeitaria, derivados lácteos como queijo, carne cozida, frango, presunto, atum e outros derivados cárneos, batata e saladas de batata, sendo que muitos desses itens são contaminados durante o preparo em casa ou em restaurantes, e armazenados em condições de abuso de temperatura (JAY, 2005; LANCETTE; TATINI, 2001).

Além de causar intoxicação alimentar, *S. aureus* é considerado um importante patógeno humano (KLUITMANS; WERTHEIM, 2005). É um micro-organismo versátil, responsável por muitas doenças, incluindo septicemia, endocardite, pneumonia, osteomielite, artrite séptica, bacteremia, infecções da pele, do sistema nervoso central, do trato urinário e infecções associadas com dispositivos intravasculares e corpos estranhos (FEIL et al., 2003; FEY et al., 2003; GORDON; LOWY, 2008).

Desde a introdução de antimicrobianos na prática da medicina moderna, membros do gênero *Staphylococcus* evoluíram em resposta a essa pressão (MORRIS et al., 2006). No final da década de sessenta a resistência de cepas hospitalares já chegava a 90% (LOWY, 2003; MIMICA; MENDES, 2007). Na mesma época na Europa, as taxas de resistência já estavam também muito altas, chegando a 90% nos hospitais e 70% na comunidade (MIMICA; MENDES, 2007). A multirresistência tem emergido e, recentemente, WANG et al., (2014) encontraram 69% dos isolados provenientes de mastite bovina resistentes a mais de 10 antimicrobianos utilizados no tratamento da doença.

4 Material e Métodos

4.1 Isolados bacterianos

Foram utilizados 12 isolados de *S. aureus*, provenientes de leite de vacas com mastite (Sm), 24 estafilococos coagulase positiva (ECP), provenientes de salaminho, e o isolado *L. curvatus* LC254, produtor da bacteriocina sakacina P. Todos os isolados são pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (DCTA-FAEM-UFPel).

Os 12 isolados de Sm foram previamente caracterizados quanto a sensibilidade a antimicrobianos, bem como foi realizada a identificação molecular em nível de espécie e a identificação de genes de resistência, através de PCR (Tabela 1). Já os 24 isolados de ECP provenientes de salaminho foram apenas caracterizados fenotipicamente em ágar Baird-Parker (Sigma Aldrich®) e identificados como produtores de catalase (Probac, São Paulo) e coagulase (Probac, São Paulo).

4.2 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

Os 24 isolados de ECP foram avaliados quanto a suscetibilidade a antimicrobianos pelo teste de difusão em ágar Mueller-Hinton (MH, Oxoid®), realizado de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Após o cultivo em ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia®) a 37 °C por 24h, os isolados foram repicados para solução salina 0,85% até atingir turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Em seguida, com o auxílio de *swab*, a cultura foi semeada em ágar MH e foram adicionados os discos impregnados com antimicrobianos. Foram testados 18 agentes antimicrobianos: ampicilina 10 µg

(AMP), cefalotina 30 µg (CFL), cefotaxima 30 µg (CTX), ciprofloxacina 5 µg (CIP), clindamicina 2 µg (CLI), cloranfenicol 30 µg (CLO), eritromicina 15 µg (ERI), gentamicina 10 µg (GEN), oxacilina 1 µg (OXA), imipinem 10 µg (IPM), penicilina G 10U (PEN), rifampicina 5 µg (RIF), sulfazotrim 25 µg (SUT), sulfonamida 300 µg (SUL), teicoplanina 15 µg (TEC), tetraciclina 30 µg (TET), tobramicina 10 µg (TOB) e trimetoprima 5 µg (TRI), adquiridos da empresa Laborclin®. Após, as placas de petri foram incubadas a 37 °C por 24h, e, após esse período, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos, expressos em milímetros e as medidas foram avaliadas de acordo com as normas do CLSI com os critérios estabelecidos para *Staphylococcus* spp.. Foram considerados multirresistentes aqueles isolados que apresentaram resistência para três ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.3 Obtenção do sobrenadante livre de células (SLC)

O isolado *L. curvatus* LC254, produtor da bacteriocina sakacina P, foi previamente caracterizado por SEHN (2015). A técnica de PCR foi realizada para presença de sete genes codificadores de bacteriocinas, entretanto, apenas um fragmento de 186 pb foi identificado e confirmado por sequenciamento, o qual corresponde a bacteriocina sakacina P (SEHN, 2015). Assim, o SLC, o qual, possivelmente, contém a bacteriocina, foi obtido a partir do cultivo do isolado *L. curvatus* LC254 em 50 mL de caldo *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) (Acumedia®), utilizando-se 1 % (v/v) da cultura estoque, seguido de incubação a 37 °C por 24h. O cultivo foi centrifugado a 6.800 x *g* a 4 °C, por 20min, e em seguida, o sobrenadante foi neutralizado (pH 6,0), utilizando-se solução de NaOH 1 N (Synth®) e esterilizado por membrana (0,22 µm) (TODOROV; DICKS, 2004).

