

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

NAIARA VITORIA FERREIRA CORTES KOPROVSKI

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA NISINA SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

**REALEZA
2021**

NAIARA VITORIA FERREIRA CORTES KOPROVSKI

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA NISINA SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Karina Ramirez Starikoff

REALEZA

2021

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Naiara Vitoria Ferreira Cortes Koprovski
ATIVIDADE IN VITRO DA NISINA SOBRE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA / Naiara Vitoria
Ferreira Cortes Koprovski . -- 2021.
26 f.:il.

Orientadora: Doutora Karina Ramirez Starikoff

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2021.

1. Microbiologia Veterinária. 2. Bacteriocinas. 3.
CIM. 4. CBM. I. Starikoff, Karina Ramirez, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NAIARA VITORIA FERREIRA CORTES KOPROVSKI

**ATIVIDADE IN VITRO DA NISINA SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 16/12/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Karina Ramirez Starikoff– UFFS
Orientadora

Méd.^a Vet.^a Adriane Ferreira Frizzo
Avaliador

Prof.^a Dra.^a Denise Maria Sousa de Mello- UFFS
Avaliador

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um sentimento genuíno, é ter a certeza de que algo ou alguém te proporcionou um benefício e dele se agregar sabendo do seu valor.

Agradeço primeiramente as forças divinas, sejam elas de **Deus** ou do **Universo**, por me conceberem força e coragem para lutar pelos meus sonhos, por me guiarem por bons caminhos e por me abençoarem com as pessoas boas que tive o prazer de ter ao meu lado nessa caminhada.

Agradeço minha mãe **Luzinete** por todo o amor que me dedica por ser minha inspiração meu exemplo de força, determinação e persistência. Agradeço ao meu pai **Claudinor** por seu amor e zelo. Pais, sem vocês nada seria possível, reconheço todo o esforço que fizeram para que esse sonho se concretiza-se.

Agradeço minha família em especial meus irmãos **Francisco, Alice, Mayara, Inácio e Arthur**, que não pouparam esforços quando precisei de auxílio e sempre foram aconchego e amor.

Com muito carinho e já um pouco de saudade agradeço meus **amigos e amigas**, pelas risadas, pelo colo, pelos puxões de orelha, pelas noites de estudo, pelas festas, pelos abraços, por tantas memórias e por nunca me deixarem parar. Vocês sempre serão parte de mim.

Agradeço meus colegas de laboratório por tornarem o trabalho menos árduo e mais prazeroso.

Agradeço aos meus estimados **professores** pelo conhecimento repassado, pela paciência e por não medirem esforços para formarem profissionais de excelência.

Por fim, com grande admiração agradeço minha querida orientadora **Karina Ramirez Starikoff**, por me orientar com maestria, estando sempre a pronto para solucionarmos as dificuldades e para me gerar novos desafios. Agradeço sobretudo por ser amiga.

RESUMO

Staphylococcus aureus é o agente bacteriano mais frequentemente isolado de casos de mastite bovina. Sua resistência aos antimicrobianos convencionais tem sido relatada e vem crescendo nas últimas décadas, realidade que se estende à maioria dos patógenos em medicina veterinária e humana. A nisina faz parte de um grupo de antibióticos naturais alternativos, chamado bacteriocinas, amplamente utilizada na conservação de alimentos e que vem apresentando potencial no uso clínico contra infecções. Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade *in vitro* de nisina livre sobre 25 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. A sensibilidade foi avaliada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo uso da técnica de microdiluição em placas de 96 poços com confirmação pelo revelador resazurina, e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), através do crescimento bacteriano em Ágar Mueller- Hinton. Os valores encontrados de CIM para *S. aureus* foram de 250 UI/ml (máximo) e 156, 25 UI/ml (mínimo) e para CBM de 625 UI/ml (máximo) e 250 UI/ml (mínimo). Os resultados permitem concluir que a nisina pura apresentou atividade considerável sobre cepas de *S. aureus in vitro* e que formulações contendo nisina representam uma alternativa para o tratamento de mastite ocasionada por esse agente. Com base na literatura mais estudos são necessários a fim de desenvolver formulações que garantam solubilidade, estabilidade e atividade em condições fisiológicas.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Lantibióticos; Microbiologia.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most isolated bacterial agent from cases of bovine mastitis. Its resistance to antimicrobials previously reported and has been growing in recent decades, the reality that extends to most pathogens in veterinary and human medicine. Nisin is part of a group of alternative natural antibiotics, called bacteriocins, widely exploited in food preservation and which has potential in clinical use against variations. Thus, the objective was to evaluate the in vitro activity of free nisin on 25 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. The sensitivity was evaluated through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using microdilution in 96-well plates with confirmed by resazurin developer, and by Minimum Bactericidal Concentration (MBC) through bacterial growth on Mueller-Hinton Agar. The MIC values found for *S. aureus* were 250 IU / ml the maximum and 156, 25 IU / ml the minimum and for CBM values of 625 IU / ml the maximum and 250 IU / ml the minimum. The results allow us to conclude that pure nisin showed considerable activity on strains of *S. aureus* and that formulations containing nisin represent an alternative for the treatment of mastitis caused by this agent. Based on the literature, further studies are in order to develop formulations that ensure solubility, stability and activity under physiological conditions.

