

Lívia Castelani

**Uso de bacteriocina e nanofragmentos de lípides catiônicos
contra *Staphylococcus* spp. resistentes isolados de mastite
bovina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

Versão original

**São Paulo
2016**

RESUMO

CASTELANI, L. **Uso de bacteriocina e nanofragmentos de lípidos catiônicos contra *Staphylococcus* spp. resistentes isolados de mastite bovina.** 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2016.

Staphylococcus spp. são reportados com um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina, onde a diversidade de fatores de virulência e elevada resistência antimicrobiana contribuem para o prognóstico desfavorável da infecção. Com relação aos tratamentos, muitos dos antimicrobianos comercialmente disponíveis para a mastite bovina geram resíduos que alteram a qualidade e segurança alimentar do leite e seus derivados. Neste cenário, a busca por novas alternativas de controle e tratamento tornam-se imprescindíveis. Bacteriocinas e nanopartículas têm emergido como alternativas promissoras para futuros desenvolvimentos de agentes antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana da bacteriocina nisina (NS), de nanofragmentos do lípido catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA) e do complexo NS/DDA contra cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes isoladas de mastite de novilhas primíparas e vacas em lactação, de rebanhos leiteiros de diferentes propriedades experimentais e comerciais. Para todos os isolados, o perfil de sensibilidade antibacteriana foi determinado por difusão de disco e a atividade *in vitro* da nisina e DDA foi avaliada pela determinação da concentração bactericida mínima (CBM). O efeito sinérgico do complexo NS/DDA foi determinado através do método de *checkerboard* e estudo de *time-kill*. A viabilidade celular foi adicionalmente avaliada por microscopia de fluorescência. O tamanho (nm), polidispersibilidade e potencial zeta (ζ) dos complexos NS/DDA e a sua interação com uma cepa representativa de *S. aureus* foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A CBM_{50} da nisina foi de 50 $\mu\text{g/mL}$ e a CBM_{50} do DDA foi de 4 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a CBM_{50} do complexo NS/DDA foi 3/2 $\mu\text{g/mL}$ (efeito parcialmente sinérgico, ΣFBC entre $> 0,5 - \leq 1,0$). O estudo de *time-kill* revelou uma redução de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL após uma hora de interação entre o complexo NS/DDA e a bactéria. De fato, a microscopia de fluorescência confirmou uma perda da viabilidade após 6 horas de interação. A interação NS/DDA resultou em um complexo catiônico (+8,84 mV) na escala nanométrica (148,5 nm), o que contribui para a adesão à superfície bacteriana negativa (-27,32 mV), favorecendo a ação bactericida do complexo. O complexo NS/DDA se mostrou como uma alternativa promissora para o controle de *Staphylococcus* spp. resistentes isolados de mastite bovina.

Palavras-chave: Brometo de dioctadecildimetilamônio. Mastite bovina. Nisina. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus* coagulase negativa.

ABSTRACT

CASTELANI, L. **Use of bacteriocin and cationic lipid nano-fragments against resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis.** 2016. 71 p. Ph.D. Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2016.

Staphylococcus spp. are reported as a major etiological agent of bovine mastitis, where the diversity of virulence factors and high antimicrobial resistance profiles contribute to the poor prognosis of the infection. With regard to treatments, many of the commercially available antimicrobials for bovine mastitis generate waste that alters the food quality and safety of milk and dairy products. In this scenario, the search for new alternatives for control and treatment become essential. Bacteriocins and nanoparticles have emerged as promising alternatives for future development of antimicrobial agents. The aim of this study was to evaluate the “in vitro” antibacterial activity of the bacteriocin nisin (NS), cationic lipid nano-fragments of dioctadecyldimethylammonium bromide (DDA) and NS/DDA complex against drug-resistant *Staphylococcus* spp. strains isolated from mastitis in primiparous heifers and lactating dairy cows in herds from both experimental and commercial properties. For all isolates, the antibacterial susceptibility profile was determined by disk-diffusion method and the “in vitro” activity of nisin and DDA was evaluated by determining the minimum bactericidal concentration (MBC). Synergistic effect of NS/DDA complex was determined by time-kill and checkerboard methods. Cell viability was further evaluated by fluorescence microscopy. The size (nm), polydispersity and zeta potential (ζ) of NS/DDA complex, as well as, their interaction with a representative strain of *S. aureus* were determined by dynamic light scattering (DLS). For nisin and DDA the MBC_{50} was 50 and 4 $\mu\text{g/mL}$, respectively, whereas MBC_{50} of NS/DDA was 3/2 $\mu\text{g/mL}$ (partially synergistic effect, ΣFBC from > 0.5 to ≤ 1.0). Time-kill studies with NS/DDA revealed $\geq 3 \log_{10}$ CFU/mL at an hour interaction. In fact, fluorescence microscopy confirmed loss viability after six hours interaction. NS/DDA assemblies resulted in cationic complexes (+ 8.84 mV) at nanoscale (148.5 nm), which contributes for the interaction with the negatively charged bacterial surface (-27.32 mV), favoring the bactericidal action of the NS/DDA complex. The NS/DDA complex has shown to be a promising alternative for the control of drug-resistant *Staphylococcus* spp. strains isolated from bovine mastitis.

Keywords: Dioctadecyldimethylammonium bromide. Bovine mastitis. Nisin. *Staphylococcus aureus*. Coagulase-negative *Staphylococcus*.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira possui importância significativa na economia brasileira, devido ao relevante papel no fornecimento de alimentos, assim como na geração de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia produtiva. Ao mesmo tempo, o Brasil é um país com grande potencial de exportação de leite no mercado mundial. Porém, o leite produzido aqui possui baixa qualidade, limitando a transformação industrial a produtos de baixo valor agregado e sem padrão de mercado (VIANA; RINALDI, 2010). Um dos principais fatores relacionados com a redução da qualidade do leite é a mastite, pois ocasiona alterações na composição do leite e diminuição na produção, além de representar riscos à saúde do consumidor pela possível presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas, além de resíduos de antimicrobianos (SANTOS; FONSECA, 2007).

Diferentes agentes patogênicos estão envolvidos na etiologia da mastite bovina, e *Staphylococcus* spp. são os mais frequentemente isolados. Dentre o gênero, *Staphylococcus aureus* é o principal microrganismo causador de mastite contagiosa em rebanhos leiteiros de todo o mundo. Uma vaca com mastite por *S. aureus* apresenta queda considerável na produção, assim como na qualidade do leite (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). No entanto, é frequente o isolamento de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS) em casos de mastite bovina (PYÖRÄLA; TAPONEN, 2009). Esses microrganismos são oportunistas, pois normalmente fazem parte da microbiota da pele do teto e dessa forma, tem acesso ao interior da glândula mamária (TRINIDAD; NICKERSON; ALLEY, 1990).

Staphylococcus spp. são capazes de produzir diferentes fatores de virulência que auxiliam na sua colonização e persistência na glândula mamária, além de produzir toxinas capazes de provocar intoxicações alimentares (SANTOS; FONSECA, 2007). Ainda, esses microrganismos exibem elevada resistência aos agentes antimicrobianos usualmente empregados no controle e tratamento das mastites (LUTHJE; SCHWARZ, 2006), dificultando o tratamento das infecções, e conseqüentemente, aumentando as despesas aos produtores de leite (MATHEW; CISELL; LIAMTHONH, 2007).

Sendo assim, há uma grande necessidade de se desenvolver novas terapias alternativas eficazes de controle e tratamento da mastite bovina, que visem um produto mais seguro e de melhor qualidade. Uma alternativa com grande potencial para o controle de bactérias multirresistentes é a utilização de bacteriocinas. O uso de diferentes bacteriocinas na prevenção e tratamento da mastite já foi descrito por diversos autores (BARBOSA-CORONA et al., 2009; CAO et al., 2007; SEARS et al., 1992). Entretanto, a necessidade de minimizar o

uso de antibióticos em animais de produção, faz com que haja novo interesse na avaliação da atividade das bacteriocinas como alternativa na gestão de mastite (BASTOS et al., 2009). Bacteriocinas são peptídeos naturais sintetizados e secretados pelas bactérias, as quais inibem o crescimento de ambas as espécies estreitamente relacionadas e não relacionadas (JACK; TAGG; RAY, 1995).

Outra estratégia relevante é a utilização de lípides catiônicos. A atividade antibacteriana de lípides catiônicos de brometo/cloreto de dioctadecildimetilamônio (DDA) tem sido revisada (CARMONA-RIBEIRO; VIEIRA; LINCOPAN, 2006) podendo chegar a constituir um produto promissor para uso tópico de infecções humanas e veterinárias, incluindo mastite bovina. Além da atividade biocida, DDA possui a capacidade de adsorção a diferentes biomoléculas, e seu uso tem sido descrito como eficaz para o transporte de antígenos e/ou antibióticos (LINCOPAN et al., 2009).

A combinação de fármacos no tratamento de infecções pode contribuir para a prevenção ou redução da resistência bacteriana, ampliando o espectro de ação, além de diminuir a dose e a duração do tratamento, minimizando a toxicidade e possíveis efeitos colaterais (SILVA et al., 2011).

