



Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Campus Rio de Janeiro

Cinara Souza da Conceição

**Análise da produção de substâncias antimicrobianas por
bactérias Gram-negativas associadas à contaminação de
fórmulas lácteas infantis.**

Rio de Janeiro - RJ

2018

Cinara Souza da Conceição

Análise da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias Gram-negativas associadas à contaminação de fórmulas lácteas infantis.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Janaína dos Santos Nascimento
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Jessica Manyá Bittencourt Dias Vieira

Rio de Janeiro - RJ

2018

Cinara Souza da Conceição

Análise da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias Gram-negativas associadas à contaminação de fórmulas lácteas infantis.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Prof. Dr^a Eidy de Oliveira Santos

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO)

Prof. Dr^a Barbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira

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

Prof. Dr^a Simone Lorena Quitério de Souza

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

Rio de Janeiro – RJ
2018

Dedico esta dissertação à minha mãe Geralda Maria de Souza, meu pai Benedito Ribeiro da Conceição e aos meus irmãos Clístenes Souza da Conceição e Hudson Souza da Conceição.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela realização de mais um sonho e por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir.

Agradeço à minha família de modo especial a minha mãe Geralda que sempre esteve ao meu lado, por suas orações, pelo colo acolhedor e por todo amor e compreensão. Agradeço ao meu pai Benedito e aos meus irmãos Clístenes e Hudson por sempre me apoiarem em todos os meus sonhos e tenho a certeza que a realização de todos eles só é possível graças ao apoio de vocês.

Agradeço à Bárbara Victor Souza pelo apoio, disponibilidade, e comprometimento em todas as etapas deste estudo.

Agradeço à todos os professores do curso e a minha turma que se tornaram queridos amigos.

Agradeço à banca examinadora pela disposição em participar do aprimoramento deste estudo com seus conhecimentos e sugestões.

Agradeço à minha co-orientadora Jessica Many Bittencourt Dias Vieira pelo apoio, incentivo e por sua amizade.

Agradeço à minha orientadora Janaína dos Santos Nascimento por todo apoio, incentivo, amizade, confiança e principalmente por sua generosidade e disponibilidade em ensinar e ajudar a todos seus alunos. Sou eternamente grata por tudo.

A todos vocês meu muito obrigada!

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein

Conceição, C. S. **Análise da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias Gram-negativas associadas à contaminação de fórmulas lácteas infantis.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós Graduação Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2018.

RESUMO

As fórmulas lácteas infantis (FLI) apesar de ser um recurso usado para a alimentação infantil, têm preocupado bastante as organizações de saúde devido as mesmas não serem estéreis, o que facilita sua contaminação por micro-organismos, em destaque as bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae*. Muitas destas bactérias são consideradas patogênicas devido aos fatores de virulência que possuem, incluído a resistência e multirresistência a antibióticos. Algumas pesquisas vêm sendo realizadas utilizando agentes antimicrobianos capazes de reduzir o crescimento e multiplicação bacteriana e/ou que consigam sua eliminação. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade nas pesquisas já realizadas por nosso grupo com o intuito de analisar a produção de substâncias antimicrobianas (SAM) por bactérias Gram-negativas isoladas de FLI e de utensílios usados no seu preparo. Neste trabalho, dos quarenta e cinco isolados testados quanto à produção de SAM em meio sólido, 31 (64,6%) mostraram atividade inibitória contra pelo menos uma das bactérias utilizadas como indicadoras. Cinco isolados de utensílios, três de *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (JE3, JE6 e JE4) e dois de *Enterobacter cloacae* (ME1 e BIE1) foram os mais promissores e inibiram patógenos alimentares como *Bacillus cereus* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, além de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *P. vulgaris*. O isolado JE6 conseguiu inibir um número maior de indicadoras, sendo usado nos testes subsequentes onde a influência do meio de cultura, temperatura, pH, concentração de NaCl e atmosfera na produção desta substância foram avaliadas. As SAM podem ser produzidas em diferentes meios de crescimento, sob uma faixa de pH de 5 a 8, concentrações de NaCl de 1,0 a 3,0% e condições aeróbicas e anaeróbicas. A produção de SAM ocorreu em temperatura ambiente, 37°C e 42°C quando a indicadora utilizada para sua detecção foi *B. cereus*, no entanto, para *S. enterica* e *P. vulgaris*, foi detectada a produção de SAM a 37°C, o que sugere que JE6 produza pelo menos duas SAM distintas. Os resultados mostram que as melhores condições para a produção da(s) SAM podem ser representadas pelo crescimento em ágar Casoy, a 37°C com pH inicial de 5,0, sem adição de NaCl e sob aerobiose. A SAM produzida por JE6 também mostrou eficácia na inibição de isolados pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e *Shigella dysenteriae* multirresistentes a antibióticos, assim como em estirpes resistentes e multirresistentes isoladas de produtos lácteos. Os experimentos realizados com o sobrenadante da cultura JE6, obtido através da combinação de meio líquido e semissólido, demonstraram que houve inibição do crescimento da indicadora *B. cereus*, mas não de *S. enterica* e *P. vulgaris*, sugerindo, mais uma vez, que JE6 produza mais de um tipo de SAM. Estes resultados são importantes na avaliação do potencial dessas bacteriocinas na aplicação da área de alimentos e constitui o primeiro passo para sua purificação e utilização. De acordo com a literatura, este pode ser o primeiro trabalho a relatar a produção de uma SAM por uma estirpe do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* ativa contra bactérias patógenos alimentares e bactérias Gram-negativas resistentes e multirresistentes a antibióticos.

Palavras-chave: Fórmulas lácteas infantis, Substâncias antimicrobianas, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

Conceição, C. S. **Análise da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias Gram-negativas associadas à contaminação de fórmulas lácteas infantis.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós Graduação Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2018.

ABSTRACT

Breast milk is considered the main source of nutrients for children and newborns, but breastfeeding is not always possible. In this case, infant milk formulas (IMF) are used. However, although they are a resource used for infant feeding, they have been of great concern to health organizations because they are not sterile, which facilitates their contamination. Studies carried out by our group in a milk dispensary from a municipal hospital verified the contamination of IMF and utensils used in their preparation and distribution by different pathogens, in particular, Gram-negative bacteria from *Enterobacteriaceae* family. Many of these bacteria are considered pathogenic due to several virulence factors they present, including resistance and multi-resistance to antibiotics. In the last decades, some researches have been performed using antimicrobial agents, different from antibiotics and chemical preservatives, capable of reducing bacterial growth and multiplication and / or achieving their elimination. In this way, the objective of this work is to continue a research already carried out by our group in order to analyze the production of antimicrobial substances (SAM) by Gram-negative bacteria isolated from IMF and utensils used in their preparation. In this study, from forty eight isolates tested for the production of SAM in solid medium, 31 (64.6%) showed inhibitory activity against at least one of the bacteria used as indicator. Five isolates from utensils, three of *Acinetobacter baumannii* / *calcoaceticus* (JE3, JE6 and JE4) and two of *Enterobacter cloacae* (ME1 and BIE1) were the most promising, inhibiting foodborne pathogens such as *Bacillus cereus* and *Salmonella enterica* serotype Typhi, beyond *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*. The JE6 isolate was able to inhibit a greater number of indicators and was used in the subsequent tests where the influence of the culture medium, temperature, pH, NaCl concentration and atmosphere on the production of this substance were evaluated. In general, SAM's can be produced in different growth media under a pH range of 5 to 8, NaCl concentrations of 1.0 to 3.0% and aerobic and anaerobic conditions. The production of SAM JE6 occurred at room temperature, 37° C and also 42°C when the indicator used for its detection was *B. cereus*, but for *S. enterica* and *P. vulgaris*, production of SAM was detected only at 37° C. This fact suggests that JE6 can produce at least two distinct SAM's. The results show that the best conditions for the production of SAM JE6 can be represented by the growth in Casoy agar at 37°C with initial pH of 5.0, without addition of NaCl and under aerobic conditions. SAM produced by JE6 also showed efficacy in the inhibition of antibiotic-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*/*calcoaceticus* complex and *Shigella dysenteriae*, as well as in resistant and multi-resistant strains isolated from dairy products. Experiments with the JE6 culture supernatant, obtained by combining liquid and semi-solid media, demonstrated the inhibition of the growth of the *B. cereus* but not of *S. enterica* and *P. vulgaris*, suggesting once again that JE6 produces more than one SAM. These results are important in the evaluation of the potential application of this SAM in food area and are the first step for their purification. Based on literature, this may be the first work reporting the production of an SAM by a strain of *Acinetobacter baumannii*/*calcoaceticus* complex active against foodborne and resistant and multidrug-resistant Gram-negative bacteria.

Keywords: Infant milk formulas, antimicrobial substances, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Porcentagem de espécies identificadas, isoladas de utensílios e FLI reconstituídas no lactário de um hospital público do Rio de Janeiro | 5 |
| Figura 2: Representação esquemática da biossíntese e regulação da bacteriocina da classe II | 10 |
| Figura 3: Bacteriocinas: do uso simples às aplicações específicas | 16 |
| Figura 4: Esquema dos procedimentos realizados para a detecção da produção de substâncias antimicrobianas | 25 |
| Figura 5: Esquema dos procedimentos realizados para verificar as melhores condições de crescimento para a produção de substâncias antimicrobianas. | 27 |
| Figura 6: Produção de SAM pelo isolado JE6 contra <i>Salmonella</i> Typhi e <i>B. cereus</i> . | 30 |
| Figura 7: Sensibilidade a enzimas proteolíticas pelo isolado JE6 contra <i>B.cereus</i> | 31 |
| Figura 8: Inibição de estirpes indicadoras sob as condições mais favoráveis para a produção de SAM pela estirpe JE6 | 34 |
| Figura 9: Produção de SAM pelo isolado JE6 contra estirpes multirresistentes a antibióticos: <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> JR4 e <i>Shigella dysenteriae</i> ME3. | 36 |
| Figura 10: Inibição de Complexo <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> V2.14 e <i>Klebsiella oxytoca</i> V1.27 pelo isolado JE6 | 38 |
| Figura 11: Inibição da indicadora <i>B. cereus</i> pelo sobrenadante da cultura JE6 | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Classificação dos micro-organismos segundo sua causalidade em fórmulas lácteas infantis | 3 |
| Tabela 2: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas | 9 |
| Tabela 3: Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos convencionais | 12 |
| Tabela 4: Bactérias Gram-negativas utilizadas neste trabalho para investigação da produção de SAM | 23 |
| Tabela 5: Estirpes bacterianas utilizadas como indicadoras da produção de SAM | 24 |
| Tabela 6: Produção de SAM por bactérias Gram-negativas isoladas de utensílios usados no preparo de fórmulas lácteas infantis. | 29 |
| Tabela 7: Influência do meio de cultura, pH, concentração de NaCl e atmosfera na produção da SAM por JE6. | 33 |
| Tabela 8: Inibição de Estirpes do complexo <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> e <i>Shigella dysenteriae</i> por JE6 | 36 |
| Tabela 9: Inibição de estirpes isoladas de produtos lácteos por JE6 | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BLIS: *Bacteriocin-like inhibitory substance* (substância inibitória do tipo bacteriocina)

COMPLEXO ABC: Complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*

FAO: *Food and Agricultural Organization* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentos)

FLI: Fórmula láctea infantil

GRAS: *Generally recognized as safe* (Geralmente reconhecida como seguro)

LMIFRJ: Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

MDR: *Multidrug resistance* ou *multidrug resistant* (Multiresistência ou multirresistente a drogas)

MDRE: *Enterococcus* multirresistentes a antibióticos

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à *meticilina*

SAM: Substância(s) antimicrobiana(s)

VRE: *Enterococcus faecalis* resistentes à *vancomicina*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1. FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS | 2 |
| 2.2. CONTAMINAÇÕES DE FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS | 2 |
| 2.3. <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | 5 |
| 2.4. SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS | 7 |
| 2.5. BACTERIOCINAS | 8 |
| 2.5.1. Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas | 8 |
| 2.5.2. Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas | 13 |
| 2.6. BACTERIOCINAS E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES | 14 |
| 2.6.1. Bacteriocinas e BLIS produzidas por bactérias Gram-negativas contra patógenos alimentares (Estudos realizados no IFRJ) | 18 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 20 |
| 4. OBJETIVO | 21 |
| 4.1. OBJETIVO GERAL | 21 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 5.1. ISOLADOS BACTERIANOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO | 22 |
| 5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SAM PELAS ESTIRPES ISOLADAS | 22 |
| 5.3. TESTE DE SENSIBILIDADE DAS SAM ÀS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E AO NaOH | 25 |
| 5.4. INFLUÊNCIAS DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DE SAM | 26 |
| 5.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ESTIRPES RESISTENTES E MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS (MDR) PELO ISOLADO JE6 | 27 |
| 5.6. OBTENÇÃO DA SAM A PARTIR DO SOBRENADANTE DA CULTURA PRODUTORA | 27 |
| 5.6.1. Obtenção direta a partir do sobrenadante | 27 |
| 5.6.2. Obtenção a partir da combinação de meio líquido com meio semissólido | 28 |
| 5.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 28 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 6.1. PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS | 29 |
| 6.2. SENSIBILIDADE DA SAM JE6 A ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E AO NaOH | 30 |
| 6.3. OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SAM PELA ESTIRPE JE6 | 32 |
| 6.4. CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ESTIRPES DO COMPLEXO | |

| | |
|--|----|
| <i>ACINETOBACTER BAUMANNII/CALCOACETICUS</i> E <i>SHIGELLA DYSENTERIAE</i> RESISTENTES E MULTIRRESISTENTES (MDR) A ANTIBIÓTICOS ISOLADAS DE FLI E DE UTENSÍLIOS PELO ISOLADO JE6 | 35 |
| 6.5.CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ESTIRPES RESISTENTES E MDR ISOLADAS DE PRODUTOS LÁCTEOS PELO ISOLADO JE6. | 37 |
| 6.6.DETECÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA A PARTIR DO SOBRENADANTE DA CULTURA JE6 | 39 |
| 7.CONCLUSOES | 40 |
| 8.PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DESTE TRABALHO | 41 |
| 8.1.ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO (ANEXOS 1 e 2) | 41 |
| 8.2.COMUNICAÇÃO EM EVENTOS (ANEXOS 3, 4 e 5) | 41 |
| 9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |
| 10.ANEXOS | 47 |

1. INTRODUÇÃO

As fórmulas lácteas infantis são utilizadas na alimentação de crianças e recém-nascidos quando, por algum motivo, a amamentação não é possível. Tais fórmulas têm o objetivo de fornecer as crianças o aporte necessário de nutrientes para o seu crescimento e desenvolvimento (ARSALAN *et al.*, 2013a). Contudo, muitos relatos vêm sendo observados sobre a contaminação das fórmulas lácteas por micro-organismos, uma vez que as mesmas não são estéreis (ARSALAN *et al.*, 2013a).

As espécies *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) e *Salmonella enterica* são as mais associadas à contaminação e as principais responsáveis por causar infecções em crianças e recém-nascidos (GRIBBLE e HAUSMAN, 2012; MORAES *et al.*, 2015a). Estudos realizados por nosso grupo identificaram a contaminação de fórmulas lácteas infantis de um lactário instalado em um hospital municipal, onde apresentaram a contaminação por diversas bactérias Gram-negativas em especial da família *Enterobacteriaceae* (MORAES *et al.*, 2015a; ARAÚJO *et al.*, 2015).

As *Enterobacteriaceae* possuem diversos fatores de virulência como a capacidade de adesão, formação de biofilme, cápsula polissacarídica, lipopolissacarídeo (LPS) e, principalmente, a resistência a múltiplos antibióticos (MDR, do inglês *multi-drug resistance*) que auxiliam na contaminação em alimentos e na causa de doenças (LEE *et al.*, 2017).

Com base nas pesquisas existentes em relação à contaminação microbiológica em fórmulas lácteas infantis, tornou-se necessário a utilização de novos aditivos que busquem a eliminação ou diminuição da mesma nos alimentos. Uma alternativa é a utilização de substâncias antimicrobianas. Estas substâncias visam o controle microbiológico e dentre elas, destacam-se as bacteriocinas. Estas últimas são peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos das células bacterianas e que tem ação bactericida ou bacteriostática sobre determinadas espécies de bactérias (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Considerando os dados existentes sobre a ação dos micro-organismos na contaminação de fórmulas lácteas infantis, este trabalho tem a finalidade de verificar a produção de substâncias antimicrobianas por bactérias Gram-negativas oriundas de fórmulas lácteas infantis e de utensílios utilizados em seu preparo, armazenamento e distribuição, bem como seu potencial de ação contra diferentes patógenos alimentares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS

Dentre as pesquisas mais importantes relacionadas à alimentação infantil destacam-se a composição do leite humano e os benefícios que o mesmo fornece durante a amamentação para o crescimento de crianças. A prática da amamentação e o uso do leite humano são considerados padrões de referência recomendados para a alimentação e nutrição infantil (RYAN e HAY, 2016). Os estudos relacionados à composição do leite humano aumentaram nos últimos anos em parte devido à utilização de fórmulas lácteas infantis que buscam maior semelhança à composição e valor nutricional do leite materno (RYAN e HAY, 2016).

As fórmulas lácteas infantis são produtos alimentícios desenvolvidos em forma líquida ou em pó, utilizados para suprir as necessidades alimentares de crianças e recém-nascidos quando por motivos de doenças, a prática da amamentação não é possível ou desejável (WEFFORT, 2012; ARSALAN *et al.*, 2013a).

Uma grande variedade de fórmulas lácteas infantis está disponível no mundo todo, tais como fórmulas para prematuros, para recém-nascidos, para crianças de seis meses a um ano e, ainda, algumas fórmulas especializadas para lactentes e crianças com problemas no metabolismo. Desta forma, as composições das fórmulas lácteas infantis variam dependendo das necessidades nutricionais e do público alvo, levando em consideração os padrões globais estabelecidos pela Comissão do *Codex Alimentarius* atualizado (RYAN e HAY, 2016).

No entanto, a introdução de fórmulas lácteas na dieta pode causar efeitos deletérios a saúde infantil, muitos deles devido a presença de contaminantes químicos e microbiológicos que frequentemente estão associados ao aumento na vulnerabilidade de crianças a doenças como diarreias, infecções e até mesmo a desnutrição (SILVA *et al.*, 2010).

2.2. CONTAMINAÇÕES DE FORMÚLAS LÁCTEAS INFANTIS

Normalmente, em unidades hospitalares, as fórmulas lácteas são preparadas no lactário. Este setor é destinado ao preparo, higienização e distribuição das mamadeiras com leite e seus substitutos para alimentação de recém-nascidos (ROSSI *et al.*, 2010).

A contaminação das fórmulas lácteas, assim como dos alimentos servidos em hospitais, pode ocorrer devido a higienização inadequada de equipamentos e utensílios usados nas etapas de preparo, transporte, armazenamento e distribuição de tais alimentos, tornando necessário o controle higiênico sanitário em todas as etapas do processo (ROSSI *et al.*, 2010; LINHARES, 2012).

A contaminação por agentes químicos pode ocorrer devido à presença de detergentes em utensílios de uso contínuo e higienizados na mesma área de manipulação das fórmulas lácteas. Por este motivo o controle dos contaminantes é de extrema importância, pois podem gerar doenças de origem alimentar, trazendo riscos de morbidade para as crianças e recém-nascidos (LINHARES, 2012). Em 2008, a contaminação de fórmulas lácteas infantis na China por um agente químico, a melamina, utilizado na adulteração das cadeias de nitrogênio do leite gerando um aumento da massa de suas proteínas, resultou em centenas de crianças doentes e várias mortes (GRIBBLE e HAUSMAN, 2012).

Segundo Arsalan e colaboradores (2013), a fabricação de fórmulas lácteas infantis estéreis nem sempre é possível de ser realizada utilizando-se a tecnologia atual de processamento, o que aumenta o risco de contaminação não só por micro-organismos, como também por contaminantes químicos. Os micro-organismos e/ou suas toxinas geram grande preocupação quanto à administração de fórmulas lácteas, uma vez que podem ocasionar doenças e até mesmo a morte de lactentes. Estudos realizados identificaram as principais espécies bacterianas com base em sua causalidade em fórmulas lácteas infantis, como apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Classificação dos micro-organismos segundo sua causalidade em fórmulas lácteas infantis

| | |
|--|--|
| <p>Categoria A Evidência clara de causalidade</p> | <p><i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) <i>Salmonella enterica</i></p> |
| <p>Categoria B Causalidade plausível, mas ainda não demonstrada</p> | <p><i>Pantoea agglomerans</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Citrobacter koseri</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i></p> |
| <p>Categoria C Causalidade menos plausível ou ainda não demonstrada</p> | <p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocytogenes</i></p> |

Fonte: Arsalan *et al.*, 2013a; Arsalan *et al.*, 2013b.