Keywords: Anti-bacterial; Lantibiotics; Microbiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) com desvios padrão da atividade de nisina em UI/ml sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina (n=25).....	16
Figura 2 – Atividade antimicrobiana de nisina livre sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite bovina (n=25)	17
Figura 3 – Mecanismo de interação da nisina com a células alvo.....	18

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAL E METÓDOS.....	13
2.1	ESTOCAGEM E MANUTENÇÃO DAS CEPAS MICROBIANAS	13
2.2	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NISINA	13
2.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	13
2.3.1	Padronização da suspensão	13
2.3.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	14
2.3.3	Confirmação da CIM com revelador	14
2.3.4	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	15
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
	REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma enfermidade caracterizada pela inflamação das glândulas mamárias causada principalmente por bactérias e fungos que possui alta prevalência nos rebanhos leiteiros (PERES NETO e ZAPPA, 2011). O *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais frequentes e problemáticos isolado de casos de mastite, devido à sua natureza crônica, altamente contagiosa e a sua incurabilidade relativa em rebanhos leiteiros (BANDOCH e MELO, 2011; ZIMERMANN e ARAÚJO, 2017).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae. São cocos gram positivos imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. Sua organização pode variar, apresentando-se desde isolados, pares, em cadeias, ou agrupados irregularmente. O *S. aureus* caracteriza-se por ser uma bactéria anaeróbia facultativa, coagulase e catalase positiva, sua temperatura ótima de crescimento encontra-se entre 35 a 37° C pertencendo ao grupo dos microrganismos mesófilos. Outra característica importante é a tolerância a concentrações de 10 a 20% de cloreto de sódio, seu crescimento pode ser observado em ambientes com valores de pH entre 4,5 e 9,3, atingindo crescimento ótimo em valores de pH entre 6,0 e 7,0 (RODRIGUES; DOS SANTOS; GELATTI, 2012; TAYLOR e UNAKAL, 2021).

Os fatores de virulência do *S. aureus* envolvem a liberação de enzimas e toxinas como as hialuronidases, catalases, coagulases, beta-lactamases, lipases, proteases e esterases que facilitam a destruição celular a sua multiplicação e disseminação no tecido invadido (TAYLOR e UNAKAL, 2021). Na fase de crescimento exponencial, proteínas de superfície (como proteína A), proteínas de ligação (de elastina, de colágeno, de fibronectina) e fator de aglutinação desempenham papéis importantes (GAJDÁCS, 2019). Muitas outras estratégias de sobrevivência podem ser descritas, como a inativação da fixação do complemento, neutralização da fagocitose e inibição da resposta imune do hospedeiro, celular e humoral. Além disso a virulência deste microrganismo também está ligada a capacidade de formação do biofilme (TEIXEIRA e FIGUEIREDO, 2019).

A resistência do *S. aureus*, isolados de casos de mastite, tem sido relatada principalmente para formulações contendo antimicrobianos do grupo dos betalactâmicos, com destaque para penicilina. Sendo a produção de betalactamases o principal mecanismo de resistência (RODRIGUES; DOS SANTOS; GELATTI, 2012). Outros princípios ativos como a tetraciclina e a cefalotina têm apresentado maior eficácia em testes in vitro (CARVALHO *et al.*, 2018). Todavia, no contexto da saúde única o combate ao surgimento de novas cepas

bacterianas multirresistentes é necessário e deve preconizar a redução do uso de antimicrobianos convencionais e priorizar o uso de princípios ativos naturais (RANI *et al.*, 2021).

Considerando a crescente importância dada às infecções e o desenvolvimento progressivo da resistência microbiana a antibióticos, muitas pesquisas vêm buscando uma alternativa em produtos naturais como uma nova perspectiva para tratamentos de doenças, incluindo a mastite bovina (SOLTANI *et al.*, 2021). Podem ser considerados antibióticos naturais alternativos as bacteriocinas, bacteriófagos, probióticos e peptídeos antimicrobianos (RANI *et al.*, 2021).

Dentre as alternativas naturais citadas, destaca-se o grupo dos lantibióticos ou bacteriocinas (SOLTANI *et al.*, 2021). Os lantibióticos são peptídeos ribossomicamente sintetizados que são definidos pela presença de aminoácidos incomuns, incluindo lantionina e/ou metillantionina (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

Dentro do grupo das bacteriocinas uma das substâncias mais estudadas é a nisina. A mesma é produzida por *Lactococcus lactis*, e exibe atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de bactérias gram positivas. A nisina pertence a um grupo de antimicrobianos peptídicos catiônicos chamados coletivamente de lantibióticos do tipo I (SHIN *et al.*, 2016; FIELD *et al.*, 2016).