Neste cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da bacteriocina nisina, de nanofragmentos de lípides sintéticos catiônicos de DDA e do complexo NS/DDA contra cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes provenientes de mastite bovina e, cepas de *S. aureus* de uma *International Culture Collection* (ATCC®).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite bovina

Definida como inflamação das glândulas mamárias, a mastite é considerada a enfermidade de maior impacto econômico que acomete a pecuária leiteira mundial. Os principais prejuízos observados são queda na produção, assim como diminuição da qualidade, devido a alterações microbiológicas, físico-químicas, sensoriais e na composição centesimal do leite (SANTOS; FONSECA, 2007). Outras perdas ocasionadas pela mastite estão relacionadas com o descarte do leite de animais em tratamento, descarte prematuro de vacas por perda de um ou mais quartos mamários, redução do valor comercial desses animais, custos com diagnóstico microbiológico, medicamentos e com médico veterinário. Além disso, constitui ameaça à saúde dos consumidores devido à veiculação de patógenos e suas toxinas, ou pela presença de resíduos de antibióticos no leite (KEFEE, 2012).

A mastite é uma doença multifatorial complexa, e sua intensidade depende da interação entre fatores relacionados ao animal, ao homem, ao ambiente e o microrganismo. Pode ser ocasionada por traumas físicos, agentes químicos irritantes, mas, sobretudo pela colonização do canal do teto principalmente por bactérias, assim como fungos, leveduras e algas (RADOSTITS et al., 2002). A contaminação microbiana do leite pode ocorrer através da incorporação dos microrganismos que estão presentes no úbere ou durante o processo de ordenha, através do contato com utensílios e equipamentos de ordenha contaminados (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A mastite pode ser classificada quanto sua forma de manifestação. A forma *clínica* apresenta os sinais evidentes da inflamação, tais como edema, hipertemia, endurecimento e dor na glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou alterações das características do leite. Pode ocorrer também, febre, anorexia, com queda na produção de leite, podendo levar a morte do animal (TOZZETTI; BATAIER; ALMEIDA, 2008). Já a mastite *subclínica* não apresenta os sinais inflamatórios evidentes. Contudo, há alterações na composição do leite, tais como o aumento da contagem de células somáticas (CCS), aumento dos teores de sódio e cloro, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólidos totais e lactose, além de ser responsável por aproximadamente 70% das perdas de leite ocasionadas pela doença (SANTOS; FONSECA, 2007).

Para o diagnóstico da mastite clínica, realiza-se exame criterioso da glândula mamária e o teste da caneca de fundo negro ou prova de *Tamis*, onde são observadas alterações macroscópicas nos primeiros jatos de leite. Por sua vez, o diagnóstico da mastite subclínica é

baseado na elevação das células somáticas, principalmente os leucócitos polimorfonucleares. Pode ser realizado indiretamente pelo *California Mastitis Test* (CMT), que estima a viscosidade do leite após a adição de um reagente próprio, e diretamente através da CCS, que quantifica a elevação dessas células (ZAFALON et al., 2008).

Outra forma de classificação é referente à forma de transmissão, que pode ser *contagiosa*, causada por microrganismos adaptados à sobrevivência no úbere e que são disseminados do quarto infectado para outro sadio, ou de um animal para o outro no momento da ordenha. Geralmente são infecções subclínicas, podendo tornar-se crônica e com elevada CCS. Os principais agentes etiológicos são *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (SANTOS; FONSECA, 2007). Já a mastite *ambiental* é ocasionada por microrganismos comumente presentes no meio ambiente do animal e que a partir dessa fonte alcançam o canal do teto. Geralmente é na forma clínica aguda, de curta duração (PHILPOT; NICKERSON, 1991). Os principais patógenos causadores das mastites ambientais são *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, assim como os coliformes e os enterococos (HOGAN; SMITH, 2012).

2.2 Mastite por *Staphylococcus* spp.

Um dos principais agentes etiológicos isolados em infecções intramamárias bovina é *Staphylococcus* spp. Esses microrganismos apresentam implicações importantes em saúde pública, uma vez que são capazes de produzir diversos fatores de virulência, como a produção de toxinas que causam intoxicações alimentares, além de elevada resistência a diferentes antimicrobianos, o que contribui na sua persistência na glândula mamária (MATHEW; CISELL; LIAMTHONH, 2007).

Staphylococcus spp. são caracterizados como cocos Gram-positivos, imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 µm, anaeróbios facultativos, mesófilos e crescem em temperaturas entre 7 a 48,5 °C. São capazes de se desenvolver em pH entre 4,2 a 9,3, com crescimento ótimo entre 7,0 a 7,5. Apresentam metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás, não formadores de esporos, catalase positivos e capazes de se multiplicarem em meio contendo 10% de cloreto de sódio (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

O gênero *Staphylococcus* é classificado em coagulase positiva e negativa, devido à habilidade de algumas espécies em coagular o plasma. *S. aureus* é o principal estafilococo coagulase positiva (CoPS) e é comumente isolado em mastite bovina em rebanhos de todo o

mundo, representando importância econômica significativa devido sobretudo, à diminuição na quantidade e qualidade do leite (MARTINS et al., 2010).

S. aureus é um microrganismo altamente contagioso, que normalmente habita a pele e mucosas do homem e de outros animais. Pode também, colonizar a pele e o canal do teto e, uma vez infectado, o quarto passa a ser um reservatório do agente, ao qual se torna uma fonte de infecção e disseminação do patógeno no momento da ordenha (SANTOS; FONSECA, 2007). Geralmente causam mastite subclínica, com aumento variável de CCS. Porém, podem progredir para manifestações clínicas agudas, ao incluir sinais sistêmicos que variam de moderados a severos, como a gangrena dos quartos mamários, podendo levar à morte do animal (KEEFE, 2012).

Já *Staphylococcus* coagulase negativa, por muito tempo foram considerados como patógenos secundários, com menor importância em infecções intramamárias. Entretanto, atualmente são considerados patógenos emergentes e são frequentemente encontrados em amostras de leite de animais com mastite, principalmente em vacas primíparas no período pós-parto, com declínio após a segunda semana de lactação. Podem também ocasionar infecções persistentes, com aumento da CCS e diminuição da qualidade do leite, representando perdas econômicas significativas (PYÖRÄLA; TAPONEN, 2009). São considerados oportunistas, pois normalmente fazem parte da microbiota da pele do teto e causam infecção via ascendente através do canal do teto (TRINIDAD; NICKERSON; ALLEY, 1990). Diversas espécies de CoNS já foram isoladas de amostras de leite bovino mastítico e as mais comuns são *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus epidermidis* (PYÖRÄLA; TAPONEN, 2009).

Uma vez que o principal reservatório de *Staphylococcus* spp. é a pele do úbere dos animais infectados e as mãos dos ordenhadores, medidas de controle do patógeno devem estar relacionadas com as boas práticas de ordenha. A manutenção periódica e a higiene dos equipamentos e do ambiente de ordenha, assim como a higiene pessoal do ordenhador, a desinfecção dos tetos com solução desinfetante nos intervalos de pré e pós-ordenha, a terapia da vaca seca, a segregação de animais infectados e descarte de vacas com mastite crônica, auxiliam na diminuição da prevalência de mastite (KEEFE, 2012; ZAFALON et al., 2008).

2.3 Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

A patogenicidade de *Staphylococcus* spp. está relacionada com a capacidade destes microrganismos em produzir uma gama de fatores de virulência associados à parede

bacteriana ou que são secretados. Estas proteínas auxiliam a bactéria evadir-se do sistema imune do hospedeiro, assim como aderir, invadir ou destruir as células e se propagar dentro dos tecidos. Dentre esses fatores, incluem-se a produção de enterotoxinas, superantígenos, enzimas, citotoxinas e toxinas esfoliativas, assim como a produção de biofilmes (TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (22 a 29 kDa) produzidas durante o metabolismo bacteriano, e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação. Existem diferentes enterotoxinas descritas na literatura, e as clássicas e de maior ocorrência são SEA, SEB, SEC, SED e SEE. As enterotoxinas são hidrossolúveis, resistentes às enzimas proteolíticas digestivas, termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, a pasteurização e a ultrapasteurização, e estão relacionadas com surtos de intoxicação alimentar (RAHIMI; ALIAN, 2013). Os sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica envolvem náusea, vômito, dores abdominais e diarreia, assim como dores de cabeça, hipotensão e hipotermia, e é atribuída à ingestão dessas enterotoxinas (MARTIN; MYERS; LANDOLO, 2001).

As enterotoxinas são moléculas imunoestimuladoras altamente potentes, conhecidas como superantígenos (KONEMAN et al., 2001). Essas toxinas se ligam às moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de classe II e aos receptores de células T, induzindo a proliferação de linfócitos T e a produção de interleucina 2 (IL-2). A formação deste complexo trimolecular resulta em uma produção maciça de citocinas que causarão um dano epitelial, que resultará em perdas capilares e hipotensão (BAKER; ACHARYA, 2004).