Dentre as bactérias patogênicas mais presentes em fórmulas lácteas destacam-se as bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Nas fórmulas lácteas em pó podem ser encontradas bactérias como *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*), *Salmonella spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia vulneris*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.* e *Enterobacter cloacae*. Podem também ser encontradas bactérias Gram-positivas como *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Apesar do grande número de espécies bacterianas associadas às fórmulas lácteas em pó, apenas *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*) e *Salmonella enterica*, espécies com maior evidências de causalidade, foram relacionadas a infecções em lactentes, o que contribuiu para que as autoridades de saúde passassem a exigir testes para presença de *Samonella spp.* em fórmulas lácteas infantis (GRIBBLE e HAUSMAN, 2012; MORAES *et al.*, 2015a).

A contaminação de FLI por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) está associada a infecções em crianças, tais como meningite, bacteremia, enterocolite necrosante e encefalite, especialmente em prematuros (GRIBBLE e HAUSMAN, 2012). Embora haja diferenças entre a ecologia microbiana de *Samonella spp.* e *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) e outras enterobactérias, as estratégias de redução de risco que visam seu controle também são aplicáveis para os demais membros da família *Enterobacteriaceae* (GRIBBLE e HAUSMAN, 2012).

No Brasil a legislação vigente que trata dos Padrões Microbiológicos para Alimentos é a Resolução RDC n°12, de 02 de janeiro de 2001/ANVISA, a qual determina para a categoria de alimentos “fórmulas infantis”, a detecção dos seguintes micro-organismos: coliformes a 35°C (totais), coliformes a 45°C (termotolerantes), estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella sp.* (BRASIL, 2001). Os alimentos que apresentam condições sanitárias insatisfatórias, e presença de micro-organismos patogênicos e/ou toxinas são considerados impróprios para o consumo humano e representam risco para a saúde pública (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Em 2015, Moraes verificou a contaminação de fórmulas lácteas infantis e de utensílios usados no preparo das mesmas em um lactário hospitalar, encontrando cerca de quarenta e cinco isolados bacterianos, sendo a maioria deles pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (**Figura 1**).

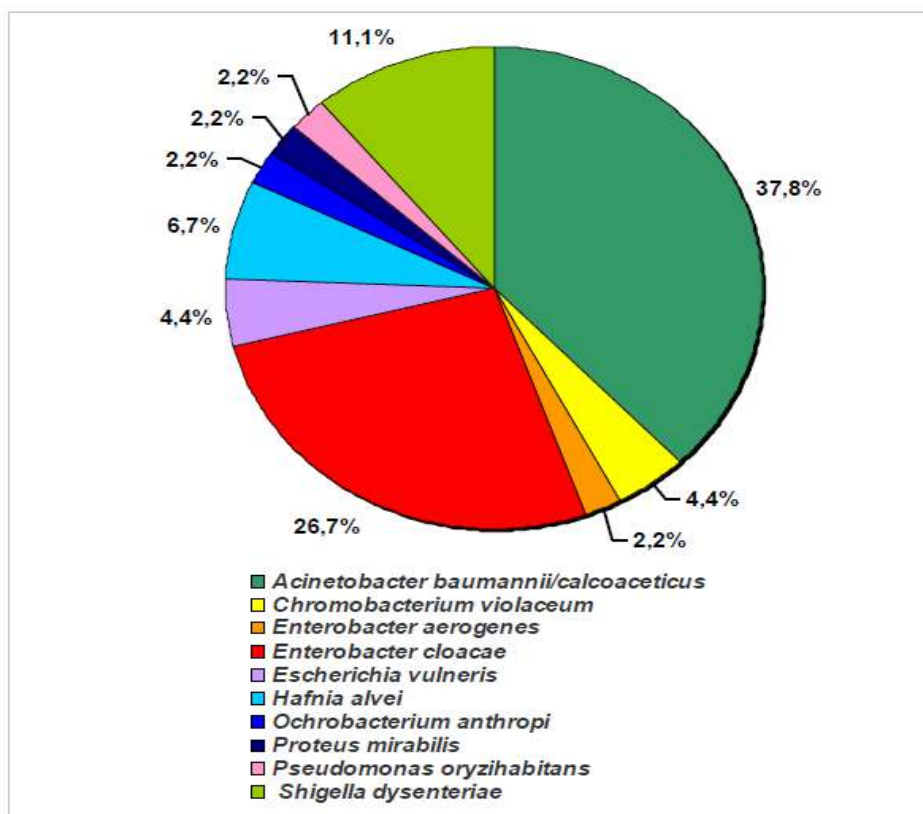


Figura 1: Porcentagem de espécies bacterianas identificadas, isoladas de utensílios e FLI reconstituídas no lactário de um hospital público do Rio de Janeiro (MORAES, 2015).

As bactérias encontradas pelos pesquisadores foram condizentes com outros estudos realizados a respeito de micro-organismos isolados a partir de utensílios usados no preparo de fórmulas lácteas infantis, sendo as bactérias do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* os micro-organismos presentes em maior concentração (CHAP *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2015a).

2.3. *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*

Acinetobacter spp. são cocobacilos Gram-negativos que possuem importante posição na natureza devido a sua presença em ambientes distintos, como solos, água doce, oceanos, sedimentos e locais contaminados. Sua versatilidade metabólica permite que espécies deste gênero catabolizem grande variedade de compostos naturais, obtendo assim uma participação ativa no ciclo de nutrientes do ecossistema (JUNG & PARQUE, 2015; LEE *et al.*, 2017).

O gênero *Acinetobacter* pertence à família *Moraxellaceae*, que também inclui os gêneros *Moraxella* e *Psychrobacter*. Este gênero compreende mais de 50 espécies (LPSN, 2017), sendo as principais *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A.*

johnsonii, *A. junii*, e *A. Iwoffii*. *A. calcoaceticus*, *A. baumannii* e outras duas espécies. *A. pittii* e *A. nosocomialis*, estão intimamente relacionadas e são de difícil distinção através de propriedades fenotípicas. Desta forma, tem sido proposto o termo complexo *A. baumannii-calcoaceticus* (complexo ABC) para se referir a essas espécies (JOSHI e LITAKE, 2013).

Dentre as espécies de *Acinetobacter*, o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* envolve os membros mais associados a infecções hospitalares com alta taxa de mortalidade, devido a seus fatores de virulência, principalmente, à multirresistência a antibióticos como os do grupo dos carbapenemas (JUNG e PARQUE, 2015; LEE *et al.*, 2017). O complexo ABC possui importância ecológica e clínica, sendo considerado modelo para estudos microbiológicos ambientais, testes de patogenicidade e produção industrial de produtos químicos (JUNG e PARQUE, 2015; LEE *et al.*, 2017).

Apesar de ser considerado um patógeno de baixa relevância, *Acinetobacter baumannii* é responsável por cerca de 20% de infecções em unidades de terapia intensiva (UTI), podendo causar infecções na pele, trato urinário e bacteremia. Segundo a OMS, *A. baumannii* é um dos componentes mais perigosos do grupo ESKAPE (acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*). Os micro-organismos deste grupo conseguem escapar dos efeitos das drogas antibacterianas por apresentarem mecanismos de resistências aos antibióticos como, por exemplo, degradação enzimática das drogas e bombas de efluxo (LEE *et al.*, 2017).

Além da presença em infecções hospitalares, o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* é considerado um importante contaminante alimentar, sendo associado à contaminação de alimentos como maçãs, melões, couves, pimentas e tubérculos, como batata, e alguns cereais, incluindo também a presença deste micro-organismo em alimentos hospitalares, tais como fórmulas lácteas infantis (DOUGHARI *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2015a).

Alguns autores sugerem que a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por *Acinetobacter* em produtos lácteos contribuem para o sabor, odor e textura dos produtos. Entretanto, alguns pesquisadores descrevem esta espécie apenas como possível agente patogênico (DOUGHARI *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2015a; AMORIM e NASCIMENTO, 2017).

Ao contrário dos patógenos clássicos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos como *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, o gênero *Acinetobacter* raramente é associado à doença diarreica, uma vez que sua presença, quando detectada no trato gastrointestinal, é geralmente

ofuscada por agentes patogênicos mais comuns. Em relação a sua natureza competitiva, estudos realizados a partir de amostras comerciais de queijo minas frescal demonstraram que quatro cepas potencialmente patogênicas do complexo ABC são capazes de produzir substâncias antimicrobianas ativas contra *Escherichia coli* e *Samonella enterica*, tornando, assim, relevante os estudos voltados para a presença de *Acinetobacter* em alimentos vegetais e animais, e sua possível utilização como agentes com atuação antimicrobiana (AMORIM e NASCIMENTO, 2017).

2.4. SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Várias espécies bacterianas são capazes de degradar componentes do leite, afetando o rendimento do produto e contribuindo para a diminuição do seu tempo de prateleira. Além de estarem associados à contaminação de produtos lácteos, os micro-organismos podem ocasionar diversas implicações negativas para a saúde de crianças e adultos. A utilização de muitos aditivos químicos nos alimentos também vem gerando preocupação devido a toxicidade (YANG *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2015).

Atualmente a sociedade é mais consciente da importância da segurança alimentar e busca, através de recursos naturais, benefícios para a saúde alimentar aumentando assim o consumo de alimentos naturais e sem aditivos químicos. No entanto, a maioria dos conservantes e antibióticos disponíveis comercialmente são produzidos por síntese química e o uso exagerado a longo prazo pode afetar a saúde humana (ZHOU *et al.*, 2015).

O uso excessivo de antibióticos e as mudanças nas condições ambientais permitiram que os micro-organismos evoluíssem sendo capazes de alterar sua estrutura celular tornando-se resistentes a diversos antibióticos, além do risco eminente de causar doenças infecciosas através da contaminação de alimentos. Além disso, o controle sanitário de tais micro-organismos se tornou mais difícil devido a multirresistência (MANEGUETTI *et al.*, 2016).

Ao contrário dos conservantes e dos antibióticos, a utilização de aditivos antagonistas com propriedades antimicrobianas tem se tornado uma potente arma na preservação de alimentos. Dentre eles destacam-se as substâncias antimicrobianas (SAM) que geralmente são substâncias naturais, semissintética ou sintéticas capazes de retardar ou inibir o crescimento e reprodução dos micro-organismos ou até mesmo causar a sua morte (ZHOU *et al.*, 2015).

Existem muitas substâncias antimicrobianas sendo produzidos por animais, plantas, insetos e bactérias como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio, os ácidos graxos, ácidos orgânicos, antibióticos e as bacteriocinas. As bacteriocinas são

peptídeos antimicrobianos ou proteínas produzidas por bactérias consideradas como um sistema de defesa bacteriano, pois permitem a redução de seus concorrentes na obtenção de nutrientes e espaço vivo nos ambientes (YANG *et al.*, 2014).

2.5. BACTERIOCINAS

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antimicrobianas sintetizados nos ribossomos das células bacterianas e liberadas para o meio extracelular e que possuem ação bactericida ou bacteriostática sobre os micro-organismos (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A produção de bacteriocinas envolve a expressão de diferentes genes localizados no cromossomo ou em plasmídeos, os quais participam na modificação de aminoácidos, exportação e regulação da bacteriocina. As bactérias produtoras de bacteriocinas geralmente sintetizam proteínas que lhes conferem imunidade contra suas próprias bacteriocinas impedindo que as mesmas sejam ativas dentro da célula bacteriana (LAGHA *et al.*, 2017).

Embora muitas bacteriocinas tenham um espectro de ação limitado inibindo o crescimento de espécies bacterianas semelhantes ou estritamente relacionadas, outras, porém apresentam atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de gêneros bacterianos (LAGHA *et al.*, 2017). A bacteriocina para ser considerada um agente antimicrobiano ideal precisa ser potente em baixas concentrações e ser ativa contra uma gama de micro-organismos patogênicos e deteriorantes ou ser altamente específica sobre um deles, além de ter efeito benéfico sobre o produto e principalmente não apresentar risco ao consumidor. Estes agentes podem ser introduzidos em alimentos através da adição de espécies produtoras de bacteriocinas ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (O'CONNOR *et al.*, 2015).

As primeiras bacteriocinas descritas foram as colicinas no ano de 1925 por André Gratia, sendo ativas contra a espécie bacteriana *Escherichia coli*. Com a descoberta de que a produção desses compostos não era restrita ao grupo dos coliformes, o pesquisador Jacob e colaboradores propuseram em 1953 o termo bacteriocina para as proteínas antimicrobianas produzidas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

2.5.1 Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas

Dentre as bactérias Gram-positivas produtoras de SAM estão às bactérias ácido-láticas, que produzem bacteriocinas diferenciadas por seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. As bacteriocinas

ácido-láticas são classificadas através da sua estrutura celular, peso molecular, estabilidade ao calor e organização molecular em três classes diferentes (BALSUNAS *et al.*, 2013).

A primeira classe também conhecida por lantibióticos é composta por pequenos peptídeos de 19 a 50 aminoácidos e massa molecular inferior a 5 kDa, os peptídeos são lineares ou globulares modificados pós-tradução, contendo lantionina e β -metil-lantionina. A segunda classe é composta por peptídeos termoestáveis de 20 a 60 aminoácidos sem modificação pós-tradução e massa molecular inferior a 10 kDa, sendo estes subdivididos em 3 classes IIa, IIb e IIc, sendo a primeira ativa contra a *Listeria monocytogenes*. Por fim, a terceira classe compreende as proteínas grandes e termolábeis (YANG *et al.*, 2014; PRUDÊNCIO *et al.*, 2015). Alguns exemplos de bacteriocinas estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas

| Classificação | Características | Subcategorias | Exemplos |
|---------------------------|--|---|--|
| Classe I ou Lantibióticos | Peptídeos contendo lantionina ou β -metil-lantionina | Tipo A (Moléculas Lineares) Tipo B (Moléculas Globulares) | Nisina, Subtilina, Epidermina Mersacidina |
| Classe II | Classe heterogênea de pequenos peptídeos termoestáveis. | Subclasse IIa (bacteriocinas anti- <i>Listeria</i> tipo pediocina) Subclasse IIb (composto por dois peptídeos) Subclasse IIc (outras bacteriocinas) | Pediocina, Enterocina, Sakacina Plantaricina, F Lactacina Lactococcina |
| Classe III | Peptídeos termolábeis extremamente sensíveis ao calor e de alto peso molecular | - | Helveticina J, Milericina B |

Fonte: Adaptado de Balsiunas *et al.*, 2013

A síntese de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas geralmente envolve quatro genes distintos, sendo o primeiro responsável pela síntese do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina na forma inativa; o segundo é responsável pela síntese de uma proteína de imunidade; o terceiro codifica proteínas do transporte ABC que exportam a bacteriocina para fora da célula e por último o quarto gene que tem

sua função pouco conhecida, mas estudos indicam que ele codifica uma proteína acessória necessária para a exportação da bacteriocina (DRECHSEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

As bacteriocinas são sintetizadas como pré-peptídeos ou pré-bacteriocinas biologicamente inativos. Estes pré-peptídeos possuem uma sequência guia N-terminal de aminoácidos com duas glicinas. Esta sequência tem a função de evitar que a bacteriocina seja biologicamente ativa dentro da célula produtora e serve como sinal de reconhecimento para o sistema de transporte que envolve as proteínas de transporte tipo ABC e a proteína acessória. Este precursor é transportado para a superfície celular durante a fase de crescimento exponencial e catalisado na forma ativa. O transportador contém uma porção proteolítica N-terminal responsável pela clivagem do peptídeo guia, além de uma porção C-terminal responsável pelo fornecimento de energia através da hidrólise de ATP. Após o reconhecimento do pré-peptídeo, a sequência de aminoácidos é removida e a bacteriocina é excretada da célula (DRECHSEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014). O sistema de regulação da produção de bacteriocinas ocorre através da produção ribossomal de um pré-peptídeo indutor (fator de ativação) que é clivado e secretado no meio externo pelo transportador ABC. Quando este atinge uma certa concentração no meio extracelular, a histidina quinase transmembranar (receptora do fator de ativação) é ativada fosforilando assim a proteína reguladora de resposta. A proteína reguladora, uma vez fosforilada, ativa a transcrição da bacteriocina iniciando assim um feedback positivo. Na **Figura 2** está a representação da biossíntese e regulação da bacteriocina classe II.

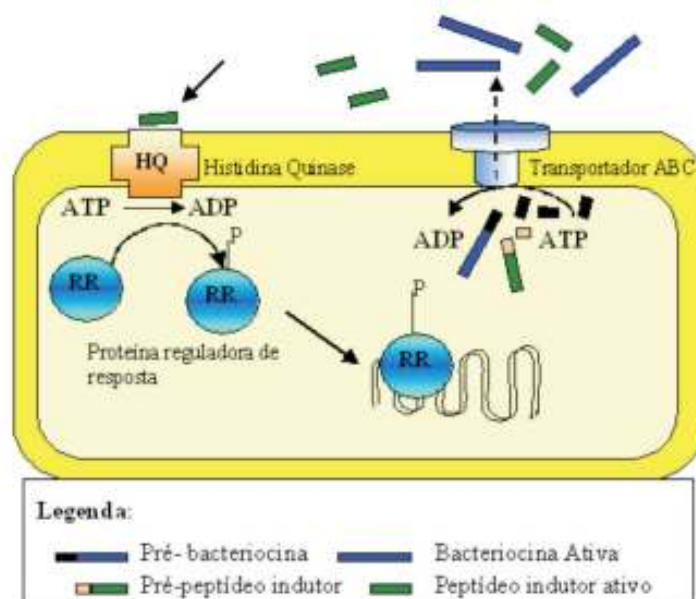


Figura 2: Representação esquemática da biossíntese e regulação da bacteriocina da classe II (Adaptado de DRECHSEL *et al.*, 2011).

As bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas, como os lantibióticos, atuam em nível de membrana plasmática. Estas bacteriocinas permeabilizam a membrana plasmática por meio da formação de poros, ocasionando assim desbalanço iônico (DRECHSEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

Atualmente, apenas dois tipos de bacteriocinas são utilizados comercialmente como conservantes de alimentos, a nisina, produzida pela espécie *Lactococcus lactis* usada comercialmente há 50 anos, e a carnociclina A, uma bacteriocina em formato circular produzida pela *Carnobacterium maltaromaticum* UAL 307, empregada na inibição da bactéria *Listeria monocytogenes* (O'CONNOR *et al.*, 2015).

A nisina, por exemplo, é considerada pelo *Codex Alimentarius* e pela Comissão FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentos) como uma substância segura (*substances generally recognized as safe* - GRAS) e pode ser usada como aditivo alimentar na inibição de *Clostridium botulinum* no processamento do queijo pasteurizado (BALCIUNAS *et al.*, 2013).

As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas são tolerantes ao estresse térmico e possuem atividade sobre ampla faixa de pH, além de se apresentarem como incolores, inodoras e insípidas, o que aumenta sua utilidade potencial em alimentos (PEREZ *et al.*, 2014).

Uma vez que o uso de antibióticos em alimentos é ilegal, as bacteriocinas se tornam um substituto natural. Elas são inativas por enzimas presentes no trato gastrointestinal humano, como a tripsina e a pepsina, fazendo com que os fragmentos das bacteriocinas não permaneçam por muito tempo no corpo humano e, portanto, não alteram a microbiota do trato digestório (BALCIUNAS *et al.*, 2013; PEREZ *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação e resistência de antibióticos e bacteriocinas são diferentes. Geralmente as bacteriocinas apresentam uma forte atividade contra as cepas alvo, muitas vezes na faixa nanomolar, o que as tornam mais potentes que os antibióticos em certos casos. Outra vantagem das bacteriocinas em relação aos antibióticos convencionais está na toxicidade, uma vez que as bacteriocinas não apresentam efeitos tóxicos às células eucariotas. As principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos convencionais estão resumidas na **Tabela 3** (PEREZ *et al.*, 2014).