Devido ao alto teor de lipídios aniônicos na membrana plasmática de bactérias gram positivas, as bacteriocinas interagem mais com as membranas dessas bactérias, causando a abertura de poros e extravasamento de componentes celulares (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

A nisina foi o primeiro lantibiótico identificado, sendo descoberta em 1928, utilizada principalmente como conservante alimentar, por mais de 50 países, incluindo o Brasil (KIM *et al.*, 2010). Majoritariamente os estudos sobre a utilização biotecnológica da nisina são com foco na indústria de alimentos, porém seu potencial terapêutico na medicina humana e veterinária também tem sido estudado (FIELD *et al.*, 2015).

A nisina é um peptídeo antimicrobiano composto por 34 aminoácidos e possui cerca de cinco variantes naturais. Essa variação ocorre em função do posicionamento dos seus elementos. Nisina A e Z diferem apenas pelo posicionamento de um elemento na posição 27, sendo encontrada histidina para A e asparagina para Z. Também são produzidas por espécies de *Lactococcus lactis*, assim como a nisina Q e F. Outras variantes podem ser sintetizadas por outras bactérias ácido lácticas. Essas pequenas variações conferem características biológicas diferentes apesar da atividade semelhante, a nisina Z provou maior taxa de difusão e

solubilidade em pH neutro (BAHRAMI *et al.*, 2019; HAYES *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2021).

Estudos apontam que além da baixa resistência microbiana, a nisina apresenta como vantagem em relação aos antibióticos a segurança alimentar e baixa toxicidade celular (TEODORO, 2012; SOLTANI *et al.*, 2021). Desse modo, o tratamento com nisina se constitui como um potencial método natural de redução de carga bacteriana e tratamento da mastite (CEOTTO-VIGODER *et al.*, 2016).

Diante da característica promissora desta bacteriocina no tratamento de processos infecciosos o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* de nisina livre sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

2 MATERIAL E METÓDOS

No estudo foram avaliadas 25 cepas de *S. aureus* provenientes de casos de mastite bovina doadas pela Universidade de São Paulo (USP – SP). As análises microbiológicas foram desenvolvidas no laboratório de microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - Campus Realeza.

2.1 ESTOCAGEM E MANUTENÇÃO DAS CEPAS MICROBIANAS

Afim de conservar e estocar as cepas de *S. aureus*, 10 µL de cada cepa foram inoculados individualmente em eppendorfs contendo 800 µL de caldo Müeller-Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerina estéril, com auxílio de uma alça de platina, e mantidos em ultrafreezer, a uma temperatura de -80 °C (inóculo mãe).

2.2 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NISINA

Para a preparação da solução estoque utilizou-se nisina (Sigma-Aldrich, código N5764-1G) na concentração correspondente a 2,5%, sendo que 1 µg de nisina pura equivale a 40 UI/mL (HURST, 1981). Dilui-se o pó de nisina em HCL (pH 2) para perfazer a concentração de 40.000 UI/ml. A solução estoque foi mantida em refrigeração até a sua utilização (TONG *et al.*, 2010).

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.3.1 Padronização da suspensão

A partir do inóculo mãe, retirou-se uma alçada de 10 µL da cepa bacteriana que foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo BHI incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, padronizou-se a concentração bacteriana em solução salina até atingir 0,5 na escala McFarland. A padronização foi confirmada no espectrofotômetro, considerando absorbâncias

de 0,08 a 0,13 Å em comprimento de onda de 625 nm, o que representa $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (CLSI, 2015).

2.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM empregou-se a técnica de microdiluição em microplacas (CLSI, 2015). Inicialmente, realizou-se a diluição da solução estoque de nisina em eppendorfs contendo água destilada estéril para perfazer as concentrações iniciais de 10.000 UI/ml e 4.000 UI/ml. Com o auxílio de uma pipeta multicanal foi realizada a distribuição de 60 µL de Caldo Muller-Hinton (MH) nos poços de uma placa de microtitulação, em seguida 60 µL de nisina foram depositados nos poços da primeira linha, na concentração de 10.000 UI/ml ou 4.000 UI/ml de acordo com a microdiluição desejada. Posteriormente, foram repassados 60 µL dos poços da primeira linha para a segunda e assim, sucessivamente, fazendo uma microdiluição, obtendo-se concentrações finais de: 2500, 1250, 1000, 625, 500, 312, 5, 250, 156,25 UI/ml. Por fim, foram adicionados 60 µL de cultura padronizada a cada poço da microplaca exceto nos controles de nisina.

Para o controle negativo, foram adicionados 60 µL de caldo MH e 60 µL de nisina diluída nas concentrações de 10.000 UI/ml e 4.000 UI/ml. Para o controle positivo foram adicionados 60 µL de caldo MH, 60 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 60 µL de cultura padronizada. Esses ensaios foram realizados em triplicata.

As microplacas foram identificadas e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, realizou-se a leitura de absorbância em 605 nm no equipamento Elisa Multiskan FC (Thermo Scientific). A CIM foi interpretada como o poço de menor concentração de nisina capaz de inibir o crescimento bacteriano.