S. aureus é um dos principais contaminantes de leite e seus derivados e podem produzir um ou mais tipos de enterotoxinas nesses alimentos, representando um problema de saúde pública (LINA et al., 2004). Entretanto, a produção de enterotoxinas não está restrita aos *S. aureus*. Outras espécies de CoPS, como *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*, possuem importância à indústria alimentícia, assim como algumas espécies de CoNS, como *Staphylococcus capitis*, *S. chromogenes* e *S. epidermidis* também têm sido relatadas como produtoras de enterotoxinas (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

A ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas em produtos lácteos e derivados, especialmente em queijos, tem sido relatada por diversos autores. Borges et al. (2008) avaliaram o perfil de contaminação por *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas em amostras de leite e derivados, de uma indústria de laticínios na região metropolitana de Fortaleza - CE. Os autores observaram que houve uma alta frequência de isolamento de CoPS, principalmente *S. aureus*, nas amostras de leite cru, enquanto que CoNS foi mais frequentemente isolado nas

amostras de leite pasteurizado, coalhada e queijo. A presença de enterotoxina foi constatada em 20% (4/25) das amostras de leite cru e, conseqüentemente, nas amostras de leite pasteurizado, coalhada e queijo, e foi atribuída à elevada presença de CoPS no leite cru.

Arcuri et al. (2010) pesquisaram a presença de genes de 11 diferentes enterotoxinas estafilocócicas em 291 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, leite do tanque e queijo Minas frescal. Os autores observaram que 37,5% (n=109) dos isolados eram positivos para pelo menos um dos genes, e observaram também 23 genótipos diferentes de genes de toxinas distintas.

As citotoxinas estafilocócicas possuem atividade nas membranas celulares e compreendem as toxinas alfa, beta, delta e gama e a leucocidina de Panton-Valentine (PVL). São responsáveis por induzir mudanças pró-inflamatórias nas células, inativar o sistema imune por efeito citotóxico direto e degradar tecidos (KONEMAN et al., 2001). A toxina PVL provoca a destruição de leucócitos e necrose tecidual e está associada às cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina isoladas da comunidade (ÜNAL; ÇINAR, 2012).

S. aureus também produz outras toxinas extracelulares como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e toxinas esfoliativas (ETs). A TSST-1 é um superantígeno responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos, caracterizada por febre, hipotensão, *rash* cutâneo e envolvimento multiorgânico. As toxinas esfoliativas promovem a clivagem do extrato granuloso da epiderme, ocasionando síndromes cutâneas severas, como a síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso (BANNERMAN; PEACOCK, 2007).

Outro importante fator de virulência de *Staphylococcus* spp. é a capacidade de produzir biofilmes, pois esta habilidade muitas vezes está relacionada com infecções recorrentes (MELCHIOR; VAARKAMP; GREMMELS, 2006). Os biofilmes são caracterizados como uma comunidade microbiana séssil envolta por uma matriz polimérica extracelular auto-produzida aderente a uma superfície inerte ou viva. Podem ser formados por uma única espécie de microrganismo, ou por diferentes espécies ou até mesmo gêneros, e são compostos principalmente por água e macromoléculas como polissacarídeos, proteínas, DNA, lipídeos, sais minerais e diversos produtos derivados da lise celular (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; MONROE, 2007).

A formação de biofilmes no interior do tecido do úbere confere à bactéria capacidade de adesão e proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e ação dos agentes antimicrobianos, tornando a mastite uma doença persistente (ATULYA et al., 2014). As células bacterianas que crescem em um biofilme são geneticamente e fisiologicamente distintas das células livres, e podem ser mais tolerantes aos antibióticos em até 1.000 vezes

(MONROE, 2007). Segundo Melchior, Vaarkamp e Gremmels (2006) as bactérias capazes de produzir biofilmes são mais frequentemente relacionadas às infecções crônicas e persistentes do que as cepas não produtoras. Além disso, os biofilmes auxiliam as bactérias aderirem e colonizarem as superfícies dos equipamentos de ordenha, o que favorece a disseminação do patógeno aos animais sadios (SANTOS; FONSECA, 2007).

Diversos trabalhos relatam a presença de genes e a capacidade fenotípica de formação de biofilmes por cepas de estafilococos isoladas de mastite bovina. Tremblay et al. (2013) avaliaram a capacidade fenotípica de 255 cepas de CoNS isoladas de casos de mastite, no Canadá. A maioria (85,1%) dos isolados foi capaz de formar biofilme *in vitro*. Além disso, através da técnica de PCR, os autores observaram em 87,8% dos isolados a presença de pelo menos um dos seis genes avaliados responsáveis pela formação de biofilme.

Castelani et al. (2013) avaliaram 110 *S. aureus* isolados de mastite de vacas e novilhas, e observaram que 55,5% das cepas foram capazes de produzir biofilme fenotipicamente. Porém, a presença dos genes *icaA* e *icaD*, relacionados com a formação de biofilmes, foi detectada em 98,9% e 100% das amostras, respectivamente. Isso indica que existe uma elevada prevalência dos genes *ica* em *S. aureus* isolados de mastite, e que a expressão fenotípica depende de condições específicas de cultivo, como quantidade de glicose e condições hipóxicas (MELCHIOR; VAARKAMP; GREMMELS, 2006).

2.4 *Uso de antimicrobianos e mastite*

O desenvolvimento da antibioterapia no século XX foi um marco para a história da humanidade, uma vez que se tornou possível o tratamento de diversas infecções. Porém, a utilização generalizada e excessiva fez com que surgissem patógenos multirresistentes às drogas de uso corrente, tanto em isolados de humanos, quanto veterinário (ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009). Com isso, é cada vez mais frequente o relato de resistência antimicrobiana em todo o mundo, representando prejuízos tanto econômicos, como para a saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2012), além do uso excessivo e a administração empírica, a utilização de antimicrobianos na promoção de crescimento de animais de produção aumenta a pressão seletiva sobre as bactérias, ocasionando a resistência.

Medidas de controle da mastite bovina empregadas nas propriedades leiteiras, como práticas de higiene de ordenha, muitas vezes são ineficazes e exigem intervenção de medicamentos (OLIVER; MURINDA, 2012). Agentes antimicrobianos são comumente

empregados para o tratamento e prevenção da mastite bovina, em terapia de vaca seca, bem como em outras doenças que acometem o gado leiteiro (SAWANT; SORDILLO; JAYARAO, 2005). Entretanto, o uso constante e sem prévia identificação do agente etiológico e ensaios de susceptibilidade, favorecem a propagação de cepas multirresistentes (SZWEDA et al., 2014), podendo contribuir para o aumento da morbidade e mortalidade dos animais, aumentando os custos de produção (MATHEW; CISELL; LIAMTHONH, 2007). Além disso, essas cepas podem transferir os genes de resistência a outras bactérias sensíveis (NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012).

Diferentes drogas são utilizadas para o tratamento e a prevenção da mastite. As cefalosporinas são as mais utilizadas, bem como as lincosamidas e beta-lactâmicos (OLIVER; MURINDA, 2012). Porém, muitos trabalhos conduzidos em diferentes países evidenciam que *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina apresentam resistência a esses e também a outros agentes antimicrobianos. Em rebanhos dos Estados Unidos, Erskine et al. (2002) encontraram resistência à ampicilina e penicilina em 49,6% das cepas de *S. aureus*, 0,2% ao ceftiofur, 2,1% à pirlimicina e 0,6% à oxacilina. Na Estônia, Kalmus et al. (2011) avaliaram o perfil de resistência de cepas de *S. aureus* e CoNS e observaram que 61,4 e 34,5% eram resistentes à penicilina, 59,5 e 38,5% à ampicilina, 18,1 e 17,1% à clindamicina, 4,1 e 11,6% resistentes à tetraciclina, respectivamente. No Brasil, da Costa et al. (2013) traçaram o perfil de resistência de 352 *S. aureus* isolados de 35 rebanhos do estado de Minas Gerais, e encontraram índice de resistência de 0,40% para ceftiofur, 1,69% para gentamicina, 3,35% para neomicina e 34,1% para penicilina.

A utilização de antimicrobianos em vacas leiteiras pode também gerar resíduos no leite. A presença desses resíduos constitui prejuízos econômicos, uma vez que o leite dos animais em tratamento deve ser descartado, e os produtores são penalizados pelo leite adulterado. Além disso, a ocorrência destes resíduos acarreta problemas de ordem tecnológica à indústria de laticínios, pois inibem as culturas lácteas utilizadas na fabricação dos derivados e produtos fermentados, dificultando a produção ou alterando a qualidade (ADETUNJI, 2011).

Os resíduos de antibióticos em derivados lácteos também podem ocasionar desequilíbrio da microbiota intestinal do consumidor, reações de hipersensibilidade e tóxicas, além de efeitos teratogênicos (JACOBSON; CONSUMER, 2003). A ingestão contínua de pequenas doses de antibióticos através do leite contaminado, principalmente por crianças, reduz a microbiota normal, permitindo a proliferação dos microrganismos patogênicos e interferindo diretamente na eficácia de outros medicamentos (ALMEIDA et al., 2003).

Estima-se que cerca de 20% do leite bovino brasileiro seja produzido de forma informal e comercializado sem nenhuma inspeção sanitária. Tal prática representa risco à saúde da população, devido ao consumo de um produto de baixa qualidade e que possa conter resíduos de antimicrobianos, assim como microrganismos patogênicos e suas toxinas (MOTTA et al., 2013). A presença de resíduos de antimicrobianos no leite é devida, principalmente ao uso abusivo e inadequado de antibióticos e da não obediência ao período de carência. Ainda, fatores como o prolongamento da retenção do medicamento na glândula mamária em alguns animais e a antecipação do parto, também podem contribuir (COSTA et al., 2000).