Tabela 3: Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos convencionais.

| Característica | Bacteriocinas | Antibióticos |
|---|---|--|
| Aplicação | Alimentos/Clínica | Clínica |
| Síntese | Ribossomal | Metabólito Secundário |
| Espectros de Bioatividade | Estreito | Amplo |
| Intensidade da Bioatividade | Ativo na escala nanomolar a micromolar | Ativo na faixa de micromolar a milimolar |
| Degradação a enzima proteolítica | Alto | Baixo |
| Estabilidade Térmica | Alta | Baixa |
| Faixa de pH | Ampla Atividade | Atividade Restrita |
| Possível mecanismo de resistência ao desenvolvimento das células alvo | Adaptação através de mudanças na composição da membrana celular | Determinante geneticamente transferível que inativa o composto ativo |
| Modo de ação | Adaptação através de mudanças na composição da membrana celular | Membrana celular ou alvos intercelulares |
| Toxicidade para células eucarióticas | Relativamente não | Sim |

Fonte: Adaptado de PEREZ *et al.*, 2014.

Portanto, o uso das bacteriocinas pode contribuir na redução de aditivos químicos em alimentos, diminuindo a intensidade das suas técnicas de processamento, auxiliando assim na produção de alimentos mais saudáveis e na área médica, as bacteriocinas contribuem como uma alternativa viável aos antibióticos devido à sua atividade contra patógenos clínicos incluindo micro-organismos resistentes e multirresistentes a antibióticos (MDR) (ABBASILIASI *et al.*, 2012; PEREZ *et al.*, 2014).

2.5.2 Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas

Embora bactérias Gram-negativas sejam capazes de produzir bacteriocinas, a grande maioria das bacteriocinas já caracterizadas é produzida por espécies Gram-positivas. Um banco de dados sobre bacteriocina (BACTIBASE) contém 177 sequências de peptídicas, das quais 156 são produzidas por bactérias Gram-positivas e oito de bactérias Gram-negativas (LAGHA *et al.*, 2017).

Pesquisas realizadas com as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* revelaram níveis de produção de bacteriocina em 3 a 26% dos isolados ambientais (GILLOR *et al.*, 2009). Geralmente as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas possuem alto peso molecular, porém, seu tamanho varia de cerca de 10kDa a 20 kDa (DRECHSEL *et al.*, 2011).

As colicinas produzidas por *Escherichia coli* são as bacteriocinas Gram-negativas mais amplamente estudadas e servem de modelo na investigação dos mecanismos de estrutura, função, organização genética e evolução de outras bacteriocinas (GILLOR *et al.*, 2009). As colicinas são proteínas antibacterianas capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias relacionadas filogeneticamente com a espécie produtora *Escherichia coli* e o gênero *Salmonella* (DIMOV *et al.*, 2005; DRECHSEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

Normalmente os genes das colicinas são localizados em plasmídeos e seu espectro de ação é limitado a cepas bacterianas sensíveis que possuem proteínas específicas no receptor da membrana externa. As colicinas se ligam aos receptores bacterianos cuja função primária é muitas vezes facilitar a absorção de nutrientes e depois são translocadas para a superfície externa da membrana citoplasmática onde podem formar poros na membrana, como, por exemplo, a colicina E1. Ou podem atuar de forma menos frequente como uma endonuclease, atuando diretamente contra o DNA cromossomal da célula alvo. A colicina também pode atuar degradando a parede celular e inibindo a síntese de peptideoglicanos (DIMOV *et al.*, 2005; DRECHSEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

Em resumo, o modo de ação das colicinas inclui as seguintes etapas:

- (I) Anexação da molécula de colicina a receptor específico na membrana celular externa;
- (II) Translocação através da membrana;
- (III) Interação letal com uma molécula alvo específica ou com alguma estrutura dentro da célula bacteriana.

As diferenças entre todos os tipos de colicinas estão nestas três etapas básicas. Para evitar os danos causados pelas colicinas produzidas, a espécie produtora consegue sintetizar simultaneamente proteínas específicas de imunidade que atuam inativando as colicinas (DIMOV *et al.*, 2005; DRECHSEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

Além das colicinas, *E. coli* produz um segundo tipo de bacteriocina conhecido como microcina, sendo estas menores que as colicinas. A microcina apresenta semelhanças com as bacteriocinas Gram-positivas, tais como a termosensibilidade, resistência a algumas proteases, hidrofobicidade relativa e resistência ao pH extremo (GILLOR *et al.*, 2009). Os mecanismos de ação das microcinas são diversos, incluindo a formação de poros na membrana, atividade de nuclease e inibição da síntese protéica ou replicação do DNA (YANG *et al.*, 2014).

Em relação a sua ação contra os micro-organismos, as bacteriocinas apresentam melhor eficácia na inibição de bactérias Gram-positivas do que em bactérias Gram-negativas, o que ocorre devido à composição da membrana externa destes micro-organismos, que atua como uma barreira efetiva. No entanto, experimentos já demonstraram que alguns agentes como o EDTA ou certos tratamentos podem desestabilizar a membrana externa permitindo, assim, que as bacteriocinas atuem em bactérias Gram-negativas (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PRUDÊNCIO *et al.*, 2015).

Alguns agentes infecciosos Gram-negativos como *Aeromonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* e *Pseudomonas* são dificilmente inibidos por bacteriocinas Gram-positivas, podendo, inclusive, carrear genes de resistência a antibióticos, tornando o tratamento, nestes casos, ainda mais difícil (FLEMING *et al.*, 2011; FLEMING, NASCIMENTO & BOLZAN, 2010). As bactérias Gram-negativas que colonizam os alimentos são de extrema importância devido aos efeitos que ocasionam nos mesmos e nos consumidores destes produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Tais fatos tornam ainda mais relevantes estudos que busquem cada vez mais avaliar a utilização de peptídeos antimicrobianos na inibição de micro-organismos patogênicos alimentares.

2.6 BACTERIOCINAS E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES

Devido à ampla diversidade de bacteriocinas, que se diferenciam por sua origem, produção e mecanismo de ação, a classificação desse grupo de substâncias acaba ocorrendo de forma autônoma. Alguns pesquisadores preferem separar as bacteriocinas em “bacteriocinas verdadeiras” como as colicinas e em bacteriocinas

semelhantes às colicinas, também conhecidas como “substâncias inibitórias do tipo bacteriocina” ou BLIS (*bacteriocin-like inhibitory substance*) (CHIKINDAS *et al.*, 2017).

As bacteriocinas possuem como função primária o controle de bactérias concorrentes na busca de nutrientes e de espaço em um nicho biológico (EGAN *et al.*, 2016; CHIKINDAS *et al.*, 2017). Quando utilizada em grandes concentrações, algumas bacteriocinas apresentam uma variedade de funções das quais sua atividade antimicrobiana é a mais estudada (CHIKINDAS *et al.*, 2017).

Embora a aplicação primária das bacteriocinas tenha sido inicialmente voltada para a preservação de alimentos, com o aumento na resistência aos antibióticos convencionais houve um crescimento nas aplicações de bacteriocinas em produtos de saúde. Desta forma, as bacteriocinas ganharam novas aplicabilidades além da preservação de alimentos, como seu uso na inibição de patógenos causadores de doenças em animais, na indústria farmacêutica e bem como no tratamento de doenças em humanos (YANG *et al.*, 2014; CHIKINDAS *et al.*, 2017).

Na indústria alimentar as bacteriocinas isoladas ou em combinação com outros métodos de preservação têm um enorme potencial na biopreservação de alimentos. A adição de bacteriocinas em alimentos já ocorre naturalmente e legalmente como é o caso da nisina, considerada como uma substância segura pela FAO, sendo a primeira bacteriocina usada na conservação de alimentos (LAGHA *et al.*, 2017). As bacteriocinas podem ser adicionadas aos alimentos de três formas:

- Pela inoculação de alimentos com estirpe produtora de bacteriocina;
- Pela adição de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas como conservantes;
- Através do uso de um produto previamente fermentado com uma estirpe produtora de bacteriocina como ingrediente no processamento de alimentos.

Na **Figura 3**, estão apresentados alguns exemplos da aplicação de bacteriocinas em alimentos.

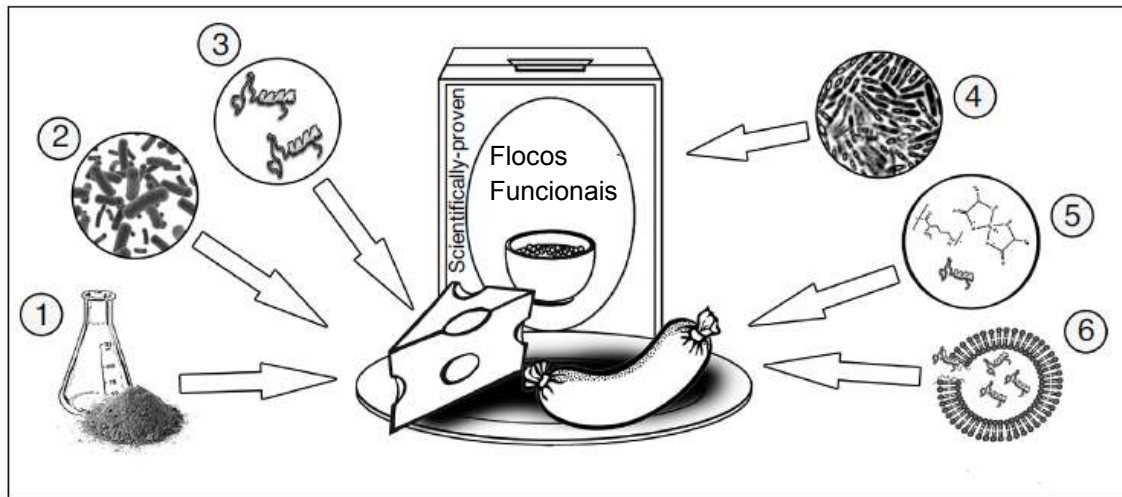


Figura 3: Bacteriocinas: do uso simples às aplicações específicas. 1 - Leite ou outro fermentado contendo bacteriocina; 2 - Cultura microbiana produtora de bacteriocina; 3 - bacteriocina parcialmente purificada; 4 - Cultura probiótica produtora de bacteriocina; 5 - Ação sinérgica entre bacteriocina e antimicrobianos naturais; 6 - Implementação de sistemas de entrega controlada para maior estabilidade e eficácia de bacteriocinas (Adaptado de CHIKINDAS *et al.*, 2017).

Embora a aplicação das bacteriocinas em sua forma purificada seja a abordagem mais comumente utilizada na conservação de alimentos, a inoculação de bactérias ácido-lácticas produtoras de bacteriocinas também se mostrou eficaz no sistema alimentar (PEREZ *et al.*, 2014). Em estudos realizados com *Nham* (uma linguiça de porco fermentada tailandesa), a bactéria *Pediococcus pentosaceus*, produtora da pediocina PA-I/AcH, foi utilizada como cultura iniciadora e demonstrou um controle efetivo no crescimento de *Listeria monocytogenes* sem comprometer a qualidade da linguiça. A pediocina PA-I/AcH também mostrou ser efetiva no controle do crescimento de *L. monocytogenes* quando incorporada à biocomposição de embalagens usadas em carne (PEREZ *et al.*, 2014).

Em produtos lácteos normalmente associados a contaminação de micro-organismos patogênicos, houve um aumento no uso das bacteriocinas com intuito de inibir o crescimento destes patógenos. Em pesquisas realizadas com a nisina e pediocina, foi demonstrada a ação efetiva dessas bacteriocinas na inibição e na redução das contagens de micro-organismos como a bactéria *L. monocytogenes* em produtos lácteos, principalmente em queijos pasteurizados. Estes dados configuram uma importante alternativa de controle, uma vez que esse patógeno apresenta resistência a antibióticos e está, geralmente, associado à contaminação de produtos alimentícios refrigerados prontos para consumo (PEREZ *et al.*, 2014; LAGHA *et al.*, 2017,).

Na indústria farmacêutica o potencial clínico das bacteriocinas vem ganhando destaque devido a inúmeras pesquisas realizadas sobre a atividade de algumas bacteriocinas contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos em humanos e animais, incluindo agentes patogênicos multirresistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistentes à *meticilina* (MRSA) e *Enterococcus faecalis* resistentes à *vancomicina* (VRE) (PEREZ *et al.*, 2014).

Phuminsantiphong e colaboradores realizaram pesquisas com o objetivo de identificar e caracterizar bacteriocinas ativas contra VRE e *Enterococcus* multirresistentes a antibióticos (MDRE), sendo eles *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* associados a infecções hospitalares do trato urinário, pneumonia, endocardite, bacteremia e meningite. Neste estudo, a estirpe *E. faecalis* 478 isolada de fezes humanas produziu atividade antimicrobiana contra várias estirpes MDRE e VRE, sendo a produção da bacteriocina em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 37° C em pH entre 5 e 6 consideradas as melhores condições para sua produção (PHUMINSANTIPHONG *et al.*, 2017).

A utilização de bacteriocinas em tratamentos terapêuticos também vem sendo realizada na terapia do câncer, onde estudos indicaram que as bacteriocinas demonstram atividade contra células tumorais. A colicina A e E1 que atuam na formação de poros na membrana celular conseguem inibir o crescimento de uma linha de fibroblasto padrão humano MRC5 e onze linhas de células tumorais humanas, sendo consideradas possíveis candidatas a fármacos antitumorais (CHUMCHALOVÁ e SMARDA, 2003; YANG *et al.*, 2014).

Com o aumento nos estudos sobre as bacteriocinas em alimentos e na clínica, algumas pesquisas relataram o efeito destas bacteriocinas em conjunto com outra substâncias antimicrobianas naturais, como óleos essenciais e antibióticos. Em 2008, Sivarooban e colaboradores determinaram o efeito sinérgico da nisina (quando em combinação com os compostos fenólicos extraídos do chá verde) e da semente de uva, mostrando serem efetivos contra a bactéria *L. monocytogenes*, resultando em dano celular e diminuição nos níveis bacterianos (SIVAROOBAN *et al.*, 2008; MATHUR *et al.*, 2017).

Outra opção possível foi a combinação sinérgica entre bacteriocinas e antibióticos. Estudos realizados por Naghmouchi e colaboradores em 2012 determinaram o efeito sinérgico de bacteriocinas e antibióticos em cepas sensíveis e resistentes. Observaram assim seus efeitos contra a bactéria *Pseudomonas fluorescens* em 90% das combinações entre bacteriocinas ácido-láticas da classe I e subclasse IIa com antibióticos e cerca de 60% de combinações entre colicinas e antibióticos. Esta combinação sinérgica entre antibióticos e peptídeos antimicrobianos

pode ser usada na redução do uso de antibióticos, auxiliando também na prevenção de bactérias resistentes aos mesmos (NAGMOUCHI *et al.*, 2012; BALCIUNAS *et al.*, 2013).

2.6.1 Bacteriocinas e BLIS produzidas por bactérias Gram-negativas ativas contra patógenos alimentares (Estudos realizados no IFRJ)

Em um trabalho realizado por Fleming e colaboradores com amostras de saladas, queijo e produtos cárneos comercializados na cidade do Rio de Janeiro, foram identificados 44 estirpes bacterianas Gram-negativas sendo a maioria pertencentes ao grupo dos coliformes. Estas estirpes foram identificadas e testadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas onde duas estirpes (4,5%) *Klebsiella ozaenae* e *Raoultella terrigena* mostraram-se efetivas na inibição de patógenos alimentares como a *Escherichia coli* e *Salmonella*, além das bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus xylosus* ((FLEMING *et al.*, 2010).

As substâncias antimicrobianas produzidas por *K. ozaenae* foram sensíveis as três enzimas proteolíticas utilizadas, enquanto a produzida por *R. terrigena* foi sensível a apenas duas das enzimas testadas, sugerindo assim que estas substâncias possam ser bacteriocinas típicas (FLEMING *et al.*, 2010). Em continuidade a este trabalho nosso grupo verificou as melhores condições para a produção da klebicina K e da raoultelina L, uma vez que estudos relataram que a produção de bacteriocinas é dependente das condições de cultura, como composição do meio, pH, temperatura e atmosfera. Os resultados mostraram que a produção da klebicin K e da raoultelina L foi estável em relação aos fatores ambientais mais comuns testados, sendo estes dados importantes para a avaliação do potencial dessas SAM, bem como constituíram o primeiro passo para a sua purificação (FLEMING *et al.*, 2011).

Em 2013, nosso grupo realizou experimentos com a bacteriocina EC2, produzida por *Escherichia coli*, e sua interferência no crescimento de patógenos em matriz de leite, mostrando que seus espectros de ação foram diversificados, embora tenha exercido ação principalmente contra a espécie *E. coli*, incluindo estirpes resistentes a antibióticos. A SAM EC2 foi sensível a todas as três enzimas proteolíticas testadas neste estudo, indicando a sua natureza protéica, o que a caracteriza como uma bacteriocina típica. Os testes realizados com a bacteriocina EC2 e a indicadora *Samonella entérica* na matriz de leite, mostraram que nas primeiras quatro horas a bacteriocina conseguia inibir o crescimento da indicadora sugerindo sua potencial aplicação no controle de *Salmonella* em alimentos (LOPES *et al.*, 2013).

Em 2015 nosso grupo verificou a resistência a antibióticos e a produção de substâncias antimicrobianas de quinze isolados bacterianos Gram-negativos advindos de amostras de queijo minas frescal. Segundo os resultados, os quinze isolados, sendo três representantes do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, foram capazes de produzir substâncias antimicrobianas contra *Escherichia coli* e *Salmonella entérica*. Este foi o primeiro relato sobre a produção de SAM por este grupo bacteriano, o que demonstra que as substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias patogênicas podem ter aplicações contra outros agentes patogênicos transmitidos por alimentos (DAMACENO *et al.*, 2015).

Devido a este fato, surge a importância do estudo de substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias Gram-negativas que sejam ativas contra micro-organismos patogênicos alimentares. Neste contexto, o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* se destaca devido sua concentração em fórmulas lácteas infantis ser maior quando comparada a de patógenos clássicos normalmente encontrados em tais alimentos, o que sugere que este complexo microbiano seja capaz de produzir substâncias antimicrobianas importantes para a inibição de patógenos bacterianos alimentares.

3. JUSTIFICATIVA

A alimentação apropriada para crianças até os dois anos de idade é fundamental para promover o seu crescimento e desenvolvimento. Até os seis meses de vida, o leite materno deve ser a única fonte alimentar, pois sozinho é capaz de nutrir e auxiliar na proteção contra doenças. Entretanto, por diversos motivos como doenças, cirurgias mamárias, entre outros, a prática da amamentação se torna inviável. Neste caso, é usado como alimento e suplementação alimentar as fórmulas lácteas infantis (SILVA *et al.*, 2010).

Segundo pesquisadores a fabricação comercial de fórmulas lácteas infantis estéreis nem sempre é possível de ser realizada usando a metodologia de processamento manual. Com isso, o risco eminente de contaminação destes alimentos pode causar infecções em crianças e recém-nascidos através do consumo dos mesmos (ARSALAN *et al.*, 2013a).

Em trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo, visando a detecção de *Salmonella* sp. em FLI e utensílios utilizados em seu preparo, oriundos de um hospital municipal do Rio de Janeiro, outros patógenos Gram-negativos, diferentes de *Salmonella*, foram encontrados, sendo muitos deles, resistentes e multirresistentes a antibióticos (MORAES *et al.*, 2015a; ARAÚJO *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2015b). Dada a importância da contaminação de FLI e de utensílios por tais patógenos, tornou-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que busquem alternativas para a redução ou eliminação dessa contaminação.