2.3.3 Confirmação da CIM com revelador

O revelador resazurina (cód. R7017, Sigma-Aldrich®) foi utilizado como indicador de metabolismo bacteriano. Com as placas já incubada por 24 horas contendo a microdiluição de nisina e inóculo, 15 µL de reagente na concentração de 0,01% foi adicionado aos poços da microplaca, posteriormente as placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora. A coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano e a coloração rosa/vermelha indica metabolismo

bacteriano. Por motivos de reação química a coloração azul não foi observada, portanto considerou-se a CIM na menor concentração que antecedeu a coloração rosa/vermelha (ARAUJO e LONGO, 2016).

2.3.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A partir da determinação da CIM com revelador resazurina, realizou a cultura em ágar a partir do poço indicador, semeando ainda dois poços para cima e dois poços para baixo. Ou seja, a concentração referente a CIM, duas concentrações inferiores e duas concentrações superiores. A cultura foi efetuada, com auxílio de uma alça de platina, 10 µL de cada poço selecionado da microplaca foram replicadas em placas de Ágar Mueller Hinton e incubadas a 37 °C/24 horas (ROZATTO, 2012; BONA *et al.*, 2014). A CBM foi interpretada como a menor concentração de nisina capaz de promover ausência total de crescimento bacteriano após incubação (BONA *et al.*, 2014).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados foi utilizado o programa Microsoft Excel® 2019 para tabulação, cálculo e confecção dos gráficos. Os dados foram analisados através de estatística descritiva (valores mínimos; máximos; médios e desvio padrão).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

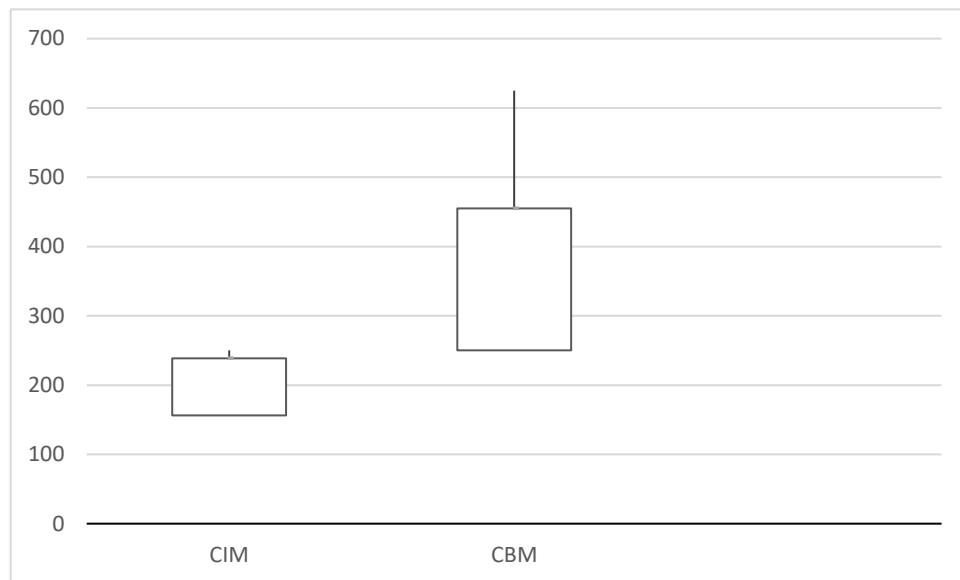
Todas as cepas de *S. aureus* testadas apresentaram susceptibilidade à nisina livre, os valores encontrados de CIM foram de 250 UI/ml o máximo e 156, 25 UI/ml o mínimo e para CBM valores de 625 UI/ml o máximo e 250 UI/ml o mínimo. Das cepas estudadas, 68% apresentaram CBM igual a 500 UI/ ml e 88% para valores de CIM igual a 250 UI/ml. A representação dos dados pode ser visualizada nas Figura 1 e Figura 2.

Figura 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) com desvios padrão da atividade de nisina em UI/ml sobre cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina (n=25)

Cepa	CIM	CBM
1138	250 ± 5,625	500 ±22,5
828	250 ± 5,625	312,5 ±71,25
487	250 ± 5,625	250 ±102,5
109	250 ± 5,625	500 ± 22,5
486	250 ± 5,625	500 ± 22,5
331	250 ± 5,625	500 ± 22,5
695	250 ± 5,625	500 ± 22,5
3512	250 ± 5,625	312,5 ±71,25
994	250 ± 5,625	250 ±102,5
700	250 ± 5,625	625 ± 85
608	250 ± 5,625	500 ± 22,5
690 EE3	250 ± 5,625	500 ± 22,5
690 EE2	250 ± 5,625	500 ± 22,5
690 EE1	250 ± 5,625	500 ± 22,5
833 sp	250 ± 5,625	250 ±102,5
282 EE11	250 ± 5,625	500 ± 22,5
282 EE12	250 ± 5,625	625 ± 85
861	250 ± 5,625	500 ± 22,5
305	250 ± 5,625	500 ± 22,5
861 sp2	250 ± 5,625	500 ± 22,5
649 sp	250 ± 5,625	500 ± 22,5
519	156,2 ± 41,25	500 ± 22,5
410	156,2 ± 41,25	250 ±102,5
608 sp2	156,3 ± 41,25	500 ± 22,5
649 sp2	250 ± 5,625	500 ± 22,5