Tabela 1: Perfil de resistência e identificação molecular de isolados *Staphylococcus aureus* (Sm) isolados de leite de vacas com mastite

Isolado	Origem	Confirmação por PCR	Fenótipo de resistência	Genótipo de resistência
Sm1	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	TOB, CLI, SUL, TET	<i>ermB</i>
Sm2	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	AMP, TOB, TET	<i>teK, tetL, bla_{CTX-M}</i>
Sm10	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, ERI, CLI, SUT, TET	<i>tetM, Tn916-1545, ermC, blaZ, dfrG</i>
Sm17	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, SUL, TET	<i>blaZ</i>
Sm21	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, OXA, CFO, CFL, TEC, ERI, CLI	<i>ereB</i>
Smc2	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	TEC, SUL, TET	<i>tetK, tetL</i>
Sm45	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, OXA, CFO, TOB, CLI	<i>blaZ</i>
Sm93	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, TOB, CLI	<i>blaZ</i>
Sm07	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, OXA, CFO, CFL, TOB, TEI, ERI, CLI, TET	<i>tetL, tetM, Tn916-1545</i>
Sm152	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, OXA, CFO, CFL, TEC, ERI, CLI	<i>strA, strB</i>
Sm218	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, OXA, CFO, CFL, TOB, TEC, ERI, CLI, TET	<i>tetM, Tn916-1545, ermB</i>
Sm219	Leite mastítico	<i>nuc1, nuc2</i>	PEN, AMP, OXA, TOB, TEC, ERI, CLI, TET	<i>tetM, Tn916-1545, ermB</i>

4.4 Determinação da atividade antimicrobiana da sakacina P

A atividade antimicrobiana da sakacina P, possivelmente presente no SLC, foi quantificada pelo método de diluição crítica (MAYR-HARTING; HEDGES; BERKELEY, 1972), na proporção 1:1 em tampão fosfato salino (PBS). A determinação foi realizada utilizando-se o método de difusão em ágar, conforme descrito por BISCOLA et al. (2013). Foram adicionados 5 µL do sobrenadante bruto e diluído sobre ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia[®]) previamente inoculado com *L. monocytogenes* ATCC 7644 (micro-organismo indicador) e isolados de estafilococos, na concentração de 10⁵ UFC.mL⁻¹. As placas de petri foram incubadas a 37 °C por 18h. Após esse período, avaliou-se a formação de halos de inibição. A atividade antimicrobiana foi expressa em unidades arbitrárias por mL (UA.mL⁻¹), calculada conforme fórmula abaixo, onde 1 UA.mL⁻¹ é definida como a maior diluição capaz de produzir halos de inibição ≥ 2 mm de diâmetro (IVANOVA et al., 1998).

$$\text{UA.mL}^{-1} = \frac{1000 \times D}{V}$$

Onde: D = fator de diluição (maior diluição que produziu halo de inibição); V = volume do SLC (µL).

5 Resultados

5.1 Suscetibilidade dos isolados de ECP aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de ECP estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Perfil de resistência aos agentes antimicrobianos de isolados de estafilococos coagulase positiva

Isolados	Origem	Fenótipo de resistência
ECPa	Salaminho	TET
ECPd	Salaminho	
ECPe	Salaminho	
ECPf	Salaminho	PEN, AMP, SUT
ECPg	Salaminho	SUL, TRI, SUT
ECP h	Salaminho	PEN, CLI, SUL, TRI, SUT
ECPi	Salaminho	
ECPj	Salaminho	SUL, SUT
ECPm	Salaminho	AMP
ECPo	Salaminho	TOB, SUL, TRI, SUT
ECPp	Salaminho	
ECPq	Salaminho	
ECPs	Salaminho	ERI
ECPt	Salaminho	
ECPu	Salaminho	PEN, AMP, OXA, CTX, CLI, SUL, TRI, SUT
ECPx	Salaminho	
ECPz	Salaminho	
ECPz1	Salaminho	PEN, AMP
ECPz2	Salaminho	SUL
ECPz3	Salaminho	SUL, SUT
ECPz4	Salaminho	
ECPz5	Salaminho	SUL, TRI, SUT
ECPz8	Salaminho	SUL, TRI, SUT
ECPz10	Salaminho	SUL, TRI, SUT

Todos os isolados foram sensíveis à ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, imipinem, rifampicina e teicoplanina. Foi observada resistência para ampicilina (16,7%), cefotaxima (4,1%), clindamicina (8,4%), eritromicina (4,1%), oxacilina (4,1%), penicilina (16,7%), sulfazotrim (41,6%), sulfonamida (41,6%), tetraciclina (4,1%), tobramicina (4,1%) e trimetoprima (29,1%). A resistência intermediária foi observada apenas para cefalotina (4,1%). Mais da metade dos isolados (62,5%) apresentaram resistência a, pelo menos, um agente antimicrobiano, sendo que, 8,3% apresentaram multirresistência (resistência a três ou mais classes). Dois isolados identificados como ECP_h e ECP_u, provenientes de salaminho, foram resistentes a três (β -lactâmicos, lincosaminas e sulfonamidas) e quatro classes de antimicrobianos (β -lactâmicos, cefalosporinas, lincosaminas e sulfonamidas), respectivamente, sendo considerados isolados multirresistentes.

5.2 Atividade antimicrobiana e espectro de ação da sakacina P

A atividade antimicrobiana da sakacina P, presente no SLC, frente *L. monocytogenes* ATCC 7644, micro-organismo indicador selecionado como controle para os testes realizados (SEHN, 2015) está representada na figura 2. A bacteriocina apresentou sua maior atividade na diluição 1:1 (SLC puro) e manteve atividade até a diluição 1:32. O espectro de ação contra os isolados de ECP multirresistentes, estão apresentados na tabela 3. A atividade antimicrobiana da sakacina P também foi avaliada com dois isolados de ECP sensíveis aos antimicrobianos (isolados Sm5 e ECP_p).