Resíduos de antibióticos em leite bovino já foram detectados em diferentes regiões do Brasil. Em Minas Gerais, Cerqueira et al. (2014) relataram uma baixa concentração de resíduos de quinolonas, estreptomicinas e tetraciclina em amostras de leite de tanque de expansão de diferentes propriedades. No Paraná, Vieira et al. (2012) demonstraram a presença de resíduos de tetraciclina, gentamicina, estreptomicina e beta-lactâmicos em amostras de leite pasteurizado tipo B de estabelecimentos comerciais. Ainda, foi encontrado resíduo de cloranfenicol em 40% das amostras analisadas. O cloranfenicol possui efeito tóxico e seu uso em animais de produção é proibido no Brasil.

Além de resíduos no leite, o emprego de antibióticos na criação animal pode gerar resíduos no meio ambiente, de forma direta, através das fezes e urina, ou indireta, através da utilização de esterco animal na adubação de culturas (CHRISTIAN et al., 2003; KEMPER, 2008). Essas moléculas podem ser detectadas em amostras de solo, água superficial e subterrânea e impactar negativamente os organismos aquáticos e terrestres (toxicidade crônica ou aguda). Esses resíduos podem também, favorecer a seleção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (KEMPER, 2008).

Agentes antimicrobianos podem ainda estimular a formação de biofilmes bacterianos. Estudos mostraram que alguns antibióticos, quando presentes em concentrações sub-inibitórias (sub-MICs) podem induzir de forma significativa a formação de biofilme *in vitro* em diferentes espécies bacterianas, incluindo *S. aureus* (FRANK et al., 2007; LÁZARO-DÍEZ et al., 2016). Rachid et al. (2000) demonstraram que concentrações sub-MICs de tetraciclina e estreptogramina semi-sintética quinupristina-dalfopristina foram capazes de estimular a expressão dos genes *ica*, responsáveis pela adesão intercelular na matriz do biofilme, de nove a 11 vezes, em *S. epidermidis*. Concentrações sub-MICs, podem ainda, influenciar a expressão de fatores de virulência, tais como outras moléculas de adesão ou toxinas (MELCHIOR; VAARKAMP; GREMMELS, 2006).

2.5 Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp.

A resistência antimicrobiana pode ser intrínseca, que é naturalmente exibida por todos os microrganismos de determinada espécie, e adquirida, resultante da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, e através de mutação de genes reguladores ou estruturais. Esses genes codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (ALTERTHUM, 2005).

Staphylococcus spp. demonstraram, ao longo do tempo, notável capacidade de desenvolver resistência à maioria dos antimicrobianos. A resistência aos beta-lactâmicos pode ocorrer por dois mecanismos principais. Um deles é através da hidrólise enzimática pela ação da enzima beta-lactamase. Essas enzimas extracelulares, codificada pelo gene *blaZ*, clivam o anel beta-lactâmico no espaço periplasmático e degradam o antibiótico (NIKAIDO, 2009). O outro mecanismo de resistência é pela aquisição do gene *mecA*, que confere resistência à meticilina, e conseqüentemente, tornam os microrganismos intrinsecamente resistentes também a outras drogas beta-lactâmicas, podendo apresentar resistência adicional para aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina e quinolonas (LEE, 2003; SAHM, 1994). O gene cromossômico *mecA* confere modificações nas proteínas de ligação de penicilina (*Protein Binding Penicilin* - PBP) presentes na membrana plasmática, dando origem a variantes PBPs (PBP 2' ou PBP 2a), as quais tem baixa afinidade para os beta-lactâmicos (CHAMBERS, 1997). Esses dois mecanismos de resistência podem estar presentes numa mesma cepa, e até estarem interagindo entre si (de LENCASTRE et al., 1991).

A resistência aos beta-lactâmicos é amplamente distribuída em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. No Brasil, a presença do gene *blaZ* foi observada por Krewer et al. (2015) em 93,1% (203/218) das cepas isoladas de rebanhos bovinos do Nordeste. Também foi encontrado no Rio de Janeiro 5,2% (13/250) de cepas *blaZ* positivas (MENDONÇA et al., 2012). Na Polônia, Szweda et al. (2014) analisaram 123 cepas de *S. aureus* e observaram que 25 de 29 cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina transportavam o gene *blaZ*. Além disso, duas cepas foram positivas para o gene *mecA*. A prevalência de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina geralmente é baixa, quando comparadas com isolados clínicos humanos (VANDERHAEGHEN et al., 2010). Coelho et al. (2009) detectaram a presença do gene *mecA* em 25% (5/21) das cepas MRSA isoladas de vacas com mastite subclínica no Rio de Janeiro. Na Índia, Kutar et al. (2015) encontraram 9,61% (5/52) de cepas de *S. aureus*, isoladas de mastite de vacas e búfalas, carregando o gene *mecA*. Em rebanhos chineses, Pu et al. (2014) observaram que apesar de 47,6% (49/103) dos

isolados serem *mecA* positivos, 37 destas cepas apresentaram sensibilidade fenotípica à oxacilina, ressaltando a importância do emprego de métodos genotípicos.

Os macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS_B) apesar de serem antimicrobianos quimicamente distintos, apresentam mecanismos de ação similar, atuando na ligação do ribossomo e inibição da síntese protéica bacteriana (JUYAL et al., 2013). A resistência a essas drogas está relacionada com dois diferentes mecanismos: (1) modificações no alvo de ligação do antimicrobiano no ribossomo, mecanismo codificado pelos genes *ermA* ou *ermC* (*erythromycin ribosomal methylase*), que codificam enzimas denominadas de metilases RNAr 23s, responsáveis pela metilação do RNAr 23s, as quais conferem resistência cruzada aos MLS_B; (2) efluxo ativo: codificado pelo gene *mrsA* (*specific methionine sulfoxide reductase*), o qual confere resistência aos macrolídeos e estreptogramina B (LEWIS; JORGENSEN, 2005).

As tetraciclina são antibióticos de amplo espectro utilizados numa variedade de infecções ocasionadas por microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Os mecanismos de resistência às tetraciclina incluem: (1) as proteínas de efluxo, que protegem o ribossomo da ação da droga, e são codificadas pelo gene *tet*, uma superfamília de proteínas; (2) proteínas de proteção ribossomal, que ocorre por ligação de proteínas ao ribossomo, tornando-o inacessível ao fármaco e, (3) a inativação enzimática da tetraciclina, codificada pelo gene *tetX* (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992; ULLAH et al., 2012).

Em um trabalho conduzido na Turquia por Türkyilmaz et al. (2010), isolou-se 93 cepas de *S. aureus* de mastite bovina, onde 17% eram MRSA e resistentes a múltiplas drogas. Além disso, 15 cepas foram resistentes à tetraciclina e continham o gene *tetM*, mas nenhuma continha o gene *tetK*. Entre as cepas resistentes à eritromicina, nove possuíam o gene *ermA*, sete tinham tanto o gene *ermA* quanto *ermB*, porém nenhuma albergava o gene *ermC*.

Em estafilococos, a resistência aos fenicóis, lincosamidas pleuromutilinas, estreptogramina A e macrolídeos, assim como linezolida é mediada pelo gene *cfr*. Este gene encontra-se frequentemente em plasmídeos, e pode ser disseminado entre bactérias da mesma espécie, e também entre espécies diferentes. O gene *cfr* já foi identificado em isolados de estafilococos linezolida-resistentes de origem humana. Em animais, cepas carregando o gene *cfr* têm sido identificadas em suínos, equinos e aves. Em bovinos, o gene *cfr* já foi identificado em quatro espécies (*Staphylococcus lentus*, *S. simulans*, *S. sciuri* e MRSA) (SHEN; WANG; SCHMARZ, 2013).

2.6 Alternativas de tratamento e profilaxia para infecções produzidas por *Staphylococcus spp.*

2.6.1 Bacteriocinas

A reduzida quantidade de antibacterianos clinicamente efetivos, disponíveis para o tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes, tem aumentado a necessidade de procura por alternativas de tratamento. A utilização de bacteriocinas tem sido considerada uma opção vantajosa, uma vez que tem sido demonstrada a sua atividade contra patógenos de importância clínica humana e veterinária (NIGAM; GUPTA; SHARMA, 2014).

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas ribossomais biologicamente ativas, produzidas pela própria bactéria, que destroem ou inibem o crescimento de outras bactérias taxonomicamente relacionadas com a cepa produtora. São compostos que surgiram durante a evolução dos sistemas de defesa microbiana, e são utilizados pelas bactérias para competir com sucesso para a sua sobrevivência (SCHULZ et al., 2003). Os genes responsáveis pela produção das bacteriocinas estão localizados em plasmídeos, transposons ou cromossomos bacterianos, e consistem geralmente de um operon de vários genes permitindo a biossíntese, modificação pós-tradução, transporte, bem como o gene de imunidade e, em alguns casos, um gene que causa a lise do produtor para liberação da bacteriocina ativa (CLEVELAND et al., 2001; McAULIFFE; ROSS; HILL, 2001).