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Figura 2 – Atividade antimicrobiana de nisina livre sobre cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina (n=25)

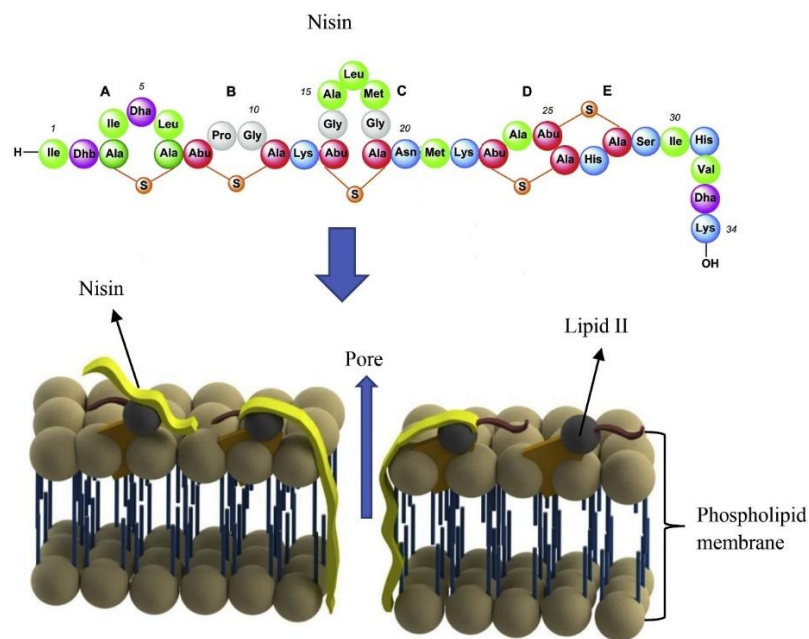


Fonte: Elaborado pela autora (2021)

As bacteriocinas atuam especialmente contra bactérias gram-positivas provocando a formação de poros na membrana plasmática de bactérias (VAN DE VEN *et al.*, 1991; PINTO, 1996; FIELD *et al.*, 2016). Essas substâncias diferem dos antibióticos com relação a síntese, modo de ação, espectro antimicrobiano, mecanismo de toxicidade e resistência (CLEVELAND, 2001; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

O mecanismo de ação da nisina consiste na adsorção na superfície da célula-alvo e desestabilização da estrutura da membrana citoplasmática dos microrganismos, conforme pode ser observado na Figura 3. Esta adsorção envolve interações eletrostáticas entre nisina com uma carga positiva líquida e os fosfolipídios de membrana carregados negativamente. Essa interação ocorre por meio de ligação específica ao lipídeo II, um precursor essencial da parede celular bacteriana, molécula que desempenha um papel central na construção da parede por meio do transporte de monômeros de peptidoglicano de dentro para fora. Esta ação combinada é mediada por 2 domínios estruturais localizados nos terminais N e C. A hidrofobicidade da extremidade N-terminal da nisina atua subsequentemente para permitir a inserção da nisina na membrana da célula lipídica levando à sua permeabilização. A ligação ao lipídeo II induz uma orientação transmembrana da nisina e o poro formado é composto por oito moléculas de nisina e quatro moléculas do lipídeo II (CLEVELAND *et al.*, 2001; ASADUZZAMAN e SONOMOTO, 2009; FIELD *et al.*, 2015; GHARSALLAOU *et al.*, 2016; BAHRAMI, A. *et al.*, 2019).

Figura 3 - Mecanismo de interação da nisina com a célula alvo



Fonte: BAHRAMI, A. *et al.*, (2019, p. 22)

A formação dos poros resulta na perda de potencial de membrana e vazamento do conteúdo intracelular, rápido efluxo de íons e solutos citoplasmáticos, e o deslocamento do lipídeo II inibe a síntese da parede celular. Este duplo mecanismo de ação resulta em morte celular. A eficácia dessa integração depende da natureza e do conteúdo dos fosfolipídios da membrana celular, o que pode explicar as diferenças de sensibilidade entre as cepas bacterianas alvo (GHARSALLAOU *et al.*, 2016; RANI *et al.*, 2021).

O mecanismo duplo de ação da nisina dificulta o desenvolvimento de resistência bacteriana em condições naturais. No entanto, estudos *in vitro* buscam elucidar os mecanismos pelos quais a resistência pode vir a ocorrer, para que estratégias sejam adotadas a fim de prevenir mutações e proporcionar seu uso clínico. Conforme vários autores, a resistência à nisina pode ser inata ou adquirida por diferentes mecanismos, mesmo entre cepas da mesma espécie bacteriana (DE FREIRE BASTOS; COELHO; DA SILVA, 2015).