Figura 2. Atividade da bacteriocina sakacina P frente ao micro-organismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644 em diferentes diluições. A diluição 1:1 (SLC puro) representou a maior atividade e a atividade se manteve até a diluição 1:32.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana da sakacina P contra diferentes isolados de estafilococos coagulase positiva multirresistentes

Micro-organismo	Atividade antimicrobiana (UA.mL ⁻¹)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	6.400
Sm1	-
Sm2	-
Sm10	-
Sm17	-
Sm21	-
Smc2	-
Sm45	200
Sm93	200
Sm107	400
Sm152	200
Sm218	800
Sm219	200
ECP _h	800
ECP _u	1.600
ECP _p	-
Sm5	-

-: ausência de atividade antimicrobiana

A bacteriocina inibiu a multiplicação de 57,1% dos isolados de ECP multirresistentes, apresentando sua maior atividade (1.600 UA.mL⁻¹) contra o isolado ECP_u (Figura 3), na diluição 1:1 (SLC puro), e manteve atividade até a diluição 1:8. Entretanto, os isolados sensíveis a antimicrobianos não apresentaram inibição na sua multiplicação pela ação da bacteriocina (isolados Sm5 e ECP_p).

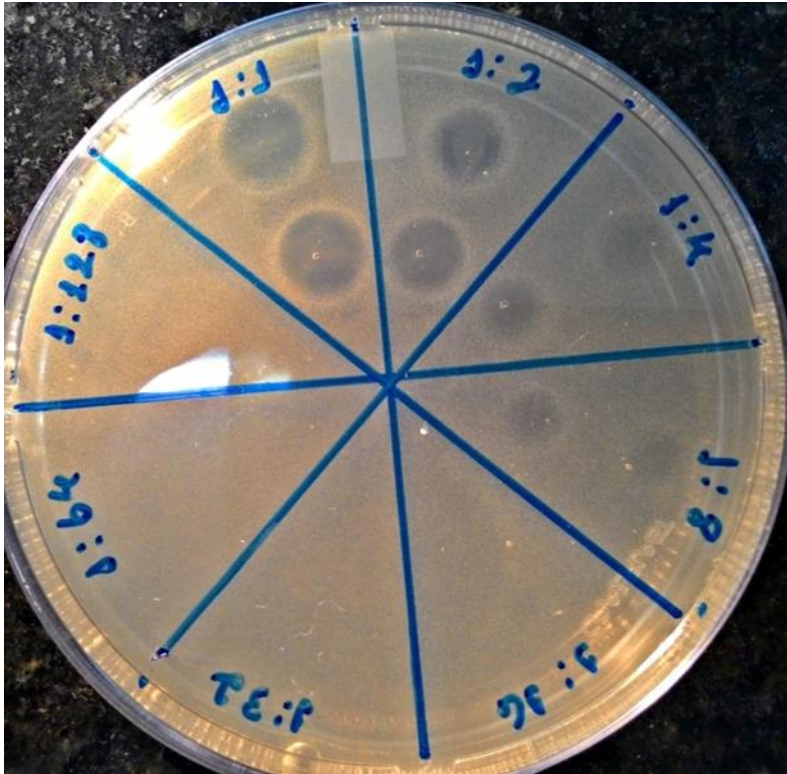


Figura 3. Atividade da bacteriocina sakacina P frente ao isolado ECPu de estafilococos em diferentes diluições. A diluição 1:1 representa a atividade da bacteriocina no SLC puro, o qual apresentou a maior atividade. A atividade se manteve até a diluição 1:8.

6 Discussão

De 1960 a 1980, uma gama de novos antimicrobianos foi introduzida para combater o aumento de resistência a esses compostos em diferentes gêneros bacterianos. Entretanto, estafilococos, assim como outras bactérias, demonstraram a sua capacidade de se adaptar e desenvolver mecanismos de resistência a antimicrobianos (MALIK et al., 2005). Diversos genes de resistência têm sido descritos, como os genes *tet*, envolvidos na resistência às tetraciclinas (MALIK et al., 2005), e os genes *erm* que codificam resistência aos macrolídeos (WERCKENTHIN et al. 2001).

Além disso, outros mecanismos de resistência foram descritos em estafilococos, como a resistência aos aminoglicosídeos, onde ocorre produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) (BOERLIN et al., 2001). E, ainda, superprodução do ácido para-aminobenzóico, que está associado a uma mutação cromossomal, e é um dos mecanismos moleculares pelos quais essas bactérias adquirem resistência às sulfonamidas (MALIK et al., 2005).

No presente estudo, 12 isolados multirresistentes de *S. aureus* originários de mastite bovina foram avaliados. Embora uma variedade de agentes microbianos esteja envolvida com a etiologia da mastite bovina, *S. aureus* é o agente infeccioso mais prevalente em infecções intramamárias (IMI), sendo relacionado em mais de 80% dos casos (PELLEGRINO et al., 2011). A alta prevalência de *S. aureus* se deve a habilidade desse patógeno em invadir e se estabelecer profundamente nos tecidos da glândula mamária. A terapia antimicrobiana é um componente importante de programas de controle e prevenção das mastites e a capacidade desse patógeno de desenvolver resistência aos antimicrobianos também contribui para a alta prevalência de multirresistência dessa espécie bacteriana (ZAFALON et al., 2008).