As bacteriocinas de bactérias ácido-lácticas (BAL) são divididas em quatro classes, baseadas na massa molar e a estrutura química, assim como o espectro e o mecanismo de ação (CLEVELAND et al., 2001):

- *Classe I (lantibióticos)*: constituída por peptídeos termoestáveis de baixa massa molar (<5 kDa), com aminoácidos que apresentam em sua composição lantionina e β -metillantionina. Pode ser dividida em subclasses, baseadas em sua estrutura e mecanismo de ação: *tipo A*- moléculas lineares, como a nisina, subtilina e epidermina; *tipo B*- moléculas globulares, como a mersacidina e mutacina.
- *Classe II*: constituída de pequenos peptídeos (<10 kDa) relativamente estáveis ao calor. São peptídeos de membrana ativa que não contêm lantionina, subdivididos em: *classe IIa*- ativos contra *Listeria monocytogenes*, com sequência N-terminal definida, dentre elas a leucocina A, mesentericina Y105 e carnobacteriocina B2; *classe IIb*- complexos, que requerem dois diferentes peptídeos para que tenham atividade (lactacina F e lactococina G); *classe IIc*- peptídeos com tiol ativado, que requerem

resíduos de cisteína reduzidos para que sejam ativos (enterocina AS48, circularina A e reutericina 6).

- *Classe III*: constituída por proteínas termolábeis de alta massa molar (>30 kDA), de natureza complexa quanto à atividade e estrutura. Promovem a lise da parede celular das células sensíveis. As bacteriocinas pertencentes a essa classe são: lactacinas A e B, helveticinas J e V-1829 e acidophilucina A.
- *Classe IV*: bacteriocinas complexas que, além da porção protéica, contém porções de aminoácidos, carboidratos ou lipídeos em sua composição, como a plantaricina S, leuconocina S e lactocina 27 (KLAENHAMMER, 1993; RAJARAM et al., 2010).

2.6.1.1 Nisina

O efeito inibitório da nisina sobre o crescimento de outras BAL foi observado pela primeira vez em 1928, pelos pesquisadores Rogers e Whittier (HARRIS; FLEMING; KLAENHAMMER, 1992). Esse antibiótico, produzido por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* é ativo em concentrações nanomolares e possui atividade contra muitas espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo cepas resistentes à fármacos e patógenos de origem alimentar, assim como em células vegetativas e esporos de *Clostridium* e *Bacillus* (McAULIFFE; ROSS; HILL, 2001). Além disso, bactérias Gram-negativas podem apresentar sensibilidade à nisina quando associada com agentes quelantes, como EDTA, ácidos e detergentes, ou expostas a tratamentos físicos, como choque osmótico, que alteram a estabilidade e causam danos à membrana externa da bactéria (CASTELLANO; BELFIORE; VIGNOLO, 2011; PARADA et al., 2007).

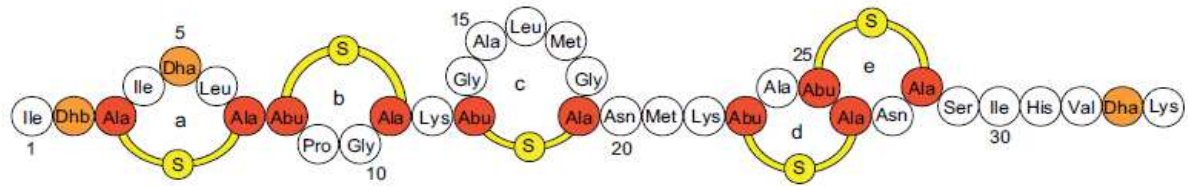
Dentre todas as bacteriocinas conhecidas, a nisina é a única aceita pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e tem sido utilizada como conservante alimentar em diversos países para diversas finalidades, sem o aparecimento de resistência bacteriana significativa (CHATTERJEE et al., 2005). No Brasil, a nisina é aprovada para uso em produtos lácteos no limite máximo de 12,5 mg/kg e é muito utilizada em produtos cárneos, sendo permitida sua utilização na superfície externa de embutidos de diferentes tipos (SCHULZ et al., 2003). É considerada pelo comitê do *Codex Alimentarius* da FAO (*Food and Agriculture Organization*) como uma substância GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005), e sua ingestão não causa efeitos tóxicos ao organismo. Sua DL₅₀ (Dose Letal 50%) é 6950 mg/kg e é comparável ao de sais comuns, como o cloreto de sódio. Com bases em estudos toxicológicos realizados em animais, a OMS recomenda que a

Ingestão Diária Aceitável (IDA) de nisina é de 33.000 UI/kg (0,825 mg) de peso corpóreo (HOOVER; STEENSON, 1993).

A maioria dos estudos sobre a utilização biotecnológica da nisina é focada na indústria de alimentos, seja pela adição direta da molécula purificada, seja pela adição de culturas lácticas (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). Contudo, seu potencial terapêutico na medicina humana e veterinária tem sido estudado. Aranha, Gupta e Reddy (2004) comprovaram o efeito contraceptivo da nisina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Seu emprego no tratamento e prevenção da cárie bacteriana foi demonstrado por Tong et al. (2010). Le Lay et al. (2008) demonstraram que a nisina foi capaz de inibir o crescimento de hifas de *Candida albicans*. Além disso, a nisina representa uma alternativa eficiente para o tratamento e prevenção das mastites bovinas. Em 1989, Broadbent et al. observaram que a nisina foi capaz de inibir o crescimento de diferentes patógenos Gram-positivos causadores de mastite bovina, dentre eles enterococos, estafilococos e estreptococos. Em ensaios de campo, infecções intramamárias foram produzidas por inoculação intramamária ou exposição do teto ao patógeno. Após o tratamento intramamário com nisina, altas taxas de cura foram observadas (66% para *S. aureus*, 95% para *Strep. agalactiae* e 100% para *Strep. uberis*). Além disso, foi observada uma redução significativa de células somáticas nas glândulas curadas (DELVES-BROUGHTON et al., 1996).

A molécula da nisina é formada por anéis de lantionina e 34 aminoácidos com caráter catiônico e hidrofóbico, com peso molecular de 3,5 kDa (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Também contém alguns aminoácidos não catiônicos, raramente encontrados na natureza, como a dideidroalanina (Dha) e a didehidrobutirina (Dhb). Esse peptídeo é considerado uma molécula anfipática, pois possui resíduos hidrofóbicos na região N-terminal e hidrofílicos na região C-terminal (**Figura 1**). Quimicamente, sua solubilidade, estabilidade e atividade biológica estão relacionados com pH, sendo mais estável em pH ácido (2-5) (ARAUZ et al., 2009). Além disso, a nisina é estável à tratamentos térmicos, podendo ser autoclavada a 121 °C por 15 minutos, em pH 2-3, sem ocorrer desnaturação e perda de atividade menor que 10% (DELVES-BROUGHTON, 2005).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura primária da nisina. Os resíduos de lantionina (Ala-S-Ala) e β -metilantionina (Abu-S-Ala) que formam os anéis de lantionina estão em vermelho; os aminoácidos desidratados Dhb (didehidrobutirina) e Dha (didehidroalanina) estão em laranja.



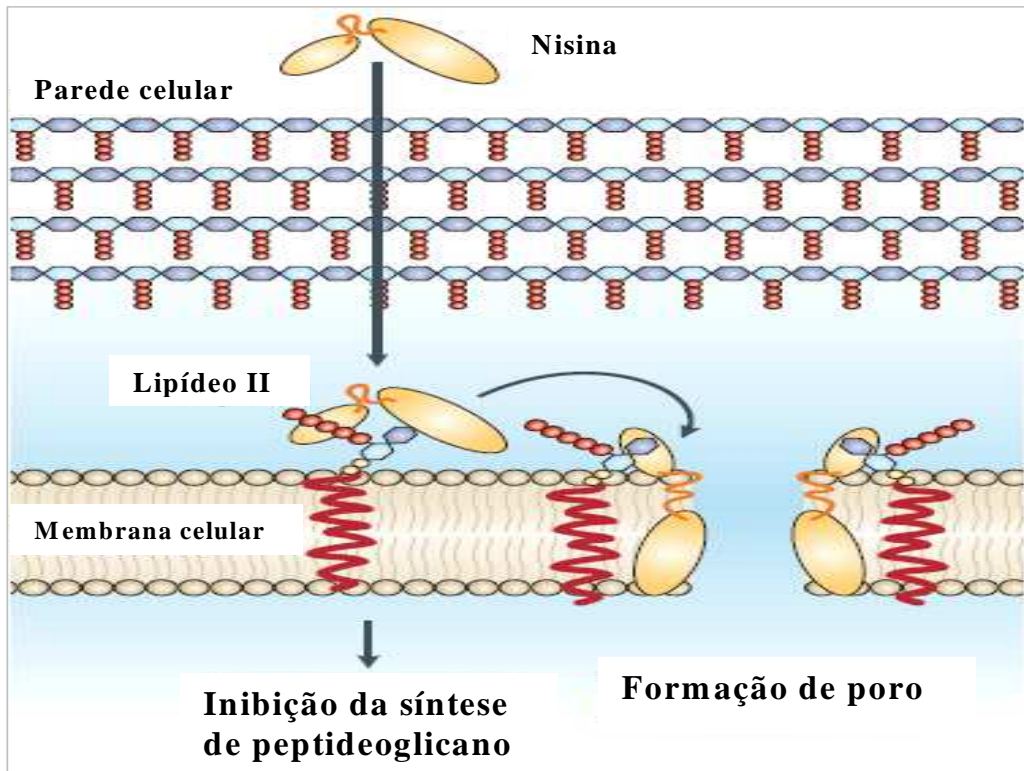
Fonte: Kruijff; van Dam e Breukink (2008).