Os principais mecanismos de resistência relatados para bactérias gram-positivas consistem em alterações de membrana. A mudança na composição lipídica pode resultar em aumento da rigidez da membrana e/ou alteração de carga, e também podem ocorrer alterações na permeabilidade ou espessura da parede celular. A produção de proteínas de resistência que inativam a nisina também é relatada em algumas cepas. A modificação dos ácidos lipoteicóicos

pode interferir na interação eletrostática entre nisina e a célula-alvo (BLAKE *et al.*, 2011; RANDALL *et al.*, 2018; BARBOSA *et al.*, 2021).

Mudanças na expressão gênica de *S. aureus* foram relatadas a partir de estudos *in vitro* envolvendo genes para transportadores ABC, que consistem em sistemas de dois componentes localizados transmembrana que realizam transporte ativo da molécula para fora da célula como um módulo de desintoxicação, representando um mecanismo de resistência (DRAPER *et al.*, 2015; RANDALL *et al.*, 2018).

Estratégias de bioengenharia têm produzido derivados precursores de nisina com maior atividade para determinados patógenos e melhores propriedades farmacológicas e físico-químicas (FIELD *et al.*, 2015).

Os valores encontrados para CIM nesta pesquisa corroboram com os da literatura. Felício *et al.* (2013) realizaram estudo *in vitro* com *S. aureus* isolados de queijos minas artesanal e encontraram resultados inibitórios satisfatórios na concentração de 400 a 500 UI ml⁻¹. Ceotto-Vigoder *et al.* (2016) realizaram ensaios de atividade antimicrobiana de nisina sobre isolados de *S. aureus* envolvidos em mastite clínica ou subclínica e encontraram valores de concentração inibitória mínima entre 15.6 a 500 µg ml⁻¹ para nisina.

De acordo com Delves - Broughton *et al.* (1996), após o tratamento intramamário da mastite com nisina, foram observadas altas taxas de cura sendo de 66% para *S.aureus*, 95% *Streptococcus agalactiae* e 100% para *Streptococcus uberis*. Além disso, foram demonstradas reduções significativas na contagem de células somáticas nas glândulas curadas.

Angelopoulou *et al.* (2020) relataram a eficácia de vancomicina e de nisina contra isolados de *S. aureus* multirresistentes isolados do leite humano, em relação à nisina os isolados exibiram uma faixa de CIM de 1,875 µg mL⁻¹ a 15 µg mL. Todavia os resultados da associação foram superiores ao uso isolado de vancomicina e nisina, em especial no combate à formação de biofilme.

Cao *et al.* (2007) avaliaram a eficácia da nisina no tratamento de mastite clínica em vacas leiteiras e dos casos ocasionados por *S. aureus* 82,5% foram resistentes à penicilina e 35,3% a gentamicina, mas nenhum à nisina. Neste estudo um tratamento *in vivo* de infusão intramamária de nisina em uma dose de 2.500.000 UI duas vezes ao dia por 3 dias para terapia de mastite foi descrito com sucesso para infecções ocasionadas por *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus*. Todavia, a formulação consistiu na dissolução de nisina em 20mL de solução salina fisiológica estéril, ocasionando provavelmente em contato com o ambiente mamário doente uma desestabilização do pH ideal e redução da atividade implicando nas doses elevadas utilizadas. Evidenciando a necessidade do desenvolvimento de formulações apropriadas.

Finhler e colaboradores (2020) realizaram teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão para as mesmas cepas de *S. aureus* utilizadas neste estudo e identificaram que 89% das cepas apresentaram resistência a Penicilina G, antibiótico comumente utilizado na terapêutica veterinária.

Os resultados encontrados para CIM e CBM de *S. aureus* isolados de mastite reafirmam o potencial da nisina no tratamento de infecções intramamárias, outras características como sucesso na atividade contra biofilme de *S. aureus* dessa bacteriocinas tem sido relatada, instigando a realização de mais trabalhos na área uma vez que a formação de biofilme resulta em resistência à interferência mecânica, mecanismos de defesa do hospedeiro e agentes antimicrobianos (CEOTTO-VIGODER *et al*, 2016; ANGELOPOULOU *et al.*, 2020).

Apesar do potencial terapêutico da nisina, a sua utilização em ampla escala é comprometida devido à sua baixa solubilidade e estabilidade em meios alcalinos (pH>7,0) (HURST, 1981). O pH do leite fresco apresenta reação ligeiramente ácida, variando entre 6,6 e 6,8 no entanto o leite de glândulas mamárias com mastite fica alcalino e pode chegar de 7,3 a 7,5 prejudicando a ação de bacteriocinas naturais como a nisina (PALII *et al*, 2020). Devido à degradação da nisina, é recomendável utilizá-la em conjunto com outros métodos de conservação, como por exemplo, atmosfera modificada, temperaturas reduzidas ou veículos que aumentem o seu tempo de ação (CLEVELAND *et al*, 2001). Novas tecnologias como os sistemas de nano-entrega têm sido descritas com sucesso nos experimentos para indústria alimentícia (BAHRAMI *et al.*, 2019).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os problemas relacionados a resistência dos microrganismos aos antibióticos convencionais tendem a serem agravados ao longo dos anos e as bacteriocinas apresentam-se como uma alternativa eficaz. A bacteriocina nisina apresentou atividade considerável frente as cepas isoladas de casos de mastite bovina avaliadas neste estudo. As variações encontradas podem resultar das interações específicas entre cada célula alvo.