Também foram avaliados 24 ECP, isolados de salaminho. Os resultados do teste de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos mostraram que 62,5% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano enquanto 8,3% apresentaram multirresistência, sendo os isolados ECPu (PEN, AMP, CTX, CFL, SUL, TRI, SUT) e ECP_h (PEN, CLI, SUL, TRI, SUT). Resultados semelhantes

foram obtidos por CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al. (2014), onde 113 *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos prontos para consumo, foram avaliados quanto a suscetibilidade a antimicrobianos, e 54,9% foram resistentes a, pelo menos, uma classe de antimicrobiano, dos quais, 35,4% foram classificados como multirresistentes. Kuchenbecker et al. (2009) analisaram o perfil de resistência de 245 *S. aureus* isolados de 3.748 amostras de alimentos de origem animal, provenientes da Região Sul, Sudeste, Norte e Nordeste do Brasil, e verificaram que a maioria dos isolados (64,1%) apresentou resistência a, pelo menos, um dos antimicrobianos testados.

As bacteriocinas, por sua vez, representam uma alternativa de controle biológico de bactérias resistentes por não compartilharem mecanismos de ação com os antimicrobianos comercialmente disponíveis. Isso porque sua atividade inibitória sobre a multiplicação bacteriana não sofre os efeitos da expressão dos mecanismos de resistência já descritos (PRIBUL et al., 2011). As bacteriocinas pertencentes à subclasse IIa, na qual se enquadra a sakacina P, geralmente apresentam entre 37 e 48 aminoácidos e uma sequência N-terminal conservada Tyr-Gly-Asn-Gly-Val/Leu presente no peptídeo sinal (NISSEN-MEYER et al., 2009). Esses peptídeos agem aumentando a permeabilidade da membrana das células sensíveis. O seu terminal amino se liga a membrana das células-alvo através de interações eletrostáticas e, em seguida, o terminal carboxi, mais hidrofóbico, penetra na bicamada lipídica. Conseqüentemente, ocorre o efluxo de pequenas moléculas, como ATP, e a dissipação do potencial de membrana, resultando na morte celular (NISSEN-MEYER et al., 2009).

No presente trabalho, sugere-se a presença da bacteriocina sakacina P no SLC proveniente do isolado *L. curvatus*, o qual possui o gene para mesma. Dessa forma, a sakacina P apresentou atividade antimicrobiana contra 8 (57,1%) isolados multirresistentes avaliados, enquanto dois isolados sensíveis aos antimicrobianos não foram inibidos pela bacteriocina. A atividade da sakacina P contra os microorganismos patogênicos multirresistentes isolados de alimentos, avaliados nesse trabalho, reforça o potencial de utilização das bacteriocinas como conservantes em alimentos, como forma de prevenir as doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Existem diferentes abordagens pelas quais as bacteriocinas podem ser utilizadas na indústria alimentar. O uso como um conservante de alimentos na sua forma purificada é a abordagem mais estudada, a inoculação direta de BAL produtoras de bacteriocina na indústria alimentícia também é eficaz e, ainda, é a mais utilizada (PEREZ et al., 2014). *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772, produtora da bacteriocina pediocina PA-1/AcH, quando utilizada como cultura iniciadora para *Nham*, uma salsicha de porco fermentada tradicional tailandesa, controla eficazmente o crescimento de *L. monocytogenes*, sem comprometer a qualidade do produto (KINGCHA et al., 2012). Além disso, a incorporação das bacteriocinas na embalagem de alimentos ou em superfícies também tem sido explorada (GALVEZ et al., 2007).

Além da utilização em alimentos, as bacteriocinas têm sido avaliadas *in vitro* para aplicações clínicas. NASCIMENTO et al. (2006) demonstraram que o lantibiótico Pep5 inibiu 77,2% de 57 isolados de estafilococos coagulase negativa envolvidos em infecções clínicas, muito dos quais foram multirresistentes aos antibióticos. FONTANA et al. (2006) estudaram a capacidade da Pep5 em inibir a adesão de seis *Staphylococcus epidermidis* clínicos e dois isolados de *S. aureus* nas superfícies de cateter. Outro estudo demonstrou que o lantibiótico lacticina 3147, apresentou uma vasta gama de atividade contra bactérias patogênicas de relevância clínica, incluindo *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *C. botulinum* e *Propionibacterium acnes* (GALVIN et al., 1999).

7 Considerações finais

Bacteriocinas têm potencial de aplicação em várias áreas, incluindo a indústria de alimentos e o setor clínico. São grupos diversos de peptídeos antimicrobianos sintetizados por bactérias, portanto, espera-se que se comportem de maneira diferente em diferentes alvos bacterianos e sob distintas condições ambientais. A inibição da multiplicação de isolados multirresistentes de estafilococos coagulase positiva obtida nesse estudo, indica o potencial de utilização da sakacina P como alternativa e/ou como coadjuvante aos compostos sintéticos normalmente utilizados para a conservação de alimentos. Entretanto, novas análises com a sakacina P, tanto na forma de SLC como na forma purificada, contra isolados clínicos multirresistentes, devem ser realizadas, pois podem trazer informações relevantes no combate às doenças causadas por diversos patógenos, especialmente *Staphylococcus* spp.. Além disso, pode resultar em uma alternativa ao uso de agentes antimicrobianos comumente utilizados, evitando, assim, o surgimento de novas linhagens multirresistentes.

Referências

ABRAHAM, E. P. & CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Infectious Diseases Society of America**, v. 10, p. 677–678, 1988.

ANDERSEN S.J., S. QUAN, B. GOWAN, E.R. DABBS. Monooxygenase-like sequence of a *Rhodococcus equi* gene conferring increased resistance to rifampin by inactivating this antibiotic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41 p. 218–221, 1997.

ANGULO, F. NARGUND, V., CHILLER, T., An evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 374–379, 2004.

APPELT S, FANCELLO L, LE BAILLY M, RAOULT D, DRANCOURT M, DESNUES C., Viruses in a 14th-century coprolite. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 9, p.2648-2655 2014.