Uma dessas alternativas poderia ser a utilização de SAM naturais. Portanto, neste estudo, tem por finalidade a detecção e a caracterização de SAM produzidas por bactérias Gram-negativas isoladas de FLI e de utensílios usados em seu preparo e distribuição, a fim de identificar alguma SAM que possa ter potencial de aplicação na conservação e/ou prevenção da contaminação de alimentos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de substâncias antimicrobianas por bactérias Gram-negativas associadas a fórmulas lácteas infantis e utensílios provenientes de um hospital municipal do Rio de Janeiro.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a produção de substâncias antimicrobianas por isolados Gram-negativos obtidos a partir de FLI e de utensílios utilizados em seu preparo, distribuição e armazenamento;
- Verificar o potencial de ação das substâncias antimicrobianas contra diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de referência;
- Determinar o potencial de ação das substâncias antimicrobianas que se mostrarem promissoras contra diferentes patógenos alimentares e contra estirpes do complexo ABC, *Enterobacter* sp. e *Shigella dysenteriae* resistentes e multirresistentes a antibióticos (MDR) isolados de alimentos lácteos;
- Analisar as características bioquímicas das substâncias antimicrobianas selecionadas;
- Avaliar as melhores condições de crescimento para a produção das substâncias antimicrobianas pelas bactérias produtoras;
- Obter uma preparação ativa das substâncias antimicrobianas promissoras através do sobrenadante das estirpes produtoras.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ISOLADOS BACTERIANOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Quarenta e cinco isolados bacterianos Gram-negativos obtidos em um trabalho anterior (MORAES, 2015), a partir de fórmulas lácteas infantis reconstituídas e de superfícies e utensílios utilizados em seu preparo, armazenamento e/ou distribuição em um hospital público do Rio de Janeiro, foram utilizados como produtoras nos testes para investigação da produção de SAM (**Tabela 4**).

Outras bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo potenciais patógenos associados a doenças transmitidas por alimentos, foram empregadas como indicadoras da produção de SAM e estão descritas na **Tabela 5**. Dentre elas, encontram-se quinze isolados do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e cinco isolados de *Shigella dysenteriae* oriundos de FLI e de utensílios utilizados em seu preparo e distribuição, e vinte e seis isolados (20 do gênero *Enterobacter*, 4 do complexo ABC, 1 *E. coli* e 1 *Klebsiella oxytoca*) oriundos de produtos lácteos comercializados, como queijos e leites.

Todos os micro-organismos foram cultivados em caldo Casoy (Himedia, São Paulo, Brasil) a 37° C por 18 h. Quando necessário, o meio foi suplementado com ágar 1,5% ou 0.6 % (ágar sólido e semissólido, respectivamente). Os estoques das culturas foram mantidos a -20 ° C em caldo Casoy contendo glicerol a 40% (p/v).

5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SAM PELAS ESTIRPES ISOLADAS

Este método foi realizado conforme descrito por Nascimento (2004), com algumas modificações. As 45 estirpes bacterianas foram crescidas em meio ágar Casoy a 37°C por 18 h. Após a incubação, as culturas foram inoculadas sob a forma de pontos na superfície do meio. Após incubação por 18 h a 37°C, as bactérias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio por 30 min e, após a evaporação deste, foram vertidos 10 mL de meio Casoy semissólido acrescido de alíquotas de 1,0 mL das estirpes indicadoras apresentadas na Tabela 5 (previamente crescidas por 18 h a 37°C, em 10 mL de caldo Casoy). Posteriormente, as placas foram reincubadas a 37°C por 18 h e a produção de substância antimicrobiana (SAM) foi indicada pelas zonas de inibição ao redor dos pontos de crescimento das estirpes produtoras, conforme ilustrado na **Figura 4**.

Tabela 4: Bactérias Gram-negativas utilizadas neste trabalho para investigação da produção de SAM

| Isolados | Fonte |
|---|------------------------------|
| <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | |
| JE2 | Jarra de preparo |
| JE3 | Jarra de preparo |
| JE4 | Jarra de preparo |
| JE5 | Jarra de preparo |
| JE6 | Jarra de preparo |
| JE7 | Jarra de preparo |
| JR1 | Jarra de preparo |
| JR2 | Jarra de preparo |
| JR3 | Jarra de preparo |
| JR4 | Jarra de preparo |
| JR5 | Jarra de preparo |
| JR6 | Jarra de preparo |
| ME2 | Mamadeira |
| MR1 | Mamadeira |
| AE1 | Fórmula láctea reconstituída |
| PR1 | Fórmula láctea reconstituída |
| PR2 | Fórmula láctea reconstituída |
| <i>Hafnia alvei</i> | |
| JE1 | Jarra de preparo |
| JE7 | Jarra de preparo |
| BIR1 | Bico de mamadeira |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | |
| BA1 | Bandeja |
| BA5 | Bandeja |
| BA6 | Bandeja |
| BA7 | Bandeja |
| BIE1 | Bico de mamadeira |
| BIE2 | Bico de mamadeira |
| BIE3 | Bico de mamadeira |
| BIE5 | Bico de mamadeira |
| BIE7 | Bico de mamadeira |
| BIE8 | Bico de mamadeira |
| BIR4 | Bico de mamadeira |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | |
| BA8 | Bandeja |
| <i>Escherichia vulneris</i> | |
| BA2 | Bandeja |
| BA4 | Bandeja |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | |
| ME1 | Mamadeira |
| ME3 | Mamadeira |
| ME4 | Mamadeira |
| ME5 | Mamadeira |
| BIR3 | Bico de mamadeira |
| <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> | |
| ALE2 | Fórmula láctea reconstituída |
| <i>Proteus mirabilis</i> | |
| ALE2 | Fórmula láctea reconstituída |
| <i>Ochrobacterium anthropi</i> | |
| ALR1 | Fórmula láctea reconstituída |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | |
| BIE4 | Bico de mamadeira |
| PR3 | Fórmula láctea reconstituída |

Fonte: Moraes (2015), Araújo e colaboradores (2015).

Tabela 5: Estirpes bacterianas utilizadas como indicadores da produção de SAM

| | Estirpe | Características relevantes para este trabalho | Referência |
|---|---|---|-------------------------------|
| Estirpes de referência | <i>Bacillus cereus</i> LMIFRJ | - | LMIFRJ |
| | <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 | - | ATCC |
| | <i>E. coli</i> LMIFRJ | - | LMIFRJ |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352 | - | ATCC |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | - | ATC |
| | <i>P. fluorescens</i> ATCC13525 | - | ATCC |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | - | LMIFRJ |
| | <i>P. vulgaris</i> | - | LMIFRJ |
| | <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhi ATCC19214 | - | ATCC |
| | <i>Serratia marcescens</i> | - | LMIFRJ |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC12600 | - | ATCC |
| <i>S. aureus</i> ATCC25923 | - | ATCC | |
| Isolados de FLI e utensílios utilizados em seu preparo e distribuição | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE2 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE3 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE4 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE5 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE8 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR1 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR2 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR3 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR4 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR6 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> ME2 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> MR1 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> AE1 | MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> PR1 | Não-MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> PR2 | Não-MDR | Araújo <i>et al.</i> , (2015) |
| | <i>Shigella dysenteriae</i> ME1 | MDR | Moraes <i>et al.</i> , (2015) |
| <i>Shigella dysenteriae</i> ME3 | MDR | Moraes <i>et al.</i> , (2015) | |
| <i>Shigella dysenteriae</i> ME4 | MDR | Moraes <i>et al.</i> , (2015) | |
| <i>Shigella dysenteriae</i> ME5 | MDR | Moraes <i>et al.</i> , (2015) | |
| <i>Shigella dysenteriae</i> BIR3 | Não-MDR | Moraes <i>et al.</i> , (2015) | |
| Isolados de produtos lácteos comercializados | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1C2 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1C3 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1L2 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1R1 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1R2 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1R4 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2E1 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2L1 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2M1 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2R2 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2R3 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q11 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q12 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q15 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q16 | Não-MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> E1 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> E2 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> E3 | MDR | Amorim <i>et al.</i> , (2016) |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V2.1 | MDR | Dados ainda não publicados |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V2.14 | MDR | Dados ainda não publicados |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V1.17 | MDR | Dados ainda não publicados |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V1.23 | MDR | Dados ainda não publicados |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> V1.9 | MDR | Dados ainda não publicados |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> V1.15 | MDR | Dados ainda não publicados | |
| <i>Escherichia coli</i> V1.4 | MDR | Dados ainda não publicados | |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> V1.27 | MDR | Dados ainda não publicados | |

ATCC, American Type Culture Collection; FLI, fórmulas lácteas infantis; LMIFRJ, Coleção do Laboratório de Microbiologia do IFRJ; MDR, *multidrug resistant* (multirresistente a drogas); não-MDR, isolados que expressam resistência a alguns antibióticos, porém, não são multirresistentes.

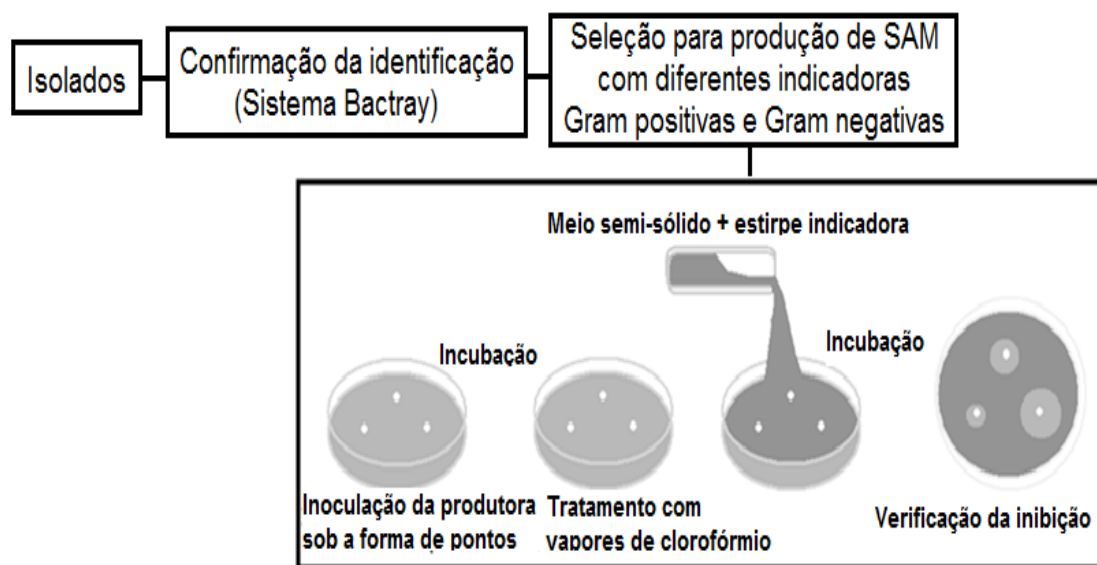


Figura 4: Esquema dos procedimentos realizados para a detecção da produção de substâncias antimicrobianas.

Apenas os isolados que se mostraram mais promissores, inibindo o maior número de estirpes indicadoras ou apresentando os maiores halos de inibição, foram submetidos aos experimentos subsequentes.

5.3. TESTE DE SENSIBILIDADE DAS SAM ÀS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E AO NaOH

Os testes para verificação da sensibilidade das SAM às enzimas proteolíticas e ao NaOH foram realizados de forma semelhante ao teste de produção de SAM, descrito no item 5.2.

As estirpes a serem testadas foram crescidas em forma de ponto, em quadruplicata, em meio ágar Casoy. Após o tratamento com vapores de clorofórmio, ao redor de cada crescimento, foram distribuídos 50 μL de NaOH a 0,2 N, 50 μL de tripsina (mg/mL^{-1}) e 50 μL de protease (mg/mL^{-1}). Um dos pontos foi utilizado como controle (sem tratamento). Posteriormente à incubação por 4 h a 37°C, foram vertidos sobre as placas 10 mL de meio Casoy semissólido acrescido de 1,0 mL da estirpe indicadora (previamente crescidas por 18 h a 37°C, em 10 mL de caldo Casoy) e novamente as placas foram incubadas por 18 h a 37°C.

A não observação de halo em torno do crescimento, onde foi adicionado o NaOH, indica a natureza ácida da substância produzida, enquanto que ausência de

halo de inibição em torno do crescimento, onde foram aplicadas as enzimas proteolíticas, sugere a natureza protéica da substância. Caso ocorresse a formação de halo em contato com as enzimas proteolíticas, a substância foi classificada como *BLIS* (*bacteriocin-like inhibitory substance*), uma substância inibitória do tipo bacteriocina.

5.4. INFLUÊNCIAS DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DE SAM.

Por apresentar o maior potencial de aplicação (expressando os maiores halos de inibição, inibindo o maior número de indicadoras e apresentando os resultados mais reprodutíveis), apenas o isolado JE6 foi utilizado neste e nos demais experimentos subsequentes.

A influência das condições de crescimento na produção da SAM produzida pelo isolado JE6 foi realizada conforme descrito por Fleming e colaboradores (2011). Para se avaliar o meio de cultura em que a produção de SAM fosse maior, os seguintes meios de cultura foram empregados: BHI (*Brain heart infusion*) (Merck), Muller-Hinton (Himedia), ágar Nutriente (Himedia), e ágar Casoy (Himedia).

A influência do pH inicial, da temperatura de crescimento e da presença de diferentes concentrações de NaCl na produção de SAM foram determinadas como descrito por Fleming e colaboradores (2011). As culturas produtoras foram crescidas em caldo Casoy e inoculadas, sob a forma de pontos, em placas contendo 25 mL do melhor meio para a produção da SAM, determinado anteriormente, e cujo pH foi ajustado para 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0, com NaOH 1N ou HCl 1N.

O efeito da temperatura foi analisado por incubação da estirpe produtora à temperatura ambiente de 27°C, à 37° e à 42°C. E para a determinação da influência do NaCl, a estirpe produtora foi crescida em meio de cultura contendo adições de NaCl nas concentrações de 0; 1,0; 2,0 e 3,0 % (p/v).

Para verificar a influência das condições de aeração, a cultura produtora foi inoculada a 37°C em anaerobiose. A atmosfera anaeróbica foi criada utilizando o sistema de geração de atmosfera AnaeroGen (Oxoid). A produção de SAM foi verificada como descrito no item 5.2. Para todos os testes, foram utilizadas como indicadoras as bactérias *B. cereus* LMIFRJ, *P. vulgaris* LMIFRJ e *S. enterica* ATCC19214. Na **Figura 5** ilustra os procedimentos mencionados acima.

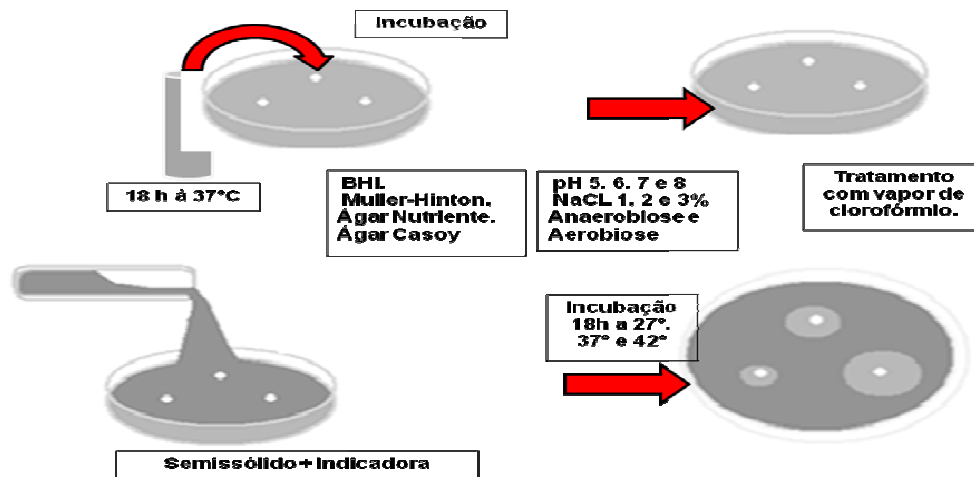


Figura 5: Esquema dos procedimentos realizados para verificar as melhores condições de crescimento para a produção de substâncias antimicrobianas.

5.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ESTIRPES RESISTENTES E MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS (MDR) PELO ISOLADO JE6

Este experimento foi realizado conforme descrito no item 5.2, utilizando-se como estirpes indicadoras, todos os isolados resistentes e multirresistentes a antibióticos apresentados na **Tabela 4**.

5.6. OBTENÇÃO DA SAM JE6 A PARTIR DO SOBRENADANTE DA CULTURA PRODUTORA

5.6.1. Obtenção direta a partir do sobrenadante

O isolado JE6 foi inoculado em 10 ml de Caldo Casoy em tubo falcon, por 18 h a 37°C. Posteriormente, foi realizada a centrifugação (CentriBio) por 10 min a 4.000 rpm. O sobrenadante foi coletado para um novo tubo e filtrado em membranas Millipore® com poros de 45µm. Em placas com ágar Casoy foram vertidos 10 mL de meio Casoy semissólido acrescidos de alíquotas de 1,0 mL das estirpes indicadoras (*B. cereus*, *P. vulgaris* e *S. enterica*, previamente crescidas por 18 h a 37°C, em 10 mL de caldo Casoy). Posteriormente à solidificação do meio semissólido, foram aplicados sobre a indicadora 50 µL do sobrenadante filtrado e as placas foram incubadas por 18h a 37°C.

5.6.2. Obtenção a partir da combinação de meio líquido com meio semissólido

A estirpe selecionada foi inoculada em 2 ml de Caldo Casoy em tubo falcon, por 18 h a 37°C. Posteriormente, a cultura foi adicionada em erlenmeyer contendo 20 mL de semissólido fundido e resfriado a aproximadamente 40°C. Após solidificação do meio foram acrescentados 20 mL de caldo casoy e o erlenmeyer foi incubado por 18 h a 37°C. Após a incubação, o caldo casoy com crescimento bacteriano foi retirado do erlenmeyer e adicionado a um tubo falcon de 15 mL estéril, que foi à centrifugação (CentriBio) por 10 min a 4.000 rpm. O sobrenadante foi coletado para um novo tubo e filtrado em membranas Millipore® com poros de 45µm. Em placas de ágar Casoy foram vertidos 10 mL de meio Casoy semissólido acrescidos de alíquotas de 1,0 mL de 3 estirpes indicadoras mais sensíveis (*B. cereus*, *P. vulgaris* e *S. enterica*, previamente crescidas por 18 h a 37°C, em 10 mL de caldo Casoy). Posteriormente à solidificação do semissólido, foram aplicados sobre a indicadora 50 µL do sobrenadante filtrado e as placas foram incubadas por 18h a 37°C.

5.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os parâmetros estudados foram analisados através do teste “One-way Anova”. A análise estatística foi realizada com o software “GraphPad Prism” versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA). Para todos os testes, adotou-se o nível de significância de 95% ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

O uso contínuo de antibióticos na agricultura contribuiu para o aumento de bactérias patogênicas resistentes aos medicamentos, dificultando ainda mais o controle destes contaminantes alimentares. Atualmente há uma busca crescente por agentes alternativos, como as substâncias antimicrobianas naturais produzidas por bactérias, que possam auxiliar no controle e inibição do crescimento destes patógenos alimentares (LAGHA *et al.*, 2017).

Neste trabalho, dos 45 isolados de utensílios de lactário avaliados, 31 (68%) foram capazes de produzir algum tipo de substância antimicrobiana contra pelo menos uma das bactérias utilizadas como indicadoras. Entretanto, cinco isolados denominados JE3, JE4, JE6, MR1 e BIE1 foram os mais promissores, sendo capazes de inibir patógenos alimentares como *Bacillus cereus* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, além de bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris*, conforme a **Tabela 6**. Exemplos da inibição de *P. vulgaris* e *B. cereus* pelo isolado JE6 estão apresentados na **Figura 6**.

O espectro de ação dos isolados produtores de SAM mostrou-se extremamente relevante para a indústria alimentícia porque *B. cereus* e *Salmonella* spp. estão no grupo das bactérias mais associadas a doenças transmitidas por alimentos no Brasil (SVS, 2016). Vale ressaltar, ainda, que a *Salmonella* é um dos principais patógenos alimentares responsáveis por mais de um milhão de casos de doenças transmitidas por alimentos anualmente nos Estados Unidos devido a sua constante contaminação de produtos de origem animal e produtos lácteos (LAGHA *et al.*, 2017).