O mecanismo de ação das bacteriocinas é dependente de características inerentes à sua molécula e de fatores relacionados à espécie bacteriana e de suas condições de crescimento. A ação pode ser bactericida ou bacteriostática. Geralmente, as bacteriocinas se ligam à receptores de membrana celular da bactéria alvo (OLIVEIRA; SIQUEIRA JR.; SILVA, 2012).

De um modo geral, a nisina possui dois principais mecanismos de ação (**Figura 2**). Um deles é através da formação de poros na membrana celular bacteriana. Primeiramente, ocorre a adsorção não específica e reversível da nisina sobre a parede celular da bactéria. Esse fenômeno é dependente do pH (3,0-6,5), da composição fosfolipídica da membrana citoplasmática, da presença de cátions divalentes e trivalentes e da concentração utilizada. Em seguida, a nisina torna-se insensível às proteases e se liga ao lípide II da membrana fosfolipídica da bactéria por ligação eletrostática. Essa ligação ocasiona dissipação da força próton-motriz, alterando o potencial de membrana e o gradiente de concentração de prótons, formando poros na membrana citoplasmática. Esses poros induzem a um rápido efluxo de moléculas intracelulares essenciais, levando a lise celular (MORENO et al., 1999; NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012).

O segundo mecanismo de ação da nisina é sobre a síntese da parede celular bacteriana (JOSALA et al., 2009). A parede das bactérias Gram-positivas compreende de múltiplas camadas de peptidoglicano intercaladas com ácido teicóico e ácido lipoteicóico. O lípide II é um precursor da parede celular ancorado à membrana e é essencial para a biossíntese da parede bacteriana, e compreende de um transportador de peptidoglicano do citoplasma para a parede. A ligação da nisina com o lípide II impede esse transporte. Além disso, a nisina também se liga ao lípide III e lípide IV, interferindo na biossíntese de ácido teicóico e ácidos lipoteicóicos. Sendo assim, além de interferir com a biossíntese da parede celular, a nisina também pode inibir a formação de outros componentes estruturais essenciais do envelope celular (YOUNT; YEAMAN, 2013).

Figura 2 - Representação esquemática dos mecanismos de ação da nisina: A nisina se liga ao Lípido II presente na membrana citoplasmática da bactéria, formando poros, assim como impedindo a síntese do peptidoglicano.



Adaptado de: Cotter; Ross e Hill (2013).

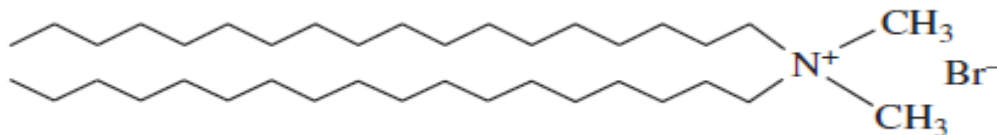
Outra atividade biológica da nisina é a inibição da germinação dos esporos de espécies de *Bacillus* e *Clostridium*. Propõe-se que haja uma interação entre o resíduo de diidroalanina na posição 5 da nisina com grupos sulfidríla vitais da membrana dos esporos recém-germinados, exercendo um profundo efeito bacteriostático, e conseqüentemente inibição do esporo (ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009).

2.6.2 Brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA)

As bactérias, assim como os fungos, são carregadas negativamente e interagem com um grande número de compostos carregados positivamente, que atuam como agentes antimicrobianos (CARRASCO; SAMPAIO; CARMONA-RIBEIRO, 2015). Compostos de amônio quaternários positivamente carregados são muito úteis como antissépticos e desinfetantes, e são empregados em diversos fins clínicos, como desinfecção pré-operatória de pele intacta, aplicação em membranas mucosas e desinfecção de superfícies não críticas. Além disso, são também excelentes para a limpeza de superfícies inertes e desodorização (CARMONA-RIBEIRO; CARRASCO, 2013).

O brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA) é caracterizado como um lípide catiônico sintético, positivamente carregado (PM 631) com um brometo ou um cloreto como contra-íon, e duas longas cadeias alifáticas hidrocarbonadas C₁₈ altamente hidrofóbicas, ligadas a uma amina quaternária (**Figura 3**). Sua molécula é pouco solúvel em água devido a cadeias lipofílicas. Entretanto, através de sonicação com sonda de titânio podem ser obtidas vesículas fechadas ou fragmentos de bicamadas (bicelas) (CARMONA-RIBEIRO; CHAIMOVICH, 1983; VIEIRA; CARMONA-RIBEIRO, 2001). O processo de sonicação aumenta a curvatura das vesículas, assim como as destrói, rompendo-as e formando esses fragmentos de bicamada (com raio infinito, ou curvatura zero), aumentando desse modo a T_M. Quando submetidas à extrusão ou sonicação, as estruturas grandes e gigantes são rompidas, formando vesículas pequenas e achatadas (FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000). A dispersão lipídica usando sonda que emite ultrassom em solução aquosa produz bicelas catiônicas ao invés de vesículas esféricas fechadas. Estes fragmentos são estabilizados em baixa força iônica (≤ 5 mM de sal) pela repulsão eletrostática (CARMONA-RIBEIRO et al., 1991; PANSU et al., 1990).

Figura 3 - Estrutura química do DDA.



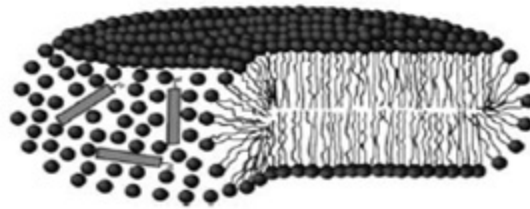
Fonte: Lincopan e Carmona-Ribeiro (2006).

O DDA é um potente agente biocida e tem sido utilizado em soluções antissépticas e desinfetantes, como agentes antimicrobianos contra fungos e bactérias (CARMONA-RIBEIRO; VIEIRA; LINCOPAN, 2006). Sua ação bactericida em concentrações micromolares foi comprovada contra diferentes espécies de bactérias de importância clínica (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*). Após 5 horas de interação entre concentrações 1×10^7 UFC/mL e 5 μ M DDA, não foi possível a contagem de células viáveis (0% de sobrevivência) (MARTINS; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 1997). Formulações a base de fragmentos de bicamadas de DDA, obtidos por sonicação, e anfotericina B foram eficazes contra candidíase sistêmica em camundongos, e exibiu efeito sinérgico *in vitro* com miconazol contra *Candida albicans*, com substancial redução de doses para a ação fungicida (LINCOPAN; CARMONA-RIBEIRO, 2006; PACHECO;

CARMONA-RIBEIRO, 2003). Além disso, Carrasco, Sampaio e Carmona-Ribeiro (2015) demonstraram que, moléculas de DDA sozinhas e/ou associadas com carboximetilcelulose, exibem atividade de largo espectro contra microrganismos multirresistentes, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de fungos.

Adicionalmente, através de atração eletrostática, esses lípides catiônicos permitem a adsorção de uma ampla variedade de biomoléculas, geralmente negativamente carregadas, e tem sido utilizados para carregar antígenos e/ou antibióticos (LINCOPAN et al., 2009) (**Figura 4**). Em um trabalho conduzido por Barbassa, Mamizuka e Carmona-Ribeiro (2011), foi evidenciado que fragmentos de bicamada de DDA são eficazes tanto como agente micobactericida, como molécula de transporte para rifampicina contra patógenos da tuberculose.

Figura 4 - Modelo de bicela carregando uma droga na borda. Drogas com carga negativas podem interagir com a cabeça polar catiônica do DDA por atração eletrostática dos compostos. Assim como, bordas hidrofóbicas das bicelas de DDA podem auxiliar essa incorporação pela hidrofobicidade de algumas drogas diretamente com a borda hidrofóbica.



Fonte: Oliveira; Benati e Lamy (2011).

Esses fragmentos de bicamada são também eficientes imunoadjuvantes para a indução de resposta imune, tanto humoral quanto celular, aumentando a resposta imunológica contra microrganismos, proteínas e peptídeos, entre outros. Desde a década de 70, Veronesi, Correa e Alterio (1970) demonstraram a capacidade do DDA de estimular a produção de anticorpos contra toxóide tetânico absorvido ao hidróxido de alumínio. Vesículas de DDA também já foram empregadas para indução da resposta imunológica contra antígenos tumorais (PRAGER et al., 1985) e contra o vírus da doença de *Newcastle* (KATZ et al., 1993).

O mecanismo de ação bactericida do DDA acontece através da reversão da carga da superfície celular, de negativa para positiva, fazendo com que haja uma desorganização da membrana, seguida de extravasamento do material intracelular de baixo peso molecular e, conseqüentemente morte do microrganismo (CARMONA-RIBEIRO; CARRASCO, 2013; HUGO, 1999). Primeiramente, ocorre a adsorção e penetração dos agentes catiônicos dentro da parede celular bacteriana. Em seguida, ocorre uma reação com a membrana citoplasmática

(lipídeos ou proteínas), seguida de desorganização da membrana, e vazamento de material de baixo peso molecular intracelular, degradação de proteínas e ácidos nucléicos (CARMONA-RIBEIRO; CARRASCO, 2013). Entretanto, diferentemente de outros lípidos catiônicos que lisam a célula, o DDA atua possivelmente ocasionando danos na função das proteínas ao nível da parede externa bacteriana, em que as vesículas se aderem sem romper-se e nem lisar as células (CAMPANHÃ; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 1999).