AYMERICH MT, GARRIGA M, MONFORT JM, NES I, HUGAS M. Bacteriocin producing lactobacilli in Spanish-styled fermented sausages: characterization of bacteriocins. **Food Microbiology**, v. 17, p. 33–45, 2000.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, p. 384-404, 2003.

BARBOSA, M. S., TODOROV, S.D., IVANOVA, I., CHOBERT, J.-M., HAERTLÉ, T. & DE MELO FRANCO, B.D.G. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**, n. 46, p. 254–262, 2015.

BAUCHERON, S. Bile-mediated activation of the *acrAB* and *tolC* multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of *ramA* in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, V. 69, p. 2400–2406, 2014.

BAUMANN, S. et al. Molecular determinants of microbial resistance to thiopeptide antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**. V. 132, p.6973–6981, 2010.

BEGLEY, M., COTTER, P. D., HILL, C. & ROSS, R. P. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p. 5451–5460, 2009.

BIERBAUM, G. & SAHL, H. G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p.2–18, 2009.

BILLAL, D. S., FENG, J., LEPROHON, P., LEGARE, D. & OUELLETTE, M. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. **BMC Genomics** v.12 p.512, 2011.

BISCOLA, V.; TODOROV, S. D.; CAPUANO, V. S. C.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B. D. G. M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p.607–613, 2013.

BLAIR, Jessica M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 42–51, 2015.

BOERLIN, P.; BURNENS, A.P.; FREY, J.; KUHNERT, P.; NICOLET, J. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and minoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **Veterinary Microbiology**, v. 79, p.155–169. 2001.

CASABURI, A. et al. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. **Food Control**, v. 59, p.31-45, 2016.

CASTIGLIONE, F. et al. A novel lantibiotic acting on bacterial cell wall synthesis produced by the uncommon actinomycete *Planomonospora* sp. **Biochemistry** v. 46, p. 5884–5895, 2007.

CAVERA, VERONICA L. et al. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 5, p.494-501, 2015.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. et al. Retail Ready-to-Eat Food as a Potential Vehicle for *Staphylococcus* spp. Harboring Antibiotic Resistance Genes. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, p.993-998, 2014.

CHEN H, HOOVER DG. Bacteriocins and their food applications, Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v.82 p.100, 2003.

CLEMENTE JC, PEHRSSON EC, BLASER MJ, SANDHU K, GAO Z, WANG B. et al.. The microbiome of uncontacted Amerindians. **Science Advances**, v. 1, p.3, 2015.

CLEVELAND J., MONTVILLE TJ, NES IF, CHIKINDAS ML.. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71 p.1-20, 2001.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard -Eleventh Edition**. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute

COATES A., Y. HU, R. BAX, C. PAGE , The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature reviews Drug Discovery**, v.1, p.895 – 910, 2002.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 6, p.1403-1411, 2007.

COLLINS, B., CURTIS, N., COTTER, P. D., HILL, C. & ROSS, R. P., The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various β -lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p.4416–4423, 2010.

COTTER PD, ROSS RP, HILL C., Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p.95-105, 2013.

COTTER, P.D.; HILL, C. ROSS, R.P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, V. 3 p. 777-788, 2005.

COX, C. R., COBURN, P. S. & GILMORE, M. S., Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. **Current Protein & Peptide Science**, v. 6, p. 77–84 2005.

COX, G. et al. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p.287-292, 2013.

D’COSTA VM, KING CE, KALAN L, MORAR M, SUNG WW, SCHWARZ C, et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p.457–461, 2011.

DANTAS G, SOMMER MO, OLUWASEGUN RD, CHURCH GM. Bacteria subsisting on antibiotics. **Science**, v. 320 p. 100-103, 2008.

D'COSTA VM, MCGRANN KM, HUGHES DW, WRIGHT GD., Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311 p.74–77, 2006.

DE VUYST L, LEROY F., Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13 p.194-199, 2007.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS,P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DEL CASTILLO, F. J., DEL CASTILLO, I. & MORENO, F., Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2137–2140, 2001.

DENG, X. et al. Expression of multidrug resistance efflux pump gene norA is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 1753–1762, 2012.

DHAR N, MCKINNEY JD. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p.30–38, 2007.

DIEP, D. B., SKAUGEN, M., SALEHIAN, Z., HOLO, H. & NES, I. F. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 2384–2389, 2007.

DOLEJSKA, M., VILLA, L., POIREL, L., NORDMANN, P. & CARATTOLI, A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance nodulation cell division/multidrug efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 34–39, 2013.

DRIDER, D., FIMLAND, G., HECHARD, Y., MCMULLEN, L. M. & PREVOST, H., The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 564–582, 2006.

DŽIDIĆ, S. ŠUŠKOVIĆ, J. KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 11–21, 2008.

EIJSSINK, V. G., SKEIE, M., MIDDELHOVEN, P. H., BRURBERG, M. B. & NES, I. F., Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3275–3281, 1998.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 janeiro de 2015.

FEIL, E.J. COOPER, J.E. GRUNDMANN, H. ROBINSON, D.A. ENRIGHT, M.C. BERENDT, T. PEACOCK, S.J. SMITH, J.M. MURPHY, M. SPRATT, B.G. MOORE, C. DAY, N.P.J. How Clonal Is *Staphylococcus aureus*? **Journal of Bacteriology**, v. 185, p.3307–3316, 2003.

FERNÁNDEZ L., HANCOCK RE. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, p.661-681, 2012.