Tabela 6: Produção de SAM por bactérias Gram-negativas isoladas de utensílios usados no preparo de fórmulas lácteas infantis.

| Identificação das produtoras | Origem | Isolados | Indicadoras inibidas |
|---|---|----------|---|
| Complexo <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | Jarros de preparo de FLI previamente lavados em água corrente | JE3 | <i>Proteus mirabilis</i> |
| | | JE4 | <i>Bacillus cereus</i> |
| | | JE6 | <i>Bacillus cereus</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Mamadeira | MR1 | <i>Bacillus cereus</i> |
| | Bico de Mamadeira | BIE1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |

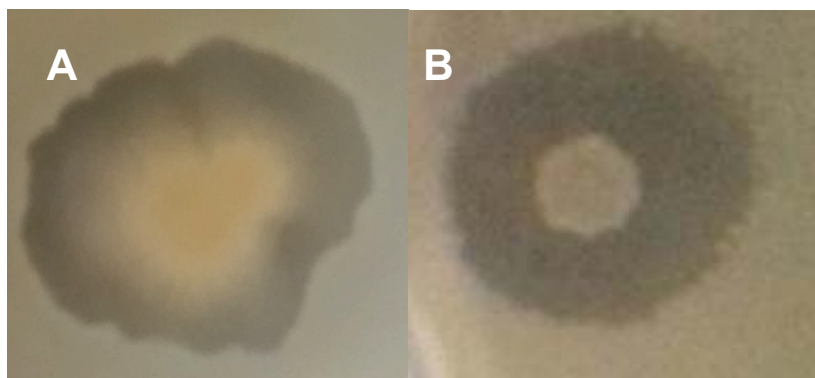


Figura 6: Produção de SAM pelo isolado JE6 contra (A) *Salmonella* Typhi e (B) *B. cereus*.

Além da inibição de *Salmonella* e de *Bacillus cereus*, vale ressaltar que alguns agentes infecciosos Gram-negativos encontrados em alimentos como, *Klebsiella* e *Proteus* podem carrear genes de resistência a antibióticos, tornando o tratamento nestes casos mais difícil. Estes agentes raramente são inibidos por bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas (FLEMING *et al.*, 2010; DAMACENO *et al.*, 2015).

Três dos cinco isolados mais promissores pertencem ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. Este resultado não é um fato isolado, uma vez que nos estudos realizados por Damaceno e colaboradores com queijo minas frescal foram identificadas duas estirpes do complexo ABC capazes de produzir substâncias antimicrobianas ativas contra *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* (DAMACENO *et al.*, 2015).

Dos cinco isolados produtores de SAM selecionados, JE6 foi o que apresentou os melhores resultados quanto à inibição de diferentes indicadores, e por este motivo ele foi selecionado para os testes subsequentes.

6.2. SENSIBILIDADE DA SAM JE6 A ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E AO NaOH

As bacteriocinas são substâncias de natureza protéica, geralmente sensíveis a pelo menos uma enzima proteolítica (ABBASILIASI *et al.*, 2012). Os ensaios realizados com as enzimas proteolíticas (protease e tripsina) para verificar se a SAM produzida pela estirpe JE6 possui natureza proteica indicaram que, independente da indicadora utilizada, não houve inibição da SAM pelo NaOH ou pelas enzimas protease e tripsina (**Figura 7**).

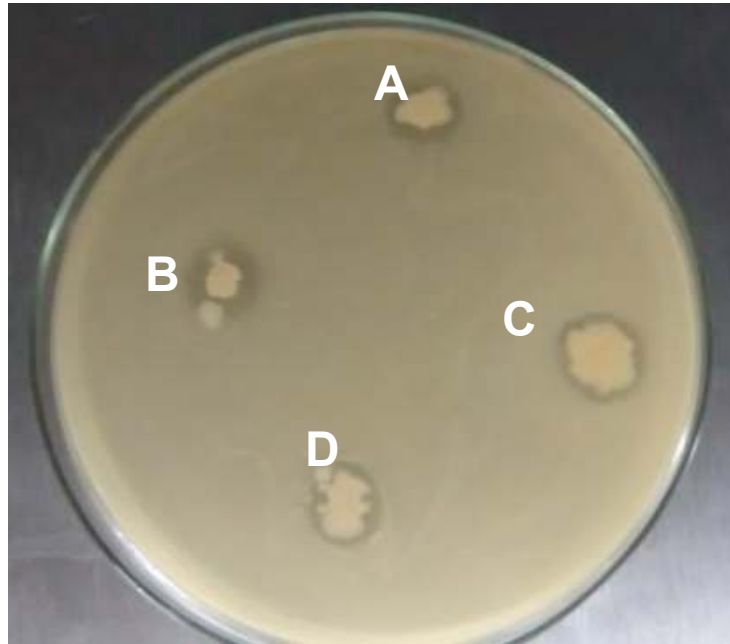


Figura 7: Sensibilidade a enzimas proteolíticas pelo isolado JE6 contra *B.cereus* (A) controle, (B) tratamento com protease, (C) tratamento com tripsina, (D) tratamento com NaOH.

Uma vez que a atividade da SAM produzida pelo isolado JE6 não foi afetada pelo NaOH, é possível afirmar que a mesma não está associada a produção de ácidos pela bactéria produtora. No entanto, o fato da SAM produzida não ter sido afetada pelas enzimas proteolíticas testadas sugere que a SAM não seja uma bacteriocina típica. Contudo, uma vez que existem bacteriocinas atípicas resistentes a enzimas proteolíticas, essa possibilidade não pode ser descartada, sendo assim a SAM produzida pelo isolado JE6 será tratada, então, como uma BLIS (“bacteriocin-like inhibitory substance” – substância inibitória do tipo bacteriocina).

A resistência de substâncias antimicrobianas a enzimas proteolíticas não é incomum. Estudos realizados com SAM produzidas por espécies de *Bacillus* demonstraram que estas são insensíveis a enzimas como proteinase K e tripsina. Esta estabilidade na presença de enzimas proteolíticas pode ocorrer devido a aminoácidos incomuns presentes na estrutura das bacteriocinas ou peptídeos cíclicos N-terminal ou protegidos em C-terminal (KORENBLUM *et al.*, 2005 ;KHALIL *et al.*, 2009; ABBASILIASI *et al.*, 2012).

Singh e colaboradores em 2012 realizaram pesquisas com um isolado de *Brevibacillus* sp., que demonstrou ser capaz de produzir BLIS com ampla estabilidade ao pH e à temperatura, e quando tratada com enzimas proteolíticas como proteinase K, tripsina, quimiotripsina e pepsina, não foi observada redução no efeito

antimicrobiano, também sendo considerada, portanto, resistente às enzimas proteolíticas (SINGH *et al.*, 2012).

6.3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SAM PELA ESTIRPE JE6

A produção de substâncias antimicrobianas pode ser favorecida por alguns fatores, tais como temperatura, pH e tempo de incubação. As condições ótimas de crescimento são determinadas de acordo com o micro-organismo produtor. Para a determinação das melhores condições para a produção de SAM pela estirpe JE6, quatro meios de cultura foram comparados (**Tabela 7**). Os meios Müller-Hinton e ágar nutriente não permitiram a produção da SAM pela estirpe JE6 quando foram utilizadas as indicadoras *S. enterica* e *P. vulgaris*. Entretanto, houve inibição da indicadora *B. cereus* quando a estirpe JE6 foi crescida nesses dois meios de cultura. Esse fato sugere que JE6 produza, pelo menos, duas SAM distintas.

A produção de mais de uma substância antimicrobiana por uma única estirpe já foi relatado em bactérias ácido-láticas isoladas de cevada maltada, onde a espécie *Lactobacillus sakei* foi capaz de produzir duas novas bacteriocinas denominadas sakacina 5X e sakacina 5T. O espectro inibitório de cada bacteriocina purificada foi analisado e demonstrou que a sakacina 5X era capaz de inibir a maior variedade de micro-organismos responsáveis pela degradação de cerveja (VAUGHAN *et al.*, 2001).

Nenhuma diferença significativa ($p > 0.05$) nos halos de inibição foi detectada entre os meios BHI e Casoy. Entretanto, visivelmente, a estirpe JE6 produziu halos maiores e mais límpidos no meio Casoy, que foi selecionado então como o meio de cultura a ser utilizado nos experimentos subsequentes.

Em relação à temperatura de incubação da estirpe produtora, a SAM JE6 foi produzida tanto à temperatura ambiente, quanto a 37°C e a 42°C, quando a indicadora utilizada para sua detecção foi *B. cereus*, sendo a produção a 37°C discretamente maior. No entanto, para *S. enterica* e *P. vulgaris*, só foi detectada a produção de SAM a 37°C, o que é mais um indício de que mais de um tipo de SAM seja produzida pela estirpe JE6.

Segundo os resultados, a SAM que tem ação sobre *B. cereus* é capaz de ser produzida em condições nutritivas menos exigentes (ágar Muller-Hinton e ágar nutriente) e sob diferentes temperaturas, enquanto que a SAM que inibe *S. enterica* e *P. vulgaris*, requer para a sua produção o crescimento da estirpe JE6 em meios mais ricos e temperaturas específicas.

O crescimento em meio Casoy com pH inicial variando de 5,0 a 8,0 não afetou a produção de substância antimicrobiana pelo isolado JE6, sendo a mesma

significativamente maior sob pH 5,0 quando foram utilizadas as indicadoras *B. cereus* e *S. enterica*, e sob pH 6,0 para *P. Vulgaris*. Em relação à produção da SAM JE6 em ágar casoy com concentrações de NaCl variando até 3%, a única diferença significativa observada foi em relação à inibição de *B. cereus*, que foi levemente maior sem a adição de NaCl. Levando em consideração a atmosfera a produção de substância antimicrobiana por JE6, esta foi mais significativa em aerobiose em comparação a anaerobiose.

Tabela 7: Influência do meio de cultura, pH, concentração de NaCl e atmosfera na produção da SAM por JE6.

| | | Estirpes indicadoras | | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | <i>S. enterica</i> | <i>B. cereus</i> | <i>P. vulgaris</i> |
| Meio de crescimento | Ágar Casoy | 13,0 ± 1,8 ^a | 30,4 ± 0,5 ^a | 21,6 ± 1,3 ^a |
| | Ágar Müller-Hinton | - ^b | 17,7 ± 1,1 ^b | - ^b |
| | Ágar Nutriente | - ^b | 32,0 ± 5,0 ^a | - ^b |
| | Ágar BHI | 13,3 ± 0,5 ^a | 27,8 ± 0,9 ^a | 15,2 ± 1,1 ^c |
| pH | 5.0 | 29,0 ± 5,0 ^a | 32,0 ± 3,6 ^a | 19,6 ± 8,7 ^a |
| | 6.0 | 21,0 ± 3,0 ^b | 29,8 ± 2,1 ^a | 29,3 ± 0,9 ^b |
| | 7.0 | 18,0 ± 2,0 ^b | 23,4 ± 0,5 ^b | 26,6 ± 2,0 ^b |
| | 8.0 | 16,7 ± 1,9 ^b | 18,0 ± 1,0 ^b | - ^c |
| NaCl | Controle | 18,0 ± 3,3 ^a | 32,3 ± 3,3 ^a | 15,0 ± 0,8 ^a |
| | 1.0% | 17,5 ± 1,7 ^a | 25,0 ± 2,3 ^b | 12,7 ± 1,8 ^a |
| | 2.0% | 20,0 ± 1,1 ^a | 27,0 ± 1,1 ^b | 15,5 ± 3,5 ^a |
| | 3.0% | 19,0 ± 4,3 ^a | 26,5 ± 2,0 ^b | 13,3 ± 2,6 ^a |
| Temperatura de incubação | 28°C | - ^a | 26,6 ± 1,7 ^a | 17,7 ± 2,4 ^a |
| | 37°C | 20,7 ± 2,5 ^b | 34,3 ± 1,8 ^b | 23,5 ± 2,4 ^b |
| | 42°C | - ^a | 28,2 ± 4,8 ^a | - ^c |
| Atmosfera | Aerobiose | 17,2 ± 2,4 ^a | 24,0 ± 1,6 ^a | 32,8 ± 4,4 ^a |
| | Anaerobiose | - ^b | 9,75 ± 3,34 ^b | 19,3 ± 2,6 ^b |

Legenda: Os números representam as médias e desvios-padrão dos diâmetros das zonas de inibição (em mm) de pelo menos três experimentos independentes; -, ausência de halo de inibição ou halo inferior a 2 mm; ^a, ^b, ^c, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros.

Resultados semelhantes foram encontrados na produção da bacteriocina EC2, produzida por *Escherichia coli*, com atividade inibitória contra outras estirpes de *E. coli* e contra *S. enterica*. As melhores condições para sua produção foram em meio Casoy, a 37°C e com pH inicial de 6,0, sem adição de NaCl (LOPES *et al.*, 2013). Alguns estudos realizados com substâncias antimicrobianas produzidas por *Klebsiella*

ozaenae K and *Raoultella terrigena* L, demonstraram que as melhores condições de produção de SAM por estas estirpes também foram em ágar Casoy, à temperatura de 37°C, com pH inicial de 6,0 e com concentrações de NaCl podendo variar entre 0,5 a 3,0%. Entretanto, a bacteriocina R. Terrigena L tem uma leve redução na sua produção em ausência de sal (FLEMING *et al.*, 2011).

Em resumo, o crescimento em meio Casoy com pH entre 5,0 e 6,0 sob temperatura de 37°C e sem adição de NaCl são as condições mais apropriadas para a maior produção de SAM pela estirpe JE6. A **Figura 8** ilustra a inibição de estirpes indicadoras sob essas condições.

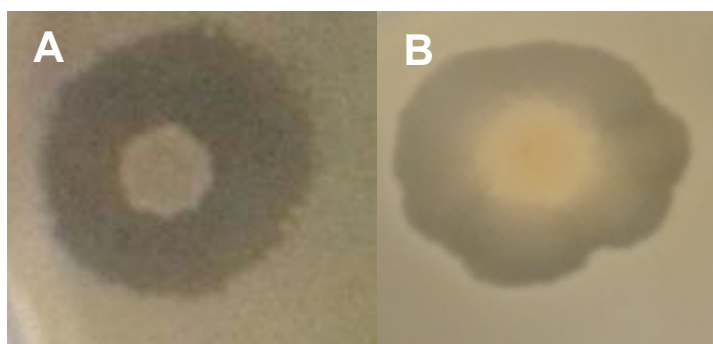


Figura 8: Inibição de estirpes indicadoras sob as condições mais favoráveis para a produção de SAM pela estirpe JE6. (A) indicadora *B.cereus*, (B) indicadora *S.enterica*.

Definir as melhores condições de produção das bacteriocinas auxilia também na determinação dos fatores que podem alterar sua eficiência. As bactérias ácido-lácticas, por exemplo, produzem bacteriocinas com diferentes atividades e que dependem da composição química e das condições físicas dos alimentos para atuarem de forma eficaz. Além da interação com os componentes do alimento, a produção de bacteriocinas pode ser afetada negativamente pelas condições de processamento e armazenamento, sendo os valores de pH e a temperatura fatores importantes (BALCIUNAS *et al.*, 2013). Desta forma, cada vez mais aumenta o número de pesquisas realizadas com bacteriocinas e substância inibitória do tipo bacteriocina analisando suas melhores condições de produção e fatores que podem afetar na sua atividade antimicrobiana.

6.4 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ESTIRPES DO COMPLEXO *ACINETOBACTER BAUMANNII/CALCOACETICUS* E *SHIGELLA DYSENTERIAE* RESISTENTES E MULTIRRESISTENTES (MDR) A ANTIBIÓTICOS ISOLADAS DE FLI E DE UTENSÍLIOS PELO ISOLADO JE6

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento na incidência de bactérias Gram-negativas resistentes e multirresistentes a antibióticos em alimentos, sendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e os patógenos da família *Enterobacteriaceae* (em especial, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter sp.*), também constantemente associados a infecções hospitalares (GHODHBANE *et al.*, 2015).

Alguns estudos relatam a presença de diferentes bactérias Gram-negativas em fórmulas lácteas infantis, incluindo o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. Esses micro-organismos podem causar infecções como pneumonia, infecções no trato urinário e bacteremia. Estes agentes patogênicos vêm ganhando importância devido aos surtos e infecções provocadas em recém-nascidos em razão da vulnerabilidade destes pacientes e a resistência e multirresistência a medicamentos apresentada por estes isolados (ARAÚJO *et al.*, 2015; AMORIM *et al.*, 2017).

Com o surgimento de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos muito pesquisadores testaram as bacteriocinas como alternativa aos antibióticos. Além disso, os avanços frequentes na identificação e caracterização das bacteriocinas têm auxiliado na sua utilização como agentes terapêuticos no tratamento de infecções em seres humanos e animais (GHODHBANE *et al.*, 2015). Desta forma, cada vez mais são realizadas pesquisas voltadas para a produção de substâncias antimicrobianas capazes de inibir tais bactérias patogênicas.

Neste estudo, o isolado JE6 mostrou-se um promissor agente na inibição das quinze estirpes resistentes e multirresistentes a antibióticos pertencentes ao complexo ABC por meio da produção de substâncias antimicrobianas (**Tabela 8**), apresentando halos de inibição satisfatórios, conforme ilustrado na **Figura 9**.

Além dos isolados do complexo ABC, JE6 foi capaz de inibir cinco estirpes de *Shigella dysenteriae*, outro agente patogênico muito importante encontrado em utensílios de lactário. A *S. dysenteriae* possui sorotipos associados à shigelose, uma infecção entérica aguda considerada um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, podendo causar consequências potencialmente devastadoras para as crianças e recém-nascidos (MORAES *et al.*, 2015b).

Assim como a substância antimicrobiana produzida por JE6 mostrou ser efetiva contra mais de um patógeno Gram-negativo, outros estudos têm destacado a atividade

antimicrobiana das bacteriocinas contra uma ampla gama de patógenos Gram-negativos, como por exemplo, a bacteriocina L-1077 produzida por *Lactobacillus salivarius* que, assim como a SAM de JE6, possui ação efetiva contra as bactérias *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris* (GHODHBANE *et al.*,2015). Entretanto, nesses estudos não foram citadas bacteriocinas ativas contra o Complexo ABC, o que torna a(s) substância(s) antimicrobiana(s) produzida(s) por JE6 agente(s) com potencial de aplicação na inibição de patógenos alimentares resistentes e multirresistentes antibióticos, em especial, as bactérias do Complexo ABC.

Tabela 8: Inibição de Estirpes do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e *Shigella dysenteriae* por JE6.

| Estirpe | Zonas de Inibição (mm) |
|---------------------------------------|------------------------|
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE2 | 24,1 ± 1,5 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE3 | 27,6 ± 1,3 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE4 | 37,8 ± 4,6 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE5 | 37,3 ± 1,9 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE8 | 20,1 ± 5,3 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR1 | 25,2 ± 3,6 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR2 | 23,2 ± 0,7 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR3 | 27,6 ± 1,9 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR4 | 23,4 ± 0,5 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR6 | 31,0 ± 3,1 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> ME2 | 30,1 ± 4,4 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> MR1 | 27,0 ± 2,0 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> AE1 | 29,2 ± 0,7 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> PR1 | 23,1 ± 2,4 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> PR2 | 26,0 ± 1,5 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME1 | 25,5 ± 4,0 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME3 | 29,8 ± 0,8 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME4 | 26,1 ± 1,1 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME5 | 24,0 ± 2,6 |
| <i>S. dysenteriae</i> BIR3 | 20,6 ± 0,7 |

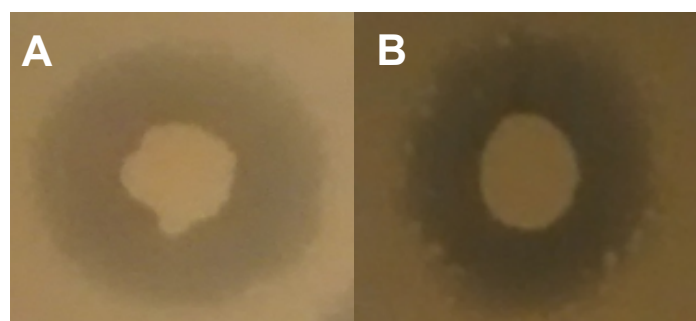


Figura 9: Produção de SAM pelo isolado JE6 contra estirpes multirresistentes a antibióticos: (A) *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* JR4 e (B) *Shigella dysenteriae* ME3.

6.5. CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE ESTIRPES RESISTENTES E MDR ISOLADAS DE PRODUTOS LÁCTEOS PELO ISOLADO JE6.

Com o aumento do interesse por micro-organismos produtores de SAM, uma vez que os antibióticos não podem ser utilizados em alimentos, estas substâncias são cada vez mais importantes na prevenção e controle de contaminantes alimentares (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Em um trabalho realizado anteriormente por nosso grupo com isolados de produtos lácteos como leite e queijo na produção de SAM, usando como indicadoras bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica*, foi verificado que nenhum dos isolados do complexo ABC produziu substâncias antimicrobianas efetivas contra as indicadoras usadas (AMORIM *et al.*,2017).