Quanto ao efeito citotóxico do DDA, Carmona-Ribeiro et al. (1997) demonstraram que células de mamíferos são mais resistentes ao DDA que as células bacterianas ou fúngicas. Cinquenta por cento de fibroblastos continuaram viáveis quando tratados com 1 mM de DDA em baixa força iônica, enquanto que para os microrganismos, 50% de viabilidade ocorreu em concentrações micromolares de DDA. Em concentrações bactericidas para bactérias e fungos, cerca de 100% de células de mamíferos se mantiveram viáveis. Esses resultados estão ilustrados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Efeito citotóxico do DDA contra células de mamíferos, bactérias e levedura.

Tipo de célula	Concentração de células viáveis (células/mL)	Concentração de DDA para 50% de sobreviventes (mM)
Fibroblasto de camundongo Balb-c 3T3 normais (clone A31)	1×10^4	1,000
Fibroblasto de camundongo SVT2 (SV40 transformados)	1×10^4	1,000
<i>Candida albicans</i>	2×10^6	0,010
<i>Escherichia coli</i>	2×10^7	0,028
<i>Salmonella typhimurium</i>	2×10^7	0,010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3×10^7	0,005
<i>Staphylococcus aureus</i>	3×10^7	0,006

Adaptado de: Carmona-Ribeiro (2003).

Com a emergência e disseminação de bactérias resistentes, o tratamento da mastite bovina tem se transformado em um desafio para a medicina veterinária e o agronegócio. Por um lado, muitos dos agentes antibacterianos utilizados como primeira escolha terapêutica tem perdido a sua efetividade, perante a expressão de diferentes mecanismos de resistência adotados pelos agentes etiológicos da mastite bovina (RUEGG et al., 2015). Por outro lado, o uso de antibacterianos de amplo espectro tem comprometido as características organolépticas do leite, além de gerar resíduos que, direta ou indiretamente, afetam os derivados lácteos e a microbiota de ecossistemas que estão em contato direto com estes resíduos (ADETUNJI, 2011). Assim, estudos que contemplem esta problemática e visem à procura de alternativas de tratamento, são dignos de investigação. Neste sentido, no presente estudo, foi avaliada a

atividade da bacteriocina nisina e do lípide catiônico sintético DDA, e a sua combinação, contra os principais agentes de mastites identificados em estudos prévios.

3

7 CONCLUSÕES

O complexo NS/DDA se mostrou como uma alternativa promissora para o controle de *Staphylococcus* spp. resistentes isolados de mastite bovina. A combinação da nisina com o DDA resultou em um complexo antibacteriano eficaz, com atividade bactericida obtida em baixa concentração na primeira hora de interação, quando comparada com as duas moléculas sozinhas. A terapia combinada permite a administração de doses mais baixas de cada um dos antimicrobianos, a fim de reduzir a sua toxicidade, os efeitos adversos e impedir o desenvolvimento de mutantes resistentes, além de ampliar o espectro de ação.

REFERÊNCIAS*

- ADETUNJI, V. O. Effects of processing on antibiotic residues (Streptomycin, Penicillin-G and Tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 10, n. 8, p. 792-795, 2011.
- ALMEIDA, L. P.; VIEIRA, R. L.; ROSSI, D. A.; CARNEIRO, A. L.; ROCHA, M. L. Antibiotic residues in milk of rural properties of Uberlândia - MG region. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 3, p. 83-87, 2003.
- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R., et al. **Microbiologia**, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 79-84.
- ANONYMOUS. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: H.D. Isenberg (Ed.), **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. American Society for Microbiology, Washington, DC: ASM, 1992. p. 5.18.1–5.18.28.
- ARANHA, C.; GUPTAA, S.; REDDYA, K. V. R Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: *in vitro* and *in vivo* studies. **Contraception**, v. 69, n. 4, p. 333–338, 2004.
- ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZOLLA, P. G.; PENA, V. T. C. Nisin biotechnological production and application: *A review*. **Trends in Food & Technology**, v. 20, p. 146-154, 2009.
- ARCURI, E. F.; ÂNGELO, F. F.; GUIMARÃES, M. F. M.; TALON, R.; BORGES, M. F.; LEROY, S.; LOISEAU, G.; LANGE, C. C.; ANDRADE, N. J.; MONTET, D. Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 12, p. 2148-2349, 2010.
- 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.
- ATULYA, M.; MATHEW, A. J.; RAO J. V.; RAO, C. M. Influence of milk components in establishing biofilm mediated bacterial mastitis infections in cattle: a fractional factorial approach. **Research in Veterinary Science**, v. 96, p. 25-27, 2014.
- BAKER, M. D.; ACHARYA, K. R. Superantigens: structure-functions relationships. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, n. 7-8, p. 529-537, 2004.
- BANNERMAN, T. L.; PEACOCK, S. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. v. 1., chap. 28, p. 390-411.
- BARBASSA, L.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Supramolecular assemblies of rifampicin and cationic bilayers: preparation, characterization and micobactericidal activity. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 40, p. 1-8, 2011.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002.

- BARBOSA-CORONA, J. E.; SALCIDO, N. F.; MURILLO, N. A.; ZARZOSA, A. O.; MEZA, J. E. O. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 138, p. 179-183, 2009.
- BASTOS, M. C. F.; CEOTTO, H.; COELHO, M. L. V.; NASCIMENTO, J. S. *Staphylococcal* antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 38-61, 2009.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics**. Mineola. New York: Courier Dover Publications, 2000. 692 p.
- BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.
- BOULOS, L.; PRÉVOST, M.; BARBEAU, B.; COALLIER, J.; DESJARDINS, R. LIVE/DEAD, BacLight, application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **Journal of Microbiological Method**, v. 37, p. 77-86, 1999.
- BROADBENT, J. R.; CHOU, Y. C.; GILLIES, K.; KONDO, J. K. Nisin inhibits several Gram-positive, mastitis-causing pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 12, p. 3342-3345, 1989.
- CAMPANHÃ, M. T. N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. **Journal of Lipid Research**, v. 40, p. 1495-1500, 1999.
- CAO, L. T.; WU, J. Q.; XIE, F.; HU, S. H.; MO, Y. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3980-3985, 2007.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M. Bilayer-Forming Synthetic Lipids: Drugs or Carriers? **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2425-2446, 2003.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.; CARRASCO, L. D. M. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International Journal Molecular Sciences**, v. 14, p. 9906-9946, 2013.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.; CASTUMA, C. E.; SESSO, A.; SCHREIER, S. Bilayer structure and stability in dihexadecylphosphate dispersions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, p. 5361-5366, 1991.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 24, n. 1, p. 172-179, 1983.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.; VIEIRA, D. B.; LINCOPAN, N. Cationic surfactants and lipids as anti-infective agents (Review). **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 33-54, 2006.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; ORTIS, F.; SCHUMACHER, R. I.; ARMELIN, M. C. S. Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. **Langmuir**, v. 13, n. 8, p. 2215-2218, 1997.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281-370, 2002.

CARRASCO, L. D. M.; SAMPAIO, J. L. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Supramolecular cationic assemblies against multidrug-resistant microorganisms: activity and mechanism of action. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, n. 3, p. 6337-6352, 2015.

CASTELANI, L.; PILON, L. E.; MARTINS, T.; POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P. Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p.340-344, 2014.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; VIGNOLO, G. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1461-1465, 2011.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, F. N.; CUNHA, A. F.; PICININ, L. C. A.; LEITE, M. O.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M. Detection of antimicrobial and anthelmintic residues in bulk tank milk from four different mesoregions of Minas Gerais State - Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 621-625, 2014.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, p. 781-791, 1997.

CHATTERJEE, C.; PAUL, M.; XIE, L.; van der DONK, W. A. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 633-684, 2005.

CHRISTIAN, T.; SCHNEIDER, R. J.; FÄRBER, H. A.; SKUTLAREK, D.; MEYER, M. T.; GOLDBACH, H. E. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 31, p. 36-44, 2003.

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

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. 199 p. [CLSI document M100-S23].

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Approved Standard—Third Edition**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 99 p. [CLSI document M31-A3].

COELHO, S. M. O.; REINOSO, E.; PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C.; DEMO, M.; BOGNI, C.; SOUZA, M. M. S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 369-374, 2009.

COSTA, E. O.; RAIÁ, R.; WATANABE, E. T.; GARINO JR, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite dos quartos sadios e tratados. **Revista Napgama**, v. 3, p. 14-17, 2000.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, 1999.

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

da COSTA, M. C.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PEREIRA, U. P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, D. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados em mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

de LENCASTRE, H. S. A.; FIGUEIREDO, A. S.; URBAN, C.; TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 632-639, 1991.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, v. 57 n.12, p. 525-527, 2005.

DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, n. 2, p. 193-202, 1996.

ERSKINE, R. J.; WALKER, R. D.; BOLIN, C. A.; BARTLETT, P. C.; WHITE, D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1111-8, 2002.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FAO JECFA, Monographs 14. **Compendium of Food Additive Specifications**. Joint Expert Committee on Food Additives, 77th Meeting, Rome, Italy: FAO/WHO, 2013. p. 4-13.

FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G. Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 105, p. 201-213, 2000.

FERNANDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; PEREA, E. J. *In vitro* activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinobacter baumannii*. **Chemotherapy**, v. 49, n. 1-2, p. 24-26, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004. 182 p.