Fey, P.D. et al. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p. 196-203, 2003.

FLOYD, J. L., SMITH, K. P., KUMAR, S. H., FLOYD, J. T. & VARELA, M. F., LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p.5406–5412, 2010.

FONTANA MBC, BASTOS MCF, BRANDELLI A. Bacteriocins pep5 and Epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. **Current Microbiology**, v. 52, p. 350-353, 2006.

FONTANA, M. B., DE BASTOS MDO, C. & BRANDELLI, A. Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters. **Current Microbiology**, v. 52, p. 350–353, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

Galvez A, Abriouel H, Lopez RL, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GALVIN M, HILL C, ROSS RP. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p.355-358, 1999.

GAO, W., Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. **PLOS Pathogens**, v. 6, 2010.

GARCIA-ÁLVAREZ, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 595–603, 2011.

GOLDSTEIN, B. P., WEI, J., GREENBERG, K. & NOVICK, R., Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, in vitro, and in a mouse infection model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p.277–278, 1998.

GORDON, R. J. & LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection. Clinical Infectious Diseases**, v.46 p. 350–S359, 2008.

GOTTELAND, M. et al. Modulation of *Helicobacter pylori* colonization with cranberry juice and *Lactobacillus johnsonii* La1 in children. **Nutrition**, v. 24, p. 421–426, 2008.

GUENGERICH F.P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, p. 611–650, 2001.

HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. **Bacteriocins**, p. 45-92, 2007.

HENNEKINNE, J.A.; GUILLIER, F.; PERELLE, S.; De BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S.; KRYS, S.; LOMBARD, B. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 1261-1272, 2007.

HIRAKAWA, H., INAZUMI, Y., MASAKI, T., HIRATA, T. & YAMAGUCHI, A. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 1113–1126, 2005.

HOLCK A, AXELSSON L, BIRKELAND SE, AUKRUST T, BLOM H., Purification and aminoacid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* Lb706. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 2715– 2720, 1992.

HOLCK, A. L., L. AXELSSON, K. HUEHNE, AND L. KROECKEL. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* Lb674. **FEMS Microbiology Letters**, v. 115, p. 143–149, 1994.

HU, R. M., LIAO, S. T., HUANG, C. C., HUANG, Y. W. & YANG, T. C. An inducible fusaric acid tripartite efflux pump contributes to the fusaric acid resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS ONE** v. 7, 2012.

HUEHNE, K., L. AXELSSON, A. HOLCK, AND L. KROECKEL. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sakei* Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains. **Microbiology** v. 142, p. 1437–1448, 1996.

HUGAS M, GARRIGA M, AYMERICH T, MONFORT JM. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. **The International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p.107–113, 1993.

IVANOVA, I.; MITEVA, V.; STEFANOVA, T.; PANTEV, A.; BUDAKOV, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; NIKOLOVA, I.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 147–158, 1998.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.

JOHNSON, A. P. & WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 499–513, 2013.

JOHNSON, A.P.; PEARSON, A.; DUCKWORTH, G. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 455–462, 2005.

KAATZ, G. W., THYAGARAJAN, R. V. & SEO, S. M. Effect of promoter region mutations and mgrA overexpression on transcription of norA, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 161–169, 2005.

KACZMAREK, F. S. Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 1630–1639, 2004.

KAPIL, A. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. **Indian Journal of Medical Research**, v.121, p.83-91, 2005.

KATAYAMA, Y., ITO, T. & HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, p. 1549–1555, 2000.

KAZAKOV, T. et al. *Escherichia coli* peptidase A, B, or N can process translation inhibitor microcin C. **Journal of Bacteriology**, V. 190, p. 2607–2610, 2008.

KEMPERMAN R, JONKER M, NAUTA A, KUIPERS OP, KOK J. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5839-5848, 2003.

KEMPERMAN R, KUIPERS A, KARSENS H, NAUTA A, KUIPERS O, KOK J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.1589-1597, 2003.

KIM, C. The mechanism of heterogeneous β -lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

KINGCHA Y, TOSUKHOWONG A, ZENDO T, ROYTRAKUL S, LUXANANIL P, CHAREONPORNSOOK K, VALYASEYI R, SONOMOTO K, VISESSANGUAN W. Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. **Food Control**, v.25, p. 190-196, 2012.

KIRBY WM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin-resistant staphylococci. **Science**, v. 99, p. 452–453, 1944.

KLEIN, E.; SMITH, D.L.; LAXMINARAYAN, R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1840–1846, 2007.

KLUITMANS, J. WERTHEIM, HF. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: and prevention of nosocomial infections. **Infection**, v. 33, p.3-8, 2005.

KOHANSKI M. A., D. J. DWYER, J. J. COLLINS, How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 423 – 435, 2010.

KOJIMA, S. & NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. E2629–E2634, 2013.

KRAMER, N. E., VAN HIJUM, S. A., KNOL, J., KOK, J. & KUIPERS, O. P. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactisacquires* nisin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1753–1761, 2006.

KRESSE, M. J. BELSEY, H. ROVINI. The antibacterial drugs Market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 19 – 20, 2007.

Kuchenbecker S. B., RRIBEIRO A. R., & CARDOSO M. Perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2009.

KUMAR, N. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Science**, v. 23, p. 423–432, 2014.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1471-1485, 2005.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2001. p. 387–403.

LARSEN AG, VOGENSEN FK, JOSEPHSEN J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 113–122, 1993.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 482–492, 2002.

LEVY SB, MARSHALL B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, p. 122–129, 2004.