O uso clínico de nisina na medicina veterinária para o tratamento de infecções mamária ocasionadas por *S. aureus* exige o desenvolvimento de modelos de entrega compatíveis com as condições fisiológicas da glândula mamária a fim de garantir solubilidade, difusão e atividade considerável em baixas concentrações.

Combinações de nisina com antibióticos convencionais devem ser estudas com a finalidade de reduzir as concentrações necessárias e prevenir o desenvolvimento de resistência. Além disso a bioengenharia tem apresentado precursores de nisina com maior atividade, aumentando as perspectivas para suas aplicações clínicas futuras.

REFERÊNCIAS

ANGELOPOULOU, A. *et al.* Vancomycin and nisin A are effective against biofilms of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human milk. **Plos um** , v. 15, n. 5, pág. e0233284, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0233284#pone.0233284.ref028>. Acesso em: 27 nov. 2021.

ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. In vitro antibacterial activity of *Origanum vulgare* (oregano) essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains . **Arq. Inst. Biol**, vol.83, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aib/v83/1808-1657-aib-83-e0702014>. Acesso em: 30 mar. 2020.

ASADUZZAMAN, S. M.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 475-487, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172309000152>. Acesso em: 21 nov. 2021.

BAHRAMI, A. *et al.* Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry. **Trends in Food Science & Technology** , v. 94, p. 20-31, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224419304169>. Acesso em: 27 nov. 2021.

BANDOCH, P.; MELO, L. D. S. D. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. **Publicatio UEPG: biological and Health Sciences**, Ponta Grossa, v. 17, n. 1, p. 47-51, 2011. Disponível em: http://www.faeF.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/iiMuWph9FeZmrV3_2013-6-27-15-44-49.pdf . Acesso em 23 mar. 2020.

BARBOSA, A. A. T, *et al.* Nisin resistance in Gram-positive bacteria and approaches to circumvent resistance for successful therapeutic use. **Critical Reviews in Microbiology** 47.3 (2021): 376-385. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2021.1893264?scroll=top&needAccess=true>. Acesso em: 27 nov. 2021

BLAKE, K. L. *et al.* Estudos in vitro indicam um alto potencial de resistência ao lantibiótico nisina em *Staphylococcus aureus* e definem uma base genética para a resistência à nisina. **Agentes antimicrobianos e quimioterapia** , v. 55, n. 5, pág. 2362-2368, 2011. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.01077-10>. Acesso em 21 nov. 2021.

BONA, E. A. M. D. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S180816572014000300218&script=sci_arttext&tlng=pt . Acesso em: 29 out. 2020.

CAO, L.T. *et al.* . Efficacy of Nisin in Treatment of Clinical Mastitis in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, p.3980–3985, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207718544>. Acesso em: 28 out. 2020.

CARVALHO, A. S. S. *et al.* Susceptibilidade de Staphylococcus aureus isolados de leite cru a antibióticos comerciais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cab/a/KnBwF844QdmwhTKLNzqQytH/abstract/?lang=pt>. Acesso em 25 nov. 2021.

CEOTTO-VIGODER H. *et al.*. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of Staphylococcus aureus involved in bovine mastitis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 1, pág. 101-114, 2016. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13136> .Acesso em: 25 mar. 2020.

CLEVELAND, J. *et al.* Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International journal of food microbiology**, v. 71, n. 1, pág 1-20, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8). Acesso em: 24 mar. 2020.

CLSI – MANUAL CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Discodifusão: **Norma Aprovada**, vol. 23, n.1. 2015. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf. Acesso em: 05 nov. 2021.

DE FREIRE BASTOS, M. C.; COELHO, M. L. V.; DA SILVA O. C. S. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **Microbiology**, v. 161, n. 4, p. 683-700, 2015. Disponível em: https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.082289-0;jsessionid=Sy08qi9sexBivmT_RilxF8yL.mbslive-10-240-10-112. Acesso em 26 nov. 2021.

DELVES-BROUGHTON, J. *et al.* Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, n. 2, p. 193-202, 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00399424>. Acesso em: 29 out. 2020.

DRAPER, L. A. *et al.* Lantibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 2, p. 171-191, 2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MMBR.00051-14>. Acesso em: 02 dez. 2021.

FELÍCIO, B. A. *et al.* Efeito in-vitro de nisina sobre pool de Staphylococcus aureus isolados de queijos minas artesanais da região do Campo das Vertentes-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 391, p. 19-23, 2013. Disponível em: <https://revistadoilct.com.br/rilct/article/viewFile/17/17>. Acesso em: 29 out. 2020.

FIELD, D. *et al.* Bioengenharia do modelo lantibiótico nisina. **Bioengineered**, v. 6, n. 4, pág. 187-192, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2015.1049781?src=recsys>. Acesso em: 25 nov. 2021.

FIELD, D. *et al.* In Vitro Activities of Nisin and Nisin Derivatives Alone and In Combination with Antibiotics against Staphylococcus Biofilms. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00508/full>. Acesso em: 11 abr. 2020.