Entretanto, nos experimentos realizados neste trabalho utilizando-se a estirpe JE6 como produtora e vinte e seis isolados de produtos lácteos como indicadoras, verificou-se a inibição de vinte e três (88%) isolados bacterianos (**Tabela 9**). A **Figura 10** ilustra a inibição de alguns desses isolados.

Estes dados são importantes, pois dez destes isolados pertencentes ao complexo *Enterobacter cloacae* são estirpes resistentes e multiressistentes a antibióticos como cefalotina, ampicilina, amoxicilina, entre outros. Tais achados demonstram que a SAM produzida por JE6 é efetiva contra diferentes patógenos alimentares que, devido a sua multirresistência a antibióticos, podem ser de difícil controle e eliminação.

A ação de substâncias antimicrobianas contra o complexo *Enterobacter cloacae* foi observado em alguns estudos, onde as bacteriocinas Enterocina AS-48 e Enterocina 96 produzidas por *Enterococcus faecalis* mostraram sua ação efetiva contra o complexo *Enterobacter cloacae*, assim como a bacteriocina thuricina-S produzida por *Bacillus thuringiensis*. Esta última possui resistência ao calor e é estável a uma ampla faixa de pH e normalmente atua sobre agentes patogênicos transmitidos através de intoxicação alimentar, como *L. monocytogenes* e *B. cereus* (GHODHBANE *et al.*,2015; MARROQUIN *et al.*,2016).

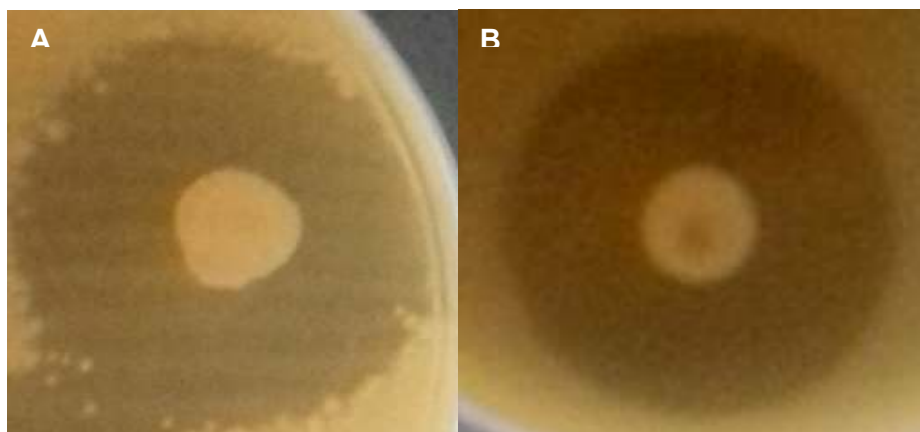


Figura 10: Inibição de (A) Complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* V2.14 (B) *Klebsiella oxytoca* V1.27 pelo isolado JE6.

Tabela 9: Inibição de estirpes isoladas de produtos lácteos por JE6.

| Estirpe | Zonas de Inibição (mm) |
|---|------------------------|
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1C2 | 12,7 ± 0,9 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1C3 | 11,3 ± 0,4 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1L2 | 16,7 ± 1,2 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1R1 | 9,7 ± 0,9 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1R2 | 2,3 ± 3,3 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q1R4 | 7,0 ± 5,0 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2E1 | 6,7 ± 4,7 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2L1 | 13,3 ± 0,5 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2M1 | - |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2R2 | 22,7 ± 3,4 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q2R3 | 13,0 ± 0,8 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q11 | 10,3 ± 1,2 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q12 | 15,0 ± 0,0 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q15 | 11,0 ± 0,8 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> Q16 | 14,0 ± 2,2 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> E1 | 13,0 ± 2,2 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> E2 | 16,7 ± 1,2 |
| Complexo <i>Enterobacter cloacae</i> E3 | 16,0 ± 0,8 |
| <i>Escherichia coli</i> V1.4 | 22,3 ± 1,9 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> V1.9 | 15,7 ± 1,2 |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> V1.15 | 20,7 ± 1,9 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V1.17 | - |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V1.23 | 15,7 ± 0,9 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> V1.27 | 31,0 ± 0,0 |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V2.1 | - |
| <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> V2.14 | 32,7 ± 0,9 |

6.6. DETECÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA A PARTIR DO SOBRENADANTE DA CULTURA JE6

A crescente atenção voltada para as bacteriocinas ocorre devido as suas potentes atividades inibitórias, os seus diversos modos de ação e principalmente o fato de serem consideradas seguras para os seres humanos (PHUMISANTIPHONG *et al.*, 2017). Assim, pesquisas vêm sendo realizadas através da inserção destas bacteriocinas em alimentos com o intuito de conservação e ação contra a contaminação de micro-organismos (YANG *et al.*, 2014).

A adição das bacteriocinas em alimentos fermentados pode ocorrer de três formas, sendo uma delas utilizando o sobrenadante da cultura produtora e sua posterior purificação a partir de técnicas cromatográficas (LAGHA *et al.*, 2017).

Os experimentos realizados neste trabalho com o sobrenadante da cultura JE6, obtido através da combinação de meio líquido e semissólido, contra as bactérias indicadoras *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* e *Proteus vulgaris* demonstraram que houve inibição do crescimento apenas da indicadora *B. cereus* (**Figura 11**), sugerindo, mais uma vez, que JE6 produza mais de um tipo de SAM. Entretanto, a obtenção desse sobrenadante ativo contra *B. cereus* é um bom indício de que essa SAM possa ser purificada e assim, ter potencial de aplicação.



Figura 11: Inibição da indicadora *B. cereus* pelo sobrenadante da cultura JE6.

Com o intuito de identificar e caracterizar substâncias antimicrobianas de bactérias Gram-negativas isoladas de fórmulas lácteas infantis e utensílios usados em seu preparo, este trabalho conseguiu identificar uma substância antimicrobiana produzida por um isolado do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, denominada JE6, que possui ação contra diferentes patógenos isolados de alimentos, incluindo estirpes resistentes e multirresistentes a antibióticos.

Este fato é de grande relevância e contribui ainda mais para a utilização de substâncias antimicrobianas como biopreservativos de alimentos e tornam a SAM JE6 um agente promissor para estudos posteriores de preservação de alimentos e controle de patógenos.

7. CONCLUSÕES

- Neste trabalho, pode-se considerar que alguns isolados bacterianos advindos de fórmulas lácteas infantis e utensílios usados em seu preparo são capazes de produzir substâncias antimicrobianas importantes com potencial de aplicação contra patógenos alimentares.
- O isolado JE6 pertencente ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* apresentou os melhores resultados em comparação aos demais isolados, já que conseguiu inibir um número maior de patógenos alimentares de referência, dentre eles, *Salmonella enterica* e *Bacillus cereus*, importantes patógenos associados a Doenças Transmitidas por Alimentos.
- A substância antimicrobiana produzida por JE6 foi eficaz na inibição de outros isolados do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, de *Shigella dysenteriae* e de *Enterobacter sp.*, resistentes e multirresistentes a antibióticos
- A substância antimicrobiana produzida por JE6 não foi sensível ao tratamento com as enzimas proteolíticas testadas e NaOH, sendo assim, foi considerada uma substância inibitória do tipo bacteriocina (BLIS).
- As melhores condições para a produção de substância antimicrobiana por JE6 englobam o crescimento em meio Casoy com pH entre 5,0 e 6,0, sob temperatura de 37°C, sem adição de NaCl e em aerobiose.
- Com base na literatura, este é o primeiro trabalho a relatar a produção de SAM por uma estirpe do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* ativa contra bactérias Gram-negativas multirresistentes a antibióticos, associadas a alimentos lácteos e utensílios.

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DESTE TRABALHO

8.1. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO (ANEXOS 1 e 2)

- **CONCEIÇÃO, C.S.**, SOUZA, B. V., VIEIRA, J. M. B. D., NASCIMENTO, J. S. Pathogen killing pathogen: antimicrobial substance from *Acinetobacter* active against foodborne pathogens. Aceito para publicação no *The Journal of Infection in Developing Countries*.

8.2. COMUNICAÇÃO EM EVENTOS (ANEXOS 3, 4 e 5)

- **CONCEIÇÃO, C.S.**, SOUZA, B. V., ARAÚJO, B. C., NASCIMENTO, W. G. R., VIEIRA, J. M. B. D., NASCIMENTO, J. S. PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS POR *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e *Enterobacter cloacae* ISOLADOS DE UTENSÍLIOS DE UM LACTÁRIO. **III Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e IV Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição**. Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto/ Ouro Preto 27 a 31 de março de 2017.
- **CONCEIÇÃO, C.S.**, SOUZA, B. V., ARAÚJO, B. C., NASCIMENTO, W. G. R., VIEIRA, J. M. B. D., NASCIMENTO, J. S. INIBIÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES POR *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e *Enterobacter cloacae* ISOLADOS DE UTENSÍLIOS DE UM LACTÁRIO. **I Jornada de Pós Graduação**. Instituto Federal do Rio de Janeiro/ Campus Rio de Janeiro, 08 de junho de 2017.
- **CONCEIÇÃO, C.S.**, SOUZA, B. V., VIEIRA, J. M. B. D., NASCIMENTO, J. S. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DA SAM JE6, UMA SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* ATIVA CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES. **XII Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas - São paulo 04 a 06 de novembro de 2017.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASILIASI, S., TAN, J. S., IBRAHIM, T. A. T., RAMANAN, R. N., VAKHSHITEH, F., MUSTAFA, S., LING, T. C., RAHIM, R. A., ARIFF, A. B. Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry. *BMC Microbiology*, v. 12, p. 260, 2012.

AMORIM, A. M. B. E NASCIMENTO, J. S. *Acinetobacter*: an underrated foodborne pathogen?. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v.11, p. 111-114, 2017.

ARAÚJO, A. D. S., FILIZOLA, R. L. D. S., MAIA, M. D. M. D. Avaliação microbiológica de fórmulas lácteas infantis em pó, preparadas em mamadeiras. AVALIAÇÃO no lactário de um hospital da cidade de Recife – PE. *Infarma*. v. 20 n. 7/8, p. 13-17, 2008.

ARAÚJO, B.C.; MORAES, M.S.; COSTA, L.E.O.; NASCIMENTO, J.S. Multidrugresistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from infant milk formula and utensils in a nursery in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 2303-2306, 2015.

ARSALAN, A., BAGIR, S., NAQVI, S., ALI, S. I., ANWAR, Z. Contamination of microorganisms in pediatric infant formula marketed in Karachi. *Annals of Food Science and Technology*, v. 14, n. 1, p. 90-99, 2013a.

ARSALAN, A., ANWAR, Z., AHMAD, I., SABA, A., BAQAR, S., NAQIV, S. Microbes in pediatric infant formula. *Science and Nature*. v.2, p. 116-122, 2013b.

BALCIUNAS, E. M., MARTINEZ, F. A. C., TODOROV, S. D., FRANCO, B. D. G. M., CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. S. Novel Biotechnological applications of bacteriocin: A review. *Food Control*. v. 32, p. 134-142, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos de Alimentos. *Diário Oficial – Republica Federativa do Brasil*. 12 jan. 2001.

CHAP, J., JACKSON, P., SIQUEIRA, R., GASPAS, N., QUINTAS, C., PARK, J., OSAILI, T., SHAKER, R., JARADAT, Z., HARTANTYO, S. H. P., ABDULLAH SANI, N., ESTUNINGSIH, S. & FORSYTHE, S. J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 136, p. 185-188, 2009.

CHIKINDAS, M. L., WEEKS, R., DRIDER, D., CHISTYAKOV, V. A., DICKS, L. M. T. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology* v. 49, p. 23–28, 2017.

CHUMCHALOVA, J. SMARDA, J. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbial*. v. 48, p. 111-115, 2003.

DAMACENO, H. F., de FREITAS, J. C. V. Jr., MARINHO, I. L., CUPERTINO, T. R., COSTA, L. E., NASCIMENTO, J. S. Antibiotic resistance versus antimicrobial substances production by gram-negative foodborne pathogens isolated from minas frescal cheese: heads or tails? *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 4, p. 297-301, 2015.

DIMOV, S.G., IVANOVA, P. M., HARIZANOVA, N. T., IVANOVA, I. V. Bioactive Peptides used Bacteria in the Concur-Rence for the Ecological Niche: General Classification and More of Action (Overview). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. v. 9, p. 3-22, 2005.

DOUGHARI, H. J., NDAKIDEMI, P. A., HUMAN, I. S., BENADE, S. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and Environments*. v. 26, p. 101-112, 2011.

DRECHSEL, M. M., SCHWAB, S., VIDAL, M. S., BALDANI, J. I. Biossíntese e atividade de bacteriocinas, e mecanismos bacterianos de autoimunidade. *Embrapa Agrobiologia*. v. 4, p. 11-16, 2011.

EGAN, K., FIELD, D., REA, M. C., HILL, C. ROSS, R. P., COTTER, P. D. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? *Frontiers in Microbiology*. v.7, p.461, 2016.

FLEMING, L. R., BOLZAN, D. N. & NASCIMENTO, J. S. Antimicrobial substances produced by coliform strains active against foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 7, n. 3, p. 243-247, 2010.

FLEMING, L. R., PEÇANHA, B. R. B., PEREIRA, E. M., NASCIMENTO, J. S. Influence of growth conditions on production of klebicin K and raoultellin L, two antimicrobial substances against Gram-negative pathogens. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, v.2, p. 1095-1099, 2011.

GHODHBANE, H., ELAIDI, S., SABATIER, J. M., ACHOUR, S., BENHMIDA, J., REGAYA, I. Bacteriocins Active Against Multi-Resistant Gram Negative Bacteria Implicated in Nosocomial Infections. *Infectious Disorders*. v. 15, p. 2-12, 2015.

GIAMBIAGI-DEMARVAL, M., MAFRA, M. A., PENIDO, E. G. C., BASTOS, M. C. F. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, v. 136, p.1591–1599, 1990.

GILLOR, O., ETZION, A., RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 81, p. 591-606, 2009.

GRIBBLE, K. D. & HAUSMAN, B. L. Milk sharing and formula feeding: Infant feeding risks in comparative perspective? *Australasian Medical Journal*. v. 5, p. 275-283, 2012.

JOSHI, S. G & LITAKE, G. M. *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogenic threat to public health. *World Journal of clinical Infection Diseases*, 25. v. 3(3), p. 25-36, 2013.

JUNG, J. & PARQUE, W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 99, p. 2533-2548, 2015.

KHALIL, R., ELBAHLOUL, Y., DJADOUNI, F., OMAR S. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pakistan Journal Nutrition*. v. 8, p. 242-250, 2009.

KORENBLUM, E., WEID, I. D., SANTOS, A. L. S., ROSADO, A. S., SEBASTIAN, G. V., COUTINHO, C. M. L. M., MAGALHAES, F. C. M., PAIVA, M. M., SELDIN, L. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H₂O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. v. 98, p. 667-675, 2005.

LAGHA, A. B., HAAS, B., GOTTSCHALK, M., GRENIER, D. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*. v. 48, p.22, 2017.

LEE, C., LEE, J. R., PARK, M., PARK, K. S., BAE, I. K., KIM, Y. B., CHA, J., JEONG, B. C., LEE, S. H. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. p. 7-55, 2017.

LINHARES, I. W. *Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias no Preparo de Fórmulas Infantis em Lactário Hospitalar*. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2012.

LOPES, Y.J., GOMES, M. D. B., FLEMING, L. R., DE BRITTO, B. R., & DOS SANTOS NASCIMENTO, J. Production of bacteriocin EC2 and its interference in the growth of *Salmonella typhi* in a milk matrix. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 3, n. 1. p, 26-29, 2013.

LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net>. Acessado em 09 de julho de 2017.

MANEGUETTI, B. T., MACHADO, L. S., OSHIRO, K. G. N., NOGUEIRA, M. L., CARVALHO, C. M. E., FRANCO, O. L. Antimicrobial Peptides from Fruits and Their Potential Use as Biotechnological Tools - A Review and Outlook. *Frontiers Microbiology*. v.7, p. 2136, 2016.

MARROQUIN, E. L. S., WONG, L. J. G., MEDINA, V. R. M., LOPEZ, M. A. R., ALFÉREZ, B. P. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications. *Reviews in Medical Microbiology*. v. 27, p. 95-101, 2016.

MATHUR, H., FIELD, D., REA, M. C., COTTER, P. D., HILL, C. ROSS, R. P. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Frontiers in Microbiology*. v. 8, p. 1205, 2017.

MORAES, M. S. Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios usados em seu preparo. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, RJ, 2015.

MORAES, M. S., ARAUJO, B. C., COSTA, L. E. O., NASCIMENTO, J. S. Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis sob diferentes condições de preparo e armazenamento. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v.3, p.48 - 52, 2015a.

MORAES, M. S., ARAUJO, B. C., COSTA, L. E. O., NASCIMENTO, J. S. *Shigella* in baby bottles of a Brazilian newborn nursery. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v.9, p.679 - 681, 2015b.

NAGMOUCHI, K., LE LAY, C., BAAH, J., DRIDER, D. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Research in Microbiology*. v.163, p. 101-108, 2012.

NASCIMENTO, J. S., ABRANTES, J., GIAMBIAGI DEMARVAL, M., BASTOS, M. C. F. Growth conditions required for bacteriocin production by strains of *Staphylococcus aureus*. *World Journal Microbiol Biotech*. v.20, p. 941- 949, 2004.

O'CONNOR, P.M.; ROSS, R.P.; HILL, C.& COTTER, P.D.A. Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*. v.2, p.51-57, 2015.

OLIVEIRA, C. P., JÚNIOR, J. P. S., SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. *Revista Verde*. v.7, n.1, p. 09, 2015.

OLIVEIRA, V. F.; FLEMING, L. R.; FERREIRA, P. S.; NASCIMENTO, J. S. Substâncias antimicrobianas produzidas por *Bacillus* spp. isolados de frutas. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 29, n. 1, p. 57-62, 2011.

PEREZ, R. H., ZENDO, T., SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factors*. v. 13, p. S1-S3, 2014.

PHUMISANTIPHONG, U., SIRIPANICHGON, K., REAMTONG, O., DIRAPHAT, P. A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci. *PLoS ONE*. v. 12, p. 10, 2017.

PRUDÊNCIO, C. V., SANTOS, M. T., VANETTI, M. C. D. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *Journal of Food Science and Thecnology*. v. 52, p. 5408-5417, 2015.

ROSSI, P., KABUKI, D. Y., KUAHEY, A.Y. Avaliação microbiológica de preparo de fórmula láctea infantil em lactário hospitalar. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*. v.69, n. 4, p. 503-509, 2010.

RYAN, A.S. & HAY, W.W.JR. Challenges of infant nutrition research: a commentary. *Nutritional Journal*. p. 15-42, 2016.

SILVA, L. M. P., VENÂNCIO, S. I., MARCHIONI, D. M. L. Práticas de alimentação complementar do primeiro ano de vida e fatores associados. *Revista de Nutrição*. v. 23, n. 6, p. 983-992, 2010.

SINGH, P. K., CHITTPURNA, ASHISH, SHARMA, V., PATIL, P. B., KORPOLE, S. Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS ONE*. v. 3, p. 3, 2012.

SIVAROOBAN, T., HETTIARACHCHY, N. S., JOHNSON, M. G. Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *Journal Food Prot*. v. 71, p. 2105-2109, 2008.

SVS/MS – Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <http://saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em 18 de janeiro de 2016.

VAUGHAN, A., EIJSINK, V.G.H., O'SULLIVAN, T.F., O'HANLON, K. and VAN SINDEREN, D. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p.131-138, 2001.

ZHOU, G., SHI, Q. S., HAUNG, X. M., XIE, X. B. The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *Interantional Journal of Molecular Science*. v. 16, p. 21711–21733, 2015.

WEFFORT, V. R. S. Avanços nutricionais em fórmulas infantis. *Pediatria moderna*, v. 48, n. 4, p.115-120, 2012.

YANG, S. C., LIN, C. H., SUNG, C. T., & FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*. v. 5, p. 241, 2014.