LEWIS K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry**, v. 70, p. 267–74, 2005.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum betalactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 3–10, 2008.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of clinical investigation**, v.111, p.1265-1273, 2003.

LYNCH, J. P., 3RD, CLARK, N. M. ZHANEL, G. G. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, p. 199–210, 2013.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 10. ed, Brasil: Artmed, 2004.

MAGIORAKOS, A.-p. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 18, n. 3, p.268-281, 2012.

MAH TF, PITTS B, PELLOCK B, WALKER GC, STEWART PS, O'TOOLE GA., A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. **Nature**, v. 426, p. 306–310, 2003.

MAHER, S. & MCCLEAN, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1289–1298, 2006.

MAIDEN, M. C. J.. Horizontal Genetic Exchange, Evolution, and Spread of Antibiotic Resistance in Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p.12-20, 1998.

MALIK, S.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. **Journal of Applied Microbiology** v. 99, p. 1283–93. 2005.

MARSH, A. J., O'SULLIVAN, O., ROSS, R. P., COTTER, P. D. & HILL, C. In silicoanalysis highlights the frequency and diversity of type 1 lantibiotic gene clusters in genome sequenced bacteria. **BMC Genomics**, v. 11, p. 679, 2010.

MARTIN, N. I.; BREUKINK, E. Expanding role of lipid II as a target for lantibiotics. **Future Microbiology**, v. 2, p. 513–525, 2007.

MARTINEZ, J. L., & BAQUERO, F. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p.1771–1777, 2000.

MATHIESEN G, HUEHNE K, KROECKEL L, AXELSSON L, EIJSINK VGH. Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin Pproducing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3565–3574, 2005.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, C. W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. (Eds.). **Methods in Microbiology**, v.7, 1972.

MERCANTE, A. D. MpeR regulates the mtrE locus in *Neisseria gonorrhoeae* and modulates antimicrobial resistance by an iron-responsive mechanism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1491–1501, 2012.

METLITSKAYA, A. et al. Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 18033–18042, 2006.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 43, 2007.

MOELLERING R. C. Discovering new antimicrobial agents. **The International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 2–9, 2011.

MORRIS, D.O.; ROOK, K.A.; SHOFER, F.S.; RANKIN, S.C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). **Veterinary Dermatology**, v. 17, p. 332-337. 2006.

NASCIMENTO JS, CEOTTO H, NASCIMENTO SB, et al. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 215-221, 2006.

NEU, H. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v. 257 n. 5073 p. 1064-1073, 1992 .

NIKAIDO H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.

NIKAIDO, E. Effects of indole on drug resistance and virulence of *Salmonella entericaserovar Typhimurium* revealed by genome-wide analyses. **Gut Pathogens**, v. 4, p.5, 2012.

NIKAIDO, E. SHIROSAKA, I., YAMAGUCHI, A. & NISHINO, ., Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* in response to indole and paraquat. **Microbiology**, v. 157, p. 648–655, 2011.

NISSEN-MEYER, J.; ROGNE, P.; OPPEGÅRD, C.; HAUGEN, H.S. & KRISTIANSEN, P.E. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p.10-37, 2009.

NORDMANN, P., POIREL, L., WALSH, T. R. & LIVERMORE, D. M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 588–595, 2011.

NOVIKOVA, M. et al., The *Escherichia coli* Yej transporter is required for the uptake of translation inhibitor microcin C. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 8361–8365, 2007.

OGAWA, W. ONISHI, M., NI, R., TSUCHIYA, T. & KURODA, T. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. **Gene**, v. 498, p. 177–182, 2012.

OLLIVER, A., VALLÉ, M., CHASLUS-DANCLA, E. & CLOECKAERT, A. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella entericaserovar Typhimurium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 267–272, 2004.

OVERBYE, K.M. AND BARRETT, J.F., Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 45–52, 2005.

PARKS, W. M., BOTTRILL, A. R., PIERRAT, O. A., DURRANT, M. C. & MAXWELL, A. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. **Biochimie**, v. 89, p.500–507, 2007.

PEREZ RH, ZENDO T, SONOMOTO K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13 p. S3, 2014 .

PIPER, C., COTTER, P. D., ROSS, R. P. & HILL, C. Discovery of medically significant lantibiotics. **Curr. Drug Discovery Technologies**, v. 6, p. 1–18, 2009.

PIPER, C., DRAPER, L. A., COTTER, P. D., ROSS, R. P. & HILL, C. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and Enterococcus species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 546–551, 2009.

PRIBUL, B.R. et al. Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de *Lactobacillus* spp em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 744-748, 2011.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

REA, M. C. et al. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 1, p.4639-4644, 2010.

SÁNCHEZ-HIDALGO M, MONTALBÁN-LÓPEZ M, CEBRIÁN R, VALDIVIA E, MARTÍNEZ-BUENO M, MAQUEDA M, AS-48 bacteriocin: close to perfection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2845–2857, 2011.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto de Biologia**. v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTIAGO-RODRIGUEZ TM, FORNACIARI G, LUCIANI S, DOWD SE, TORANZOS GA, MAROTA I, et al., Gut Microbiome of an 11th Century A.D. Pre-Columbian Andean Mummy. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

SEHN, C.P. **Avaliação da atividade bacteriocinogênica e características probióticas do isolado *Lactobacillus curvatus* LC254 e da utilização da sua substância antimicrobiana em filmes biodegradáveis**. 2015. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas

SHORE, A. C. & COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 350–359, 2013.

SHORE, A. C. Detection of staphylococcal cassette chromosome mectype XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr*genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 3765–3773, 2011.