FINHLER S. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca alternifolia (tea tree oil) sobre agentes infecciosos isolados de bovinos acometidos por mastite. In: X JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 10^{o.}, 2020, Realeza. Anais eletrônicos. Realeza, 2020. Disponível em: <https://portaleventos.uuffs.edu.br/index.php/JORNADA/issue/view/112>. Acesso em 07 dez. 2021.

GAJDÁCS, M. The continuing threat of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 52, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/2/52/htm#B21-antibiotics-08-00052>. Acesso em : 25 nov. 2021.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262-1274, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224419304169>. Acesso em 25 nov. 2021.

HAYES, K. *et al.* A novel bioengineered derivative of nisin displays enhanced antimicrobial activity against clinical Streptococcus agalactiae isolates. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 19, p. 14-21, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716519300992>. Acesso em: 07 dez. 2021.

HURST, A. Nisin. **Advances in applied microbiology**, v. 27, pág. 85-123, 1981. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216408703423>. Acesso em: 29 out. 2020.

KIM, S. Y *et al.* In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by Staphylococcus species isolated from bovine mastitis. **Journal Of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p.3610-3615, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030210003802>. Acesso em: 1 abr. 2020.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L.; Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 18, n. 4, p.267-276, 2015. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1981-67232015000400267&script=sci_arttext Acesso em: 1 abr. 2020

PALII, A. P. *et al.* Composição de espécies da microbiota do úbere de vacas e qualidade do leite cru na mastite. **Jornal Ucrainiano de Ecologia** , v. 10, n. 4, 2020. Disponível em: <http://lib.udau.edu.ua/bitstream/123456789/7572/1/%D0%A1%D1%82%D0%B0%D1%82%D1%82%D1%8F.pdf>. Acesso em 27 nov. 2021.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite Em Vacas Leiteiras- Revisão De Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 16, n. 1, p.128, jan. 2011.

Disponível

em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5birfPwQOBxdHFp_2013-6-26-11-19-44.pdf. Acesso em: 29 out. 2020.

PINTO, Maria Eugênia Ribeiro. **Estudo da ação antibacteriana da nisina**. 1996. 207f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 1996. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/10189>. Acesso em: 29 out. 2020.

RANDALL, C. P. *et al.* Acquired nisin resistance in *Staphylococcus aureus* involves constitutive activation of an intrinsic peptide antibiotic detoxification module. **Msphere**, v. 3, n. 6, p. e00633-18, 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mSphereDirect.00633-18>. Acesso em: 27 nov. 2021.

RANI, A. *et al.* Uma revisão sobre produtos derivados de microrganismos como agentes antimicrobianos potenciais. 2021. Disponível em: <https://www.preprints.org/manuscript/202107.0237/v1>. Acesso em 26 nov. 2021.

RODRIGUES, F. M.; DOS SANTOS, O; GELATTI, L. C. *Staphylococcus aureus*: uma revisão. **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 1, n. 2, p. 90-101, 2012. Disponível em: <https://revista.fasem.edu.br/index.php/fasem/article/view/10>. Acesso em 27 nov. 2021.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda**. 2012. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012. Disponível em: <https://www2.fcfa.unesp.br/Home/Pos-graduacao/CienciasFarmaceuticas/MARIANA%20RODRIGUES%20ROZATTO.pdf>. Acesso em: 29 out. 2020.

SHIN, J. M. *et al.* Biomedical applications of nisin. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1449-1465, 2016. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.13033>. Acesso em: 20 out. 2020.

SOLTANI, S. *et al.* Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. **FEMS microbiology reviews**, v. 45, n. 1, p. fuaa039, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/45/1/fuaa039/5900525?login=true>. Acesso em: 27 nov. 2021.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus aureus*. **StatPearls**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868>. Acesso em: 26 nov. 2021.

TEIXEIRA, C. M. S.; FIGUEIREDO, M. A. Qualidade microbiológica do leite bovino no Brasil associada à *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 1, p. 196-216, 2019. Disponível em:

<https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevCiVet/article/view/41172/pdf>. Acesso em: 26 nov. 2021.

TEODORO, V. A. M. **Efeito da Nisina na multiplicação de *Staphylococcus aureus* e nas características físico-químicas, reológicas e microbiológicas do queijo minas artesanal da Serra da Canastra - MG**. 2012. 138f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2012. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/455>. Acesso em: 29 out. 2020.

TONG, Z. *et al.* Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. **Peptides**, v. 31, n. 11, p. 2003-2008, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978110003281>. Acesso em: 29 out. 2020.

VAN DE VEN, F. J. M *et al.* NMR studies of lantibiotics: the structure of nisin in aqueous solution. **European Journal Of Biochemistry**, v. 202, n. 3, p.1181-1188, 1991. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16488.x>. Acesso em 11 abr. 2020.

ZIMERMANN, K. F.; ARAUJO, M. E. M. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Campo Digital**, v. 12, n. 1, 2017. Disponível em: <http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/campodigital/article/view/2015>. Acesso em: 23 mar. 2020.