10. ANEXOS

Anexo 1

Aceite de artigo para publicação no *The Journal of Infection in Developing Countries*

[JIDC] Editor Decision

Liping Li <lilp5007@temple.edu>

8 de janeiro de 2018 01:14

Para: Cinara Souza da Conceição <cinara_log14@hotmail.com>, Barbara Victor Souza <barbarelav@gmail.com>, Jessica Many Bittencourt Dias Vieira <jessicamany@gmail.com>, Janaina dos Santos Nascimento <janaina.nascimento@ifrj.edu.br>

Cinara Souza da Conceição, Barbara Victor Souza, Jessica Many Bittencourt Dias Vieira, Janaina dos Santos Nascimento:

We have reached a decision regarding your submission to The Journal of Infection in Developing Countries, "Pathogen killing pathogen: antimicrobial substance from Acinetobacter active against foodborne pathogens".

Our decision is to: accepted for publication.

Liping Li
Rutgers University
Phone 012014287970
lilp5007@temple.edu

--

The Journal of Infection in Developing Countries

Anexo 2
Artigo aceito para publicação

1 **Pathogen killing pathogen: antimicrobial substance from**
2 ***Acinetobacter* active against foodborne pathogens**

3
4 Cinara Souza da Conceição ¹, Barbara Victor Souza ¹, Jéssica Manyá Bittencourt Dias
5 Vieira ², Janaina dos Santos Nascimento ^{1*}

6
7 ¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ)

8 ² Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO).

9
10 **Corresponding author**

11 Professor Janaina dos Santos Nascimento, PhD

12 Laboratory of Microbiology

13 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Rua Senador Furtado

14 121 Lab. 412 Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

15 Tel.: 55 (21) 2566-7792

16 E-mail: janaina.nascimento@ifrj.edu.br

17
18 **Abstract**

19
20 Introduction: Antimicrobial substances (AMS) produced by bacteria may reduce or
21 prevent the growth of pathogenic and spoilage microorganisms in food. In this study, 16
22 isolates of *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (ABC) complex, previously obtained
23 from reconstituted infant milk formula (IMF) samples and the preparation and
24 distribution utensils from the nursery of a public hospital, were used to screen for AMS
25 production.

26
27 Methodology: Antimicrobial substance production and spectrum of activity assays were
28 performed by agar-spot assay. Optimization of growth conditions for AMS production
29 was also evaluated.

30
31 Results: Three (17.6%) isolates, namely JE3, JE4, and JE6, produced AMS against the
32 principal indicator strain *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhi ATCC
33 19214. JE6 was also able to inhibit strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*,
34 and *Bacillus cereus*, a Gram-positive bacteria. Remarkably, JE6 was able to inhibit all
35 the tested resistant and multidrug-resistant (MDR) strains of the ABC complex and
36 *Shigella dysenteriae* associated with IMF and utensils, indicating a potentially valuable
37 application. AMS produced by JE6 does not appear to be affected by proteolytic
38 enzymes and the producer strain showed specific immunity to its own AMS.

39
40 Conclusion: This study highlights AMS produced by *Acinetobacter* with applications
41 against MDR spoilage and foodborne pathogens - some of them, infectious disease
42 causing agents - which, to our knowledge, has not been previously described.

43
44
45 **Key words:** *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*; antimicrobial substance; foodborne
46 pathogens; bacteriocin.

47
48 **Running title:** Antimicrobial substance produced by *Acinetobacter*

49
50

51 **Introduction**

52 Most commercially available preservatives and antibiotics are produced by
53 chemical synthesis, and their long-term consumption can cause harm to consumer
54 health or lead to microbiota reduction in the gut. Therefore, natural foods without
55 chemical additives have become increasingly popular owing to their health benefits [1].

56 The use of antimicrobial substances (AMS) with antagonistic properties has
57 become the prime candidate in food safety and preservation research. In foods and
58 beverages, the addition of antimicrobial compounds to processed products has become a
59 potent weapon in food preservation.

60 Bacteriocins form a small subgroup within AMS and have potential uses in food
61 preservation. Bacteriocins are proteins or peptides produced by bacteria that have
62 antimicrobial properties [2, 3, 4]. Bacteriocins differ from most therapeutic antibiotics
63 because they have a biologically active protein component (being rapidly digested by
64 the proteases of the human digestive system), are ribosomally synthesized, and have a
65 narrower activity spectrum [5, 6]

66 Biopreservation of foods using bacteriocins can be achieved by either the
67 addition of bacteriocinogenic cultures or the direct addition of the purified substances.
68 Bacteriocin-producing probiotic strains can establish a microbiota balance in the
69 digestive tract, reducing gastrointestinal diseases. Alternatively, purified bacteriocins
70 can be added directly to foods as a natural preservative [1]; this is the most plausible
71 option when potentially pathogenic bacteria are the producers.

72 *Acinetobacter* spp. have been studied for several years to determine possible
73 clinical, industrial, and environmental applications (**Table 1**); however, according to
74 Amorim and Nascimento [7], few studies have reported the association of *Acinetobacter*
75 spp. with food. Some studies cite their presence as bacteria that, along with others of
76 different genera, contribute to the taste, odor, and texture of foods (especially dairy
77 products), owing to their proteolytic and lipolytic [8, 9]. Conversely, other researchers
78 describe *Acinetobacter* as potential pathogens, but do not emphasize their role in food.
79 However, studies such as those by Gurung and coworkers [10] and Dijkshoorn [11],
80 report the isolation of *Acinetobacter* strains from dairy products and claim that these
81 bacteria may be opportunistic pathogens associated with food.

82 *Acinetobacter* strains have been recently associated with infant milk formula
83 (IMF) and the utensils used in its preparation and distribution [12]. Surprisingly,
84 *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (ABC) complex were the most frequently
85 isolated bacteria (37.8%), followed by *Enterobacter cloacae* (26.7%) and other
86 members of the *Enterobacteriaceae* family, which were expected to be the most
87 commonly isolated microorganisms. This prevalence of *Acinetobacter* indicated that
88 these isolates could be producers of AMS capable of inhibiting the growth of other
89 common foodborne bacteria.

90 Therefore, the present study aims to detect AMS production by ABC isolates
91 from IMF and utensils used, and to determine the optimal growth conditions for the
92 production of AMS, which may have potential application against foodborne pathogens
93 and/or food spoilage microorganisms.

95 **Methodology**

96 *Bacterial strains and growth conditions*

97 Sixteen isolates of *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (ABC) complex
98 (obtained in a previous study), from reconstituted IMF samples and sanitized utensils
99 used in preparation/distribution, from the nursery of a public hospital in Rio de Janeiro,
100 Brazil [12], were used as potential AMS producer strains in this study (**Table 2**).

101 All microorganisms were grown in Casoy broth (Himedia, São Paulo, Brazil) at
102 37°C for 18 h. When necessary, the medium was supplemented with either 15 g/L or 6
103 g/L agar (solid or soft agar, respectively). Stock cultures were maintained at -20°C in
104 Tryptic Soy Broth (Himedia, São Paulo, Brazil) containing 40% (v/v) glycerol.

106 *Antimicrobial substance production and spectrum of activity assays*

107 The agar-spot assay was performed as described by Giambiagi-deMarval et al.
108 [13] with minor modifications. Each AMS producing ABC strain was grown in 5 mL of
109 Casoy broth for 18 h at 37°C. Five microliters of culture (approximately 5.0×10^6 cells)
110 were spotted onto Casoy agar plates. After 18 h at 37°C, the bacteria were killed by
111 exposure to chloroform vapor and the plates were sprayed with the indicator strain
112 culture *Salmonella enterica* serotype Typhi ATCC 19214 (0.3 mL of a previously
113 grown culture in 3 mL of Casoy soft agar). This strain was chosen according to

114 Damaceno and coworkers. [14]. Plates were further incubated at 37°C for 18 h and the
115 diameters (in mm) of the inhibition zones were measured. To determine the spectrum of
116 activity, gram-negative and gram-positive strain (**Table 2**) were used as indicators. The
117 sixteen ABC used as potential AMS producers were also used as indicators.

118

119 *Determination of proteinaceous nature*

120 The effects of the proteolytic enzymes pronase (Sigma-Aldrich), proteinase K
121 (Sigma-Aldrich), and trypsin (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) on AMS activity were
122 determined in accordance with Giambiagi-deMarval and coworkers [13], with minor
123 modifications. The enzymes (1 mg/mL) were prepared in 0.05 M Tris (pH 8.0) with
124 0.01 M CaCl₂, and 50 µL were applied around the producer spots after chloroform
125 treatment. Plates were incubated at 37°C for 4 h and then sprayed with the indicator
126 strain. Absence of inhibition zones indicated that the AMS was of proteinaceous nature.
127 To discard the possibility that the inhibition exhibited might have been due to acids
128 produced by the producer strain during its metabolism, the antimicrobial substances
129 were also treated with 0.2 N NaOH.

130

131 *Influence of growth conditions on AMS production*

132 To evaluate the effect of the culture medium on AMS production, the producer
133 strain was grown as previously described, and 5 µL of culture were spotted onto the
134 surface of plates containing 25 mL of the following solid media: brain heart infusion
135 (BHI, Isofar, Rio de Janeiro, Brazil), Casoy (Isoufar, Rio de Janeiro, Brazil), Müller-
136 Hinton (Himedia, São Paulo, Brazil), and nutrient agar (Himedia, São Paulo, Brazil).

137 The influence of the initial pH, growth temperature, and NaCl on AMS
138 production was determined as described by Fleming and coworkers. [15]. Because
139 Casoy agar presented the best results (inhibition halos with the largest diameters), it was
140 used in further experiments. The producer strains were spotted on Casoy agar plates and
141 incubated at 37°C for 18 h. The pH of the culture media was adjusted to achieve pH
142 values of 5.0, 6.0, 7.0, and 8.0 with 1 N HCl or 1 N NaOH. The effect of the growth
143 temperature was evaluated by incubating Casoy agar plates at room temperature (27°C),
144 37°C, and 42°C for 18 h, and the influence of salt was determined by growing the

145 producer strains on Casoy agar plates with different NaCl concentrations (0.5, 1.0, 2.0,
146 and 3.0 g/L).

147 The effects of aeration conditions on bacteriocin activity were evaluated after
148 incubation of the producer strains spotted on Casoy plates at 37°C, both aerobically and
149 anaerobically. Anaerobic conditions were created using the AnaeroGen atmosphere
150 generation system (Oxoid Ltd., Hampshire, England).

151 For these experiments, *S. Typhi*, *Bacillus cereus* and *Proteus vulgaris* were used
152 as indicator strains.

153

154 *Statistical analysis*

155 One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test was used to assess differences in
156 the parameters. For all significance tests, p values < 0.05 were considered statistically
157 significant. At least three replicates of each experiment were performed.

158

159 **Results**

160 In this study, sixteen isolates of ABC complex were tested for AMS production.
161 Three (18.7%) were isolated from IMF preparation jars, namely, JE3, JE4, and JE6, and
162 were able to produce AMS against the indicator strain *Salmonella Typhi*, chosen as the
163 main indicator strain due to its sensitivity to some antimicrobial substances produced by
164 Gram-negative bacteria [14, 16].

165 Isolate JE6 was able to inhibit *S. Typhi*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*,
166 and remarkably, *B. cereus* (**Figure 1**), a Gram-positive bacterium. Therefore, JE6 was
167 chosen for the subsequent experiments.

168 JE6 was also able to inhibit the others 15 ABC isolates tested (12 were MDR),
169 indicating the potential application of this AMS against these MDR pathogens. Assays
170 were performed with proteolytic enzymes (protease and trypsin) to verify whether the
171 activity of JE6 AMS is affected, however, regardless of the indication used, here was no
172 inhibition of AMS by protease and trypsin enzymes. With regards to NaOH, the
173 inhibitory activity produced by the JE6 isolate was also unaffected, indicating that the
174 antimicrobial action is not due to acid production by the producing bacteria.

175 To determine suitable conditions for the maximum production of AMS, JE6 the
176 producer strain was inoculated in four different media (**Table 3**). Müller-Hinton and

177 nutrient agar media did not allow the production of AMS by strain JE6 when using
178 indicators *S. enterica* and *P. vulgaris*. However, there was inhibition of the *B. cereus*
179 indicator when the JE6 strain was grown in these two culture media. No significant
180 difference ($p < 0.05$) in the diameters of the inhibition halos was detected between BHI
181 and Casoy media, however, visibly, the JE6 strain produced larger and more limpid
182 halos in Casoy medium, which was then used in subsequent experiments.

183 The AMS of JE6 was produced at room temperature (27°C), 37°C, and 42°C;
184 AMS production was slightly higher at 37°C when *B. cereus* was the indicator.
185 However, when using *S. enterica* and *P. vulgaris* as indicators, AMS production was
186 only detected at 37°C, providing further evidence that more than one type of BLIS is
187 produced by the JE6 strain.

188 Apparently, AMS that act against *B. cereus* are capable of being produced under
189 less demanding nutrient conditions (Muller-Hinton agar and nutrient agar) and under
190 different temperatures, whereas AMS that inhibit *S. enterica* and *P. vulgaris* require
191 growth of the JE6 strain in a richer media and at specific temperatures.

192 Growth in Casoy medium, with initial pH ranging from 5.0 to 8.0, did not affect
193 the production of AMS by the JE6 isolate, although it was significantly higher at pH 5.0
194 for *B. cereus* and *S. enterica*, and under pH 6.0 for *P. vulgaris*. Varying the NaCl
195 concentrations (up to 3%) in Casoy agar had little effect on JE6 AMS production; the
196 only significant difference observed was in relation to inhibition of *B. cereus*, which
197 was slightly higher without the addition of NaCl.

198 Production of AMS JE6 was also evaluated after the aerobic and anaerobic
199 growth of the producer strain. Inhibition zones for the three indicator strains were
200 significantly reduced under anaerobic growth, suggesting that aerobic conditions are
201 needed for AMS JE6 production.

202 Thus, in general, the optimal conditions for the production of AMS by JE6 may
203 be represented by growth in Casoy agar at 37°C with an initial pH of 5.0, in the absence
204 of NaCl, and under aerobic conditions.

205

206 Discussion

207 AMS-producing microorganisms have a competitive advantage in a particular
208 ecological niche. Consequently, the biotechnology industry is beginning to show an

209 interest in the potential application of these microorganisms and prospecting of such
210 strains has begun. However, gram-negative enteropathogenic bacteria such as
211 *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, and *Klebsiella* are rarely inhibited by gram-
212 positive AMS, such as bacteriocins [16, 17]. In contrast, Gram-negative bacteriocins,
213 including microcin C7, colicins E1 and Ib, and the bacteriocin produced by *E. coli* strain
214 Nissle 1917, have already shown *in vitro* and *in vivo* inhibition of several gram-negative
215 pathogens [17-19].

216 In our previous study, four representatives of the ABC group were able to inhibit
217 indicator strains *E. coli* ATCC25922 and *S. enterica* ATCC19214 [14]. These two
218 species of bacteria are among the major causes of foodborne diseases. As far as we are
219 aware, the study by Damaceno and coworkers was the first research reporting the
220 production of an AMS by *Acinetobacter* strains.

221 In general, antimicrobial substances, such as bacteriocin-like inhibitory
222 substances (BLIS) and bacteriocins produced by gram-negative bacteria, have a narrow
223 antimicrobial activity spectrum, conferring a disadvantage that limits their industrial-
224 scale application [2, 20]. However, in this work, isolate JE6 was able to inhibit *S. Typhi*,
225 *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, and remarkably, *B. cereus* (**Figure 1**), a Gram-
226 positive bacterium. Therefore, JE6 was chosen for the subsequent experiments.

227 Gram-negative pathogens pose serious threats to global public health as
228 treatment options are limited owing to the spread of antibiotic resistance among gram-
229 negative bacteria [21]. These resistant bacteria are increasingly found in foods of
230 different origins.

231 Recently, resistant and multi drug-resistant (MDR) strains of *Shigella* sp. were
232 isolated from dairy products and associated food preparation utensils [22, 23]. JE6 was
233 able to inhibit all five of the *S. dysenteriae* strains isolated from lactary utensils, four of
234 which presented a typical MDR profile. *Shigella dysenteriae* has been associated with
235 shigellosis, an acute enteric infection that poses an important public health problem in
236 developing and underdeveloped countries, and may have potentially devastating
237 consequences for children and newborns [22]. According to our results, an AMS, such
238 as that produced by JE6, may have potential for application as a potent inhibitor of
239 foodborne pathogens, including, those resistant to antibiotics. To our knowledge, this is

240 the first study reporting inhibition of this MDR species by AMS produced by an ABC
241 isolate.

242 Curiously, JE6 is also an MDR strain, but when it was tested as an indicator and
243 producer, no inhibition was observed, suggesting that this strain has a specific immunity
244 mechanism to its own AMS, that is a characteristic of bacteriocins [1]. This suggests
245 that the JE6 AMS is not a typical bacteriocin. Resistance of AMS to proteolytic
246 enzymes is not uncommon. Studies performed with AMS produced by *Bacillus* species
247 have demonstrated that these are insensitive to enzymes such as proteinase K and
248 trypsin. The presence of proteolytic enzymes may occur due to the unusual amino acids
249 present in the structure of the N-terminal or C-terminal protected bacterial or cyclic
250 peptides [24-26].

251 Production of AMS can be influenced by growth [27, 28], therefore determining
252 the optimal conditions for the maximum production of AMS is very important for
253 further studies on purification and cost efficacy.

254 The production of AMS by strain JE6 was detected in the four culture media
255 used in this study, when the indicator strains were *S. enterica* and *P. vulgaris*. However,
256 when the indicator strain was *B. cereus*, production of AMS JE6 was not detected in
257 Müller-Hinton and nutrient agar. Our results suggest that *B. cereus* is more resistant to
258 the AMS in these 2 media or that JE6 produces more than one AMS. Production of one
259 or more AMS by a single strain has already been reported in lactic acid bacteria isolated
260 from malted barley, where *Lactobacillus sakei* was able to produce two new
261 bacteriocins called sakacin 5X and sakacin 5T. The inhibitory spectrum of each purified
262 bacteriocin was analyzed and sakacin 5X was shown to inhibit a larger variety of
263 microorganisms responsible for beer degradation than sakacin 5T [29].

264 Optimal conditions for the production of AMS by JE6 were similar to that found
265 for the production of bacteriocin EC2, produced by *E. coli*, with inhibitory activity
266 against other strains of *E. coli* and *S. enterica* [30]. The optimal conditions for EC2
267 production in Casoy medium, were growth at 37°C, with an initial pH of 6.0, without
268 the addition of NaCl. Studies with antimicrobial substrates produced by *Klebsiella*
269 *ozaenae* K and *Raoultella terrigena* L, demonstrated that the best conditions of AMS
270 production by these strains were also in Casoy agar, at 37°C, with an initial pH of 6.0,
271 and with NaCl concentrations ranging from 0.5 to 3.0% [15].

272 Under these conditions, by replacing Casoy agar with Casoy broth, experiments
273 were performed to verify whether JE6 AMS could be obtained from the supernatant of
274 the producing strain. The initial results were very promising and suggested that
275 antimicrobial activity against the three main indicator strains - *S. Typhi*, *B. creus* and *P.*
276 *vulgaris* - could be detected (data not shown). Subsequent experiments will assess their
277 activity spectrum using preparations of reconstituted IMF as a food matrix artificially
278 contaminated with the inhibited pathogens.

279

280 **Conclusion**

281 The present study elucidates a potential novel and important application for
282 ABC, as the AMS from isolate JE6 has demonstrated efficacy against potentially
283 pathogenic bacteria associated with food, including those with MDR characteristics.