SIMON L, FREMAUX C, CENATIEMPO Y, BERJEAUD JM, Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6416–6420, 2002.

SJÖLUND M, BONNEDAHL J, HERNANDEZ J, BENGTTSSON S, CEDERBRANT G, PINHASSI J, et al., Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arcti. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p.70-72, 2008.

SOBRINO OJ, RODRIGUEZ JM, MOREIRA WL, FERNANDEZ MF, SANZ B, HERNANDEZ PE. Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sakei* 148. **The International Journal of Food Microbiology** v. 16, p. 215–225, 1992.

SOUDY, R., WANG, L. & KAUR, K. Synthetic peptides derived from the sequence of a lasso peptide microcin J25 show antibacterial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1794–1800, 2012.

SPRATT, B.G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. **Science**, v. 264, p. 388–393, 1994.

STEGGER, M. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either mecA or the new mecA homologue mecA LGA251. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 395–400, 2012.

SU, P., HENRIKSSON, A. & MITCHELL, H. Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivomurine model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2392–2400, 2007.

SU, P., HENRIKSSON, A. & MITCHELL, H. Survival and retention of the probiotic *Lactobacillus casei* LAFTI L26 in the gastrointestinal tract of the mouse. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 120–125, 2007.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v.60, n.2, p.195-202, 1997.

SUTYAK, K. E., WIRAWAN, R. E., AROUTCHEVA, A. A. & CHIKINDAS, M. L., Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1067–1074, 2008.

TENOVER F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v.119, p. S3–S10, 2006.

TICHACZEK PS, VOGEL RF, HAMMES WP, Cloning and sequencing of sakP encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LHT673. **Microbiology**, v. 140, p. 361–367, 1994.

TICHACZEK, P. S., J. NISSEN-MEYER, I. F. NES, R. F. VOGEL, AND W. P. HAMMES. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sakei* LTH673. **Systematic and Applied Microbiology**, v.15, p. 460–468, 1992.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. dextranicum ST99 isolated from boza. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 323–329, 2004.

TRAN, Q. T., WILLIAMS, S., FARID, R., ERDEMLI, G. & PEARLSTEIN, R. The translocation kinetics of antibiotics through porin OmpC: insights from structure-based solvation mapping using WaterMap. **Proteins**, v. 81, p. 291–299, 2013.

VAN DER STRAATEN, T., JANSSEN, R., MEVIUS, D. J. & VAN DISSEL, J. T., *Salmonella* gene rma (ramA) and multipliedrug-resistant *Salmonella* entérica serovar typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2292–2294, 2004.

VAN HEEL AJ, MONTALBAN-LOPEZ M, KUIPERS OP. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 7, p. 675-680, 2011.

VAN HOEK A. H. A. M. et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 203, 2011.

VARABIOFF Y, Incidence of *Listeria* in small goods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 14, p. 167–169, 1992.

VARGIU, A. V. & NIKAIDO, H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 20637–20642, 2012.

VAUGHAN A, O'MAHONY J, EIJSINK VGH, O'CONNELL-MOTHERWAY M, VAN SINDEREN D., Transcriptional analysis of bacteriocin production by malt isolate *Lactobacillus sakei*5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 377–384, 2004.

VERHOEF, J. Antibiotic resistance: the pandemic. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 531, p. 301–313, 2003.

VERRAES, C., VAN BOXSTAEL, S., VAN MEERVENNE, E., VAN COILLIE, E., BUTAYE, P., CATRY, B., DE SCHAETZEN, M.A., VAN HUFFEL, X., IMBERECHTS, H., DIERICK, K., DAUBE, G., SAEGERMAN, C., DE BLOCK, J., DEWULF, J., HERMAN, L. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, p. 2643–266, 2013.

VINCENT, P. A. & MORERO, R. D. The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 538–549, 2009.

VOULGARI, E., POULOU, A., KOUMAKI, V. & TSAKRIS, A., Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiology**, v. 8, p. 27–39, 2013.

WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y.; GUO, G.; USMAN, T.; HAO, D.; TANG, X.; ZHANG, Y.; YU, Y. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58 p. 527 - 534, 2014.

WARINNER C, RODRIGUES JF, VYAS R, TRACHSEL C, SHVED N, GROSSMANN J, et al. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. **Nature genetics**, v. 46, p. 336–44, 2014.

WARNER, D. M., SHAFER, W. M. & JERSE, A. E. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC–MtrD–MtrE efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness.

Molecular Microbiology, v. 70, p. 462–478, 2008.

WEBBER, M. A. & PIDDOCK, L. J. V. Absence of mutations in marRAB or soxRS in acrB-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1550–1552, 2001.

WEBBER, M. A., TALUKDER, A. & PIDDOCK, L. J. V., Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to acrB expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4390–4392, 2005.

WERCKENTHIN, C.; CARDOSO, M.; MARTEL, J. L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Research**, v. 32, p. 341–362, 2001.

WINKER, K. et al. Movements of Birds and Avian Influenza from Asia into Alaska. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 547–552, 2007.

WOODFORD, N., TURTON, J. F. & LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 736–755, 2011.

WRIGHT GD, POINAR H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. **Trends in microbiology**, v. 20, p. 157–159, 2012.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1451–1470, 2005.

YANG W., I.F. MOORE, K.P. KOTEVA, D.C. BAREICH, D.W. HUGHES, G.D. WRIGHT. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 52346–52352, 2004.

YUZENKOVA, J. et al., Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 50867–50875, 2002.

ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, p.56-65, 2008.

ZHANG L, MAH TF., Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics, **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 4447–4452, 2008.