284

285 **Acknowledgements**

286 This research was supported by grants from Instituto Federal de Educação,
287 Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) and Fundação de Amparo à Pesquisa do
288 Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

289

290 **Conflict of interests**

291 No conflict of interests is declared.

292

293

294 **References**

- 295 1. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY (2014) Antibacterial activities of
296 bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 5: 241.
- 297 2. Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, Franco BDGM, Converti A, Oliveira
298 RPS (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food*
299 *Control* 32:134-142.
- 300 3. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K, Riley M,
301 Slatin S, Cavard D (2007) Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Revs* 71: 158-229.
- 302 4. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB (2007) Bacteriocin-based strategies for
303 food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 120(1): 51-70.
- 304 5. Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF (2016) Bacteriocins: recent trends and
305 potential applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56(5): 817-834.
- 306 6. Nes IF, Yoon S, Diep DB (2007) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides
307 (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol* 16(5): 675-690.
- 308 7. Amorim AMB, Nascimento JS (2017) *Acinetobacter*: An underrated foodborne
309 pathogen? *J Infect Develop Countr* 11: 111-114.
- 310 8. Koochi MV, Bari MR, Mehrmoosh F, Abad MAK (2014) A research on existence
311 and special activities of *Acinetobacter* in different cheese. *Int J Adv Biolog Biomed*
312 *Res* 2: 517-525.
- 313 9. Pangallo D, Šaková N, Koreňová J, Puškárová A, Kraková L, Valík L, Kuchta T
314 (2014) Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza
315 cheese. *Int J Food Microbiol* 170: 38-43.
- 316 10. Gurung M, Nam HM, Tamang MD, Chae MH, Jang GC, Jung SC, LIM SK (2013)
317 Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank
318 milk in Korea. *J Dairy Sci* 96: 1997-2002.
- 319 11. Dijkshoorn L (2012) *Acinetobacter baumannii*. In: de Filippis I, McKee M,
320 editors. *Molecular Typing in Bacterial Infections*. Springer; New York: p. 434.
- 321 12. Araújo BC, Moraes MS, Costa, LEO, Nascimento JS (2015) Multidrug-resistant
322 *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from infant milk formula
323 and utensils in a nursery in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci* 98(4): 2303-2306.

- 324 13. Giambiagi-Demarval M, Mafra MA, Penido EGC, Bastos MCF (1990) Distinct
325 groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus*
326 *aureus*. *J Gen Microbiol* 136: 1591-1599.
- 327 14. Damaceno HF, Freitas Jr JCV, Marinho IL, Cupertino TR, Costa LEO, Nascimento
328 JS (2015) Antibiotic resistance versus antimicrobial substances production by
329 gram-negative foodborne pathogens isolated from minas frescal cheese: heads or
330 tails? *Foodborne Pathog Dis* 4: 297-301.
- 331 15. Fleming LR, Pecanha BRB, Pereira EM, Nascimento JS (2011) Influence of growth
332 conditions on production of Klebicin K and Raoultellin L, two antimicrobial
333 substances against Gram-negative pathogens. *Int J Pharm and Biol Arch* 2: 1095-
334 1099.
- 335 16. Fleming LR, Bolzan DN, Nascimento JS (2010) Antimicrobial substances produced
336 by coliform strains active against foodborne pathogens. *Foodborne Path Dis* 7:
337 243-247.
- 338 17. Gillor O, Etzion A, Riley MA (2008) The dual role of bacteriocins as anti- and
339 probiotics *Appl Microbiol Biotechnol* 81(4): 591-60.
- 340 18. Cursino L, Smajs D, Smarda J, Nardi RM, Nicoli JR, Chartone-Souza E,
341 Nascimento AM (2006) Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting
342 some enteric pathogens both *in vitro* and *in vivo*. *J Appl Microbiol* 100:821-829.
- 343 19. Smajs D, Strouhal M, Matejkova P, Cejkova D, Cursino L, Chartone-Souza E,
344 Smarda J, Nascimento AM (2008) Complete sequence of low-copy-number
345 plasmid MccC7-H22 of probiotic *Escherichia coli* H22 and the prevalence of mce
346 genes among human *E coli*. *Plasmid* 59: 1-10.
- 347 20. Güllüce M, Karadayi M, Bariş Ö (2013) Bacteriocins: Promising natural
348 antimicrobials In: *Microbial Pathogens and Strategies for Combating them:*
349 *Science, Technology and Education* 2nd ed (Ed: A MéndezVilas). Formatex
350 Research Center pp 1016-1027.
- 351 21. Behrens HM, Six A, Walker D, Kleanthous C (2017) The therapeutic potential of
352 bacteriocins as protein antibiotics. *Emerg Top Life Sci* 1(1): 65.
- 353 22. Moraes MS, Araujo BC, Costa LEO, Nascimento JS (2015) *Shigella* in baby bottles
354 of a Brazilian newborn nursery. *J Infect Develop Countr* 9: 679-681.

- 355 23. Ahmed AM, Shimamoto T (2015) Molecular characterization of multidrug-resistant
356 *Shigella* spp of food origin. Int J Food Microbiol 194: 78-82.
- 357 24. Korenblum E, Weid ID, Santos ALS, Rosado AS, Sebastian GV, Coutinho CMLM,
358 Magalhaes FCM, Paiva MM, Seldin L (2005) Production of antimicrobial
359 substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H₂O-1 and *B. licheniformis* T6-5
360 isolated from an oil reservoir in Brazil. J Appl Microbiol 98: 667-675.
- 361 25. Khalil R, Elbahloul Y, Djadouni F, Omar S (2009) Isolation and partial
362 characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus*
363 *megaterium* 19 strain. Pakistan J Nutr 8: 242-250.
- 364 26. Abbasiliasi S, Tan JS, Ibrahim TAT, Ramanan RN, Vakhshiteh F, Mustafa S, Ling
365 TC, Rahim RA, Ariff AB (2012) Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with
366 ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for
367 applications in food industry. BMC Microbiol 12: 260.
- 368 27. Delgado A, López FNA., Brito D, Peres C, Fevereiro P, Garrido-Fernández, A
369 (2007) Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 172b requires
370 absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. J Biotechnol
371 130:193–201.
- 372 28. Naz SA, Rasool SA (2013) Isolation, production and characterization of
373 bacteriocins produced by strains from indigenous environments. Pak J Bot 45(1):
374 261-267.
- 375 29. Vaughan A, Eijsink VGH, O'Sullivan TF, O'Hanlon K, Van Sinderen, D (2001) An
376 analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted
377 barley. J Appl Microbiol 91:131-138.
- 378 30. Lopes YJ, Gomes MDB, Fleming LR, Britto BRP, Nascimento JS (2013)
379 Production of bacteriocin EC2 and its interference in the growth of *Salmonella*
380 *Typhi* in a milk matrix. J Microbiol Biotechnol Food Sci 3 (1): 26-29.
- 381 31. Liu IL, Tsai SW(2003) Improvements in lipase production and recovery from
382 *Acinetobacter radioresistens* in presence of polypropylene powders filled with
383 carbon sources. Appl Biochem Biotechnol 104: 129-140.
- 384 32. OECD - Organization for Economic Co-operation and Development (2008)
385 Consensus document on information used in the assessment of environmental
386 applications involving *Acinetobacter* OECD Environment, Health and Safety

- 387 Publications. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology
388 ENV/JM/ MONO No 46:37.
- 389 33. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S (2011) The ecology, biology
390 and pathogenesis of *Acinetobacter* spp: an overview Microb Environm 26: 101-
391 112.
- 392 34. Zhao YH, Chen LY, Tian ZJ, Sun Y, Liu JB, Huang L (2016) Characterization and
393 application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter*
394 *beijerinckii* ZRS. J Bas Microbiol 56(2), 184-195.
- 395 35. Zou C, Wang M, Xing Y, Lan G, Ge T, Yan X, Gu T. Characterization and
396 optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from
397 crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery
398 applications. Biochem Eng J 2014; 90, 49-58.
- 399 36. Menezes BF, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger Jr WT (2005) Diversity of
400 biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with
401 diesel oil. Microbiol Res 160: 249-255.
- 402 37. Zakaria ZA, Zakaria Z, Surif S, Ahmad WA (2007) Biological detoxification of
403 Cr(VI) using wood-husk immobilized *Acinetobacter haemolyticus*. J Hazard Mater
404 148(1-2):164-171.
- 405 38. Shepherd R, Rockey J, Sutherland I W, Roller S (1995) Novel bioemulsifiers from
406 microorganisms for use in foods. J Biotechnol 40: 207-217.
- 407 39. Panilaitis B, Johri A, Blank W, Kaplan D, Fuhrman J (2002) Adjuvant activity of
408 emulsan, a secreted lipopolysaccharide from *Acinetobacter calcoaceticus*. Clin
409 Diagn Lab Immunol 9: 1240-124.
- 410 40. Gutnick D, Bach HR (2003) US Patent n° 6512014. Washington, DC: US Patent
411 and Trademark Office.
- 412 41. Nitschke M, Costa SG (2014) Biosurfactants in the Food Industry In C N Mulligan,
413 S K Sharma, & A Mudhoo (Eds), *Biosurfactants: Research Trends and*
414 *Applications* (pp 177-196) CRC Press.
- 415 42. Navarrete-Bolanos JL, Jimenez-Islas H, Botello-Alvarez E, Rico-Martinez R
416 (2003). Mixed culture optimization for marigold flower ensilage via experimental
417 design and response surface methodology. J Agric Food Chem 51: 2206-2211.
- 418

419 **Figure**

420

421 *Figure 1: Agar-spot assay demonstrating the inhibitory activity of JE6 AMS represented*
422 *by the clear zones of inhibition against the indicator strain Bacillus cereus.*

423

424

425 **Tables**

426

427 *Table 1: Current usage and possible environmental and industrial applications of*
428 *Acinetobacter spp. and their products.*

429

430 *Table 2: Bacterial strains used as producers and indicators of antimicrobial*
431 *substances.*

432 ATCC, American Type Culture Collection; LMIFRJ, Collection of the Laboratory of
433 Microbiology of the Instituto Federal do Rio de Janeiro; MDR, multidrug resistant.

434

435 *Table 3: Effect of growth conditions on antimicrobial substance production by*
436 *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus JE6.*

437 The numbers represent the means and standard deviations of the diameters of inhibition
438 zones (in mm) from three independent experiments; -, absence of inhibition halo or less
439 than 2 mm;

440 ^{a, b, c}, different letters indicate statistically significant difference among the parameters; *

441 *Salmonella enterica* serotype Typhi ATCC19214.

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

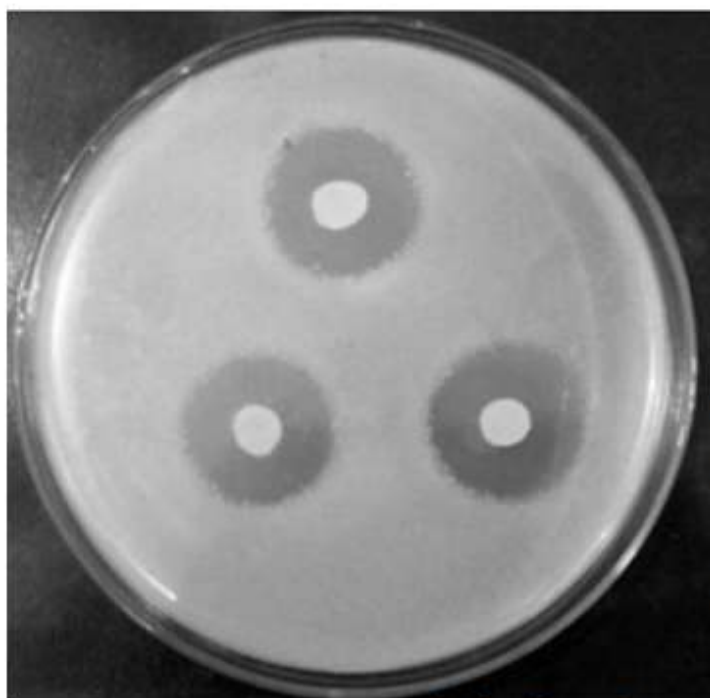


Figure 1

Table 1

| Applications | Examples | References |
|--|--|--------------|
| Bioremediation of waste waters and effluents | <ul style="list-style-type: none"> - Phosphate removal - Crude oil degradation | 31-35 |
| Bioremediation of industrial pollutants | <ul style="list-style-type: none"> - Bioremediation of effluents contaminated with heavy metals | 32, 36, 37 |
| Stabilization of oil-water emulsions, biosorption, and bioemulsans | <ul style="list-style-type: none"> - For use in paper-making, incorporation in shampoos and detergents, emulsification of oil waste pollutants, and in food industry products | 32, 38-41 |
| Other potential applications | <ul style="list-style-type: none"> - Production of carnitine, immune adjuvants, and glutaminase-asparaginase (for clinical use in cancer treatment) - Plant growth promoters and bio-control agents against phytopathogens - Production of cellulolytic enzymes and alkaline lipase | 31-33, 41-43 |

471

476
477

Table 2

| | Strains | Relevant characteristics | Reference/Source |
|---|--|-------------------------------|---------------------|
| Producer/indicator strains | <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> JE2 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> AE1 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE3 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE4 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE5 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JE7 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR1 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR2 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR3 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR4 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR5 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> JR6 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> ME2 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> MR1 | MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> PR1 | Non-MDR | Araújo et al., 2015 |
| | <i>A. baumannii/calcoaceticus</i> PR2 | Non-MDR | Araújo et al., 2015 |
| | Indicator strains | <i>Bacillus cereus</i> LMIFRJ | - |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 | | - | ATCC |
| <i>E. coli</i> LMIFRJ | | - | LMIFRJ |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352 | | - | ATCC |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | | - | ATCC |
| <i>P. fluorescens</i> ATCC13525 | | - | ATCC |
| <i>Proteus mirabilis</i> LMIFRJ | | - | LMIFRJ |
| <i>P. vulgaris</i> LMIFRJ | | - | LMIFRJ |
| <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhi ATCC19214 | | - | ATCC |
| <i>Serratia marcescens</i> LMIFRJ | | - | LMIFRJ |
| <i>Shigella dysenteriae</i> BIR3 | | Non-MDR | Moraes et al., 2015 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME1 | | MDR | Moraes et al., 2015 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME3 | | MDR | Moraes et al., 2015 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME4 | | MDR | Moraes et al., 2015 |
| <i>S. dysenteriae</i> ME5 | | MDR | Moraes et al., 2015 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC12600 | | - | ATCC |
| <i>S. aureus</i> ATCC25923 | | - | ATCC |

478
479

480
481

Table 3

| | | Indicator strains | | |
|---------------------|----------------------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| | | <i>Salmonella</i> Typhi ^a | <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> | <i>Proteus</i> <i>vulgaris</i> |
| Growth media | Casoy agar | 13.0 ± 1.8 ^a | 30.4 ± 0.5 ^a | 21.6 ± 1.3 ^a |
| | Müller-Hinton agar | - ^b | 17.7 ± 1.1 ^b | - ^b |
| | Nutrient agar | - ^b | 32.0 ± 5.0 ^a | - ^b |
| | BHI agar | 13.3 ± 0.5 ^a | 27.8 ± 0.9 ^a | 15.2 ± 1.1 ^c |
| pH | 5.0 | 29.0 ± 5.0 ^a | 32.0 ± 3.6 ^a | 19.6 ± 8.7 ^a |
| | 6.0 | 21.0 ± 3.0 ^b | 29.8 ± 2.1 ^a | 29.3 ± 0.9 ^b |
| | 7.0 | 18.0 ± 2.0 ^b | 23.4 ± 0.5 ^b | 26.6 ± 2.0 ^b |
| | 8.0 | 16.7 ± 1.9 ^b | 18.0 ± 1.0 ^b | - ^c |
| NaCl | control | 18.0 ± 3.3 ^a | 32.3 ± 3.3 ^a | 15.0 ± 0.8 ^a |
| | 1.0% | 17.5 ± 1.7 ^a | 25.0 ± 2.3 ^b | 12.7 ± 1.8 ^a |
| | 2.0% | 20.0 ± 1.1 ^a | 27.0 ± 1.1 ^b | 15.5 ± 3.5 ^a |
| | 3.0% | 19.0 ± 4.3 ^a | 26.5 ± 2.0 ^b | 13.3 ± 2.6 ^a |
| Temperature | 28°C | - ^a | 26.6 ± 1.7 ^a | 17.7 ± 2.4 ^a |
| | 37°C | 20.7 ± 2.5 ^b | 34.3 ± 1.8 ^b | 23.5 ± 2.4 ^b |
| | 42°C | - ^a | 28.2 ± 4.8 ^a | - ^c |
| Atmosphere | Aerobic conditions | 17.2 ± 2.4 ^a | 24.0 ± 1.6 ^a | 32.8 ± 4.4 ^a |
| | Anaerobic conditions | - ^b | 9.7 ± 3.34 ^b | 19.3 ± 2.6 ^b |

482
483
484

MANUSCRIPT

Anexo 3

Certificado do III Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e IV Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto



CERTIFICADO

Certificamos que **BARBARA VICTOR SOUZA** participou do III Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e VI Congresso Mineiro de Alimentação e Nutrição da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizado de 27 a 31 de março de 2017, na qualidade de Apresentador(a) do trabalho: **PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBIÓTIICAS POR *Acinetobacter baumannii* calcicoceticas e *Enterobacter cloacae* ISOLADOS DE UTENSÍLIOS DE UM LACTÁRIO**, de autoria de: **Clara Souza da Conceição** (Autor), **Barbara Victor Souza** (Co-Autor), **Brendan Chaves Araújo** (Co-Autor), **Wallace Gohardi Rodrigues do Nascimento** (Co-Autor), **Jessica Marya Bithencourt Dias Vieira** (Co-Orientador), **Joselino dos Santos Nascimento** (Orientador), na modalidade de apresentação de pôster consentado.

Prof. Dr. Marcelo Eustáquio da Silva
Presidente do III CONAN VI COMAN

Ouro Preto, 31 de março de 2017

Prof. Dra. Joana Ferreira do Amaral
Vice-presidente do III CONAN VI COMAN



REALIZAÇÃO:



Anexo 4

Certificado da I Jornada de Pós Graduação. Instituto Federal do Rio de Janeiro/
Campus Rio de Janeiro, 08 de junho de 2017.



INSTITUTO FEDERAL
Rio de Janeiro



**I Jornada da
Pós-graduação**

CERTIFICADO

O trabalho intitulado "INIBIÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES POR ACINETOBACTER BAUMANNII/CALCOACETICUS E ENTEROBACTER CLOACAE ISOLADOS DE UTENSÍLIOS DE UM LACTÁRIO

", de autoria de "Cinara Souza da Conceição, Bárbara Victor Souza, Brendon Chaves Araújo, Wallace Galhardi Rodrigues do Nascimento, Jessica Manya Bittencourt Dias Vieira e Janaina dos Santos Nascimento

" foi apresentado na **I Jornada de Pós-Graduação**, evento concomitante à XI Jornada Interna de Iniciação Científica e Tecnológica e ao VI Fórum de Inovação, Tecnologia e Educação realizados no Instituto Federal de Educação,


Prof.ª Dr.ª Luciana Cardoso Nogueira
Diretora Geral de Pesquisa e Pós-graduação


Prof.ª Dr.ª Mira Wengert
Pro-Reitora de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação



PESQUISA
INICIAÇÃO
E PÓS-GRADUAÇÃO



CNPq
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



CAPES
COMISSÃO DE APOIO À PÓS-GRADUAÇÃO DE NÍVEL SUPERIOR



FAPERJ
FUNDAÇÃO DE Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

Anexo 5

Certificado do XII Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Unicamp
Campinas/ São Paulo, 04 a 07 de novembro de 2017.



The certificate is framed with a green and yellow border. At the top left is the SLACA logo. The top right contains the event title and dates. The center features the word 'Certificado' in a large green font, followed by the title of the work and the authors' names. Below this, it states where and when the work was presented. Three signatures are shown with their respective titles. At the bottom, there are logos for FAPESP, CNPq, CAPES, Slaca, FEA, and UNICAMP, along with a unique identification code.

**A Ciência de Alimentos e seu Impacto
no Mundo em Transformação** | 04 a 07 de Novembro 2017
Campinas - SP Unicamp

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado:
**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO NA PRODUÇÃO DA SAM JE6, UMA SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA
PRODUZIDA POR Acinetobacter baumannii/calcoaceticus ATIVA CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES**

de autoria de:
Cinara Conceição, Bárbara Victor Souza, Jessica Manya Bittencourt Dias Vieira, Janaína Nascimento

foi apresentado na SESSÃO de PÔSTER no 12 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: “A
Ciência de Alimentos e seu Impacto no Mundo em Transformação”, realizado de 4 a 7 de Novembro de 2017,
Campinas - São Paulo - Brasil.

Mário Roberto Maróstica Jr
Dr. Mário Roberto Maróstica Jr
Coordenador do Comitê de Programação

Juliano Lemos Bicas
Dr. Juliano Lemos Bicas
Coordenador do Comitê Científico

Gláucia Maria Pastore
Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do Evento

bfca4b0463cbd56e013e6baaca8da70b

FAPESP CNPq CAPES Slaca FEA UNICAMP