FRANK, K. L.; REICHERT, E. J.; PIPER, K. E.; PATEL, R. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 888-895, 2007.

GIAMARELLOS-BOURBOLIS, E. J.; GRECKA P; GIAMARELLOU, H. Comparative *in vitro* interactions of ceftazidime, meropenem, and imipenem with amikacina on multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 29, n. 2, p. 81-6, 1997.

HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F., WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 427-33, 1983.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34 p.

HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Developments in nisin research. **Food Research International**, v. 25, n. 1, p. 57-66, 1992.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing Environmental Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 217-224, 2012.

HOOVER, G. D.; STEENSON, L. R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. San Diego, Calif: Academic Press, 1993. 275 p.

HUGO, W. B. Disinfection mechanisms. In: In: RUSSELL, A. D., HUGO, W. B., AYLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3. ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1999. p. 258-283.

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

JACOBSON, B.; CONSUMER, S. **Antibiotics in beef**. Colorado State University Cooperative Extension, Douglas County. Disponível em: <<http://www.ext.colostate.edu/PUBS/COLUMNCC/cc990115.html>>. Acesso em: 26/06/2014.

JOSALA, A. F.; ARAUZ, L. J.; MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 146-154, 2009.

JUYAL, D.; SHAMANTH, A.; PAL, S.; SHARMA, M. K.; PRAKASH, R.; SHARMA, N. The prevalence of inducible clindamycin resistance among *Staphylococci* in a tertiary care hospital - A study from the Garhwal Hills of Uttarakhand, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 1, p. 61-65, 2013.

KALMUS, P.; AASMAE, B.; KARSSIN, A.; ORRO, T.; KASK, K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 1-7, 2011.

KATZ, D. S.; INBAR, I.; SAMINA, I.; PELEG, B. A.; HELLER, D. E. Comparison of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, Freund's complete adjuvant and mineral oil for induction of humoral antibodies, cellular immunity and resistance to Newcastle disease virus in chickens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 7, p. 303-313, 1993.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203-216, 2012.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v.8, p. 1-13, 2008.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n 1-3, p. 39-85, 1993.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and micrococcus. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.A; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R. H., eds. **Manual of Clinical Microbiology**, 6. ed. Washington, DC.: American Society Microbiology, 1999. p. 264-282.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, p. 82-88, 1975.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. Ed. São Paulo: Medsi, 2001. 1488 p.

KREWER C. C.; AMANSO, E. V.; GOUVEIA, G. V. SOUZA, R. L.; COSTA, M. M.; MOTA R. A. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 3, p. 511-8, 2015.

KRUIJFF, B.; vanDAM, V.; BREUKINK, E. Lipid II: A central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 117-121, 2008.

KUTAR, K.; VERMA, A. K.; SHARMA, B.; KUMAR, A.; YADAV, S. K. Analysis of *mecA* gene and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 22-27, 2015.

LÁZARO-DÍEZ, M.; REMUZGO-MARTÍNEZ, S.; RODRÍGUEZ-MIRONES, C.; ACOSTA, F.; ICARDO, J. M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; RAMOS-VIVAS, J. Effects of subinhibitory concentrations of ceftaroline on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilms. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147569, 2016.

LE LAY, C.; AKEREY, B.; FLISS, I.; SUBIRADEZ, M.; ROUABHIA, M. Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1630-1639, 2008.

LEE, J. H. Methicilin (oxacilin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6489-6494, 2003.

LEWIS, J. S.; JORGENSEN, J. H. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 280-285, 2005.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S. P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 2334-2336, 2004.

LINCOPAN, N.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Lipid-covered drug particles: combined action of dioctadecyldimethylammonium bromide and amphotericin B or miconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 66-75, 2006.

LINCOPAN, N.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; DA COSTA, M. H.; FAQUIM-MAURO, E.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: preparation, characterization and activity *in vivo*. **Vaccine**, v. 27, p. 5760-5771, 2009.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. *In vivo* activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 412-8, 2003.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**, 5. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2005. 889 p.

LUTHJE, P., SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 966-969, 2006.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 278-282, 2008.

MARTIN, S. E.; MYERS, E. R.; LANDOLO, J. J. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M. D.; GORHAM, J. R. (Eds.). **Foodborn disease handbook – bacterial pathogens**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1, p. 345-381.

MARTINS, L. M. S.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic Vesicles as Bactericides. **Langmuir**, v. 13, p. 5583-5587, 1997.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

- MATHEW, A. G.; CISELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, p. 115-133, 2007.
- McAULIFFE, O.; ROSS, R. O.; HILL, C. Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 285-308, 2001.
- MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; GREMMELS, J. F. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 398-407, 2006.
- MELO, R. N.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 321-338, 2005.
- MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, D. A.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 859-864, 2012.
- MITSUGUI, C. S.; TOGNIM, M. C. B.; CARDOSO, C. L.; CARRARA-MARRONI, F. E.; GARCIA, L.B. *In vitro* activity of polymyxins in combination with b-lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 447-450, 2011.
- MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 5, n. 11, p. e307, 2007.
- MORENO, I.; LERAYER, A. L.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n.1, 1999.
- MOTTA, R. G.; FRANCO, M. M. J.; LISTONI, F. J. P.; MOTTA, I. G.; MOTTA, D. G.; RIBEIRO, M. G. Indicators of microbiological quality, physical chemistry and detection of antimicrobial residues in raw milk from cows collected of the southeastern state of São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 2, p. 116-118, 2013.
- MOUDGIL, B.; SCHEINER, J. Flocculation and dewatering. In: LYKLEMA, J. **The colloidal background of flocculation and dewatering**. New York: Engineering. Foundation, 1989. p. 1-20.
- NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.
- NIGAM, A.; GUPTA, D.; SHARMA, A. Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. **Microbiological Research**, v. 169, p. 643-651, 2014.
- NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Anual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 8-28, 2009.

- NISHIE, M.; NAGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. **Biocontrol Science**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2012.
- OLIVEIRA, C. P.; SIQUEIRA JR, J. P.; SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. **Revista Verde**, v.7, n. 1, p. 09-15, 2012.
- OLIVEIRA, T. R.; BENATI, C. R.; LAMY, M. T. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1808, n. 11, p. 2629-2637, 2011.
- OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, p. 165-185, 2012.
- PACHECO, L. F.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 258, n. 1, p. 146–154, 2003.
- PANSU, R. M.; ARRIO, B.; RONCIN, J.; FAURE, J. Vesicles versus membrane fragments in DODAC suspensions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 94, p. 796-801, 1990.
- PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.
- PHILPOT, W. N., NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter Attack**. Naperville, IL: Babson Bros. Co., 1991. 150 p.
- PRAGER, M. D.; KANAR, M. C.; FARMER, J. L.; VANDERZEE, J. Effect of dimethyl-dioctadecyl-ammonium-bromide induced macrophages on malignant cell proliferation. **Cancer Letter**, v. 27, p. 225-235, 1985.
- PU, W.; SU, Y.; LI, J.; LI, C.; YANG, Z.; DENG, H.; NI, C. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, e88134, 2014.
- PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci - emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 1-2, 2009.
- RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 3357-3363, 2000.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1772 p.

RAHAL, J. J. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 2, p. S95-S99, 2006.

RAHIMI, E.; ALIAN, F. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. **Veterinarski Arhiv**, v. 83, p. 23-30, 2013.

RAJARAM, G.; MANIVASAGAN, P.; GUNASEKARAN; THILAGAVATHI, B.; SARAVANAKUMAR, A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 138-144, 2010.

RUEGG, P. L.; OLIVEIRA L.; JIN, W.; OKWUMABUA, O. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 98, p. 4521-4534, 2015.

SAHM, D. F. *Streptococci* and *Staphylococci*: laboratory considerations for *in vitro* susceptibility testing. **Clinical microbiology Newsletter**, v. 16, p. 9-14, 1994.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.

SAWANT, A. A.; SORDILLO, L. M.; JAYARAO, B. M. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2991-2999, 2005.

SCHALES, O.; SCHALES, S. S. A simple and accurate method for determination of chloride in biological fluids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 140, p. 879-84, 1941.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 229-235, 2003.

SEARS, P. M.; SMITH, B. S.; STEWART, W. K.; GONZALEZ, R. N.; RUBINO, S. D.; GUSIK, S. A.; KULISEK, E. S.; PROJAN, S. J.; BLACKBURN, P. Evaluation of a nisin based germicidal formulation on teat skin of live cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3185-3190, 1992.

SHEN, J.; WANG, Y.; SCHWARZ, S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1697-706, 2013.

SILVA, L. V.; ARAÚJO, M. T.; SANTOS, K. R. N.; NUNES, A. P. F. Evaluation of the synergistic potential of vancomycin combined with other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 44-50, 2011.

SINGH, A. P.; PRABHA, V.; RISHI, P. Value addition in the efficacy of conventional antibiotics by Nisin against *Salmonella*. **PLoS One**, v. 8, n. 10, e76844, 2013.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 387-399, 1992.

STEVENS, K. A.; SHELDON, B. W.; KLAPES, N. A.; KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 3613-3615, 1991.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; FRANKOWSKA, A.; KOT, B.; ZALEWSKA, M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 3, p. 355-362, 2014.

TAN, X.; JIANG, Y.; HUANG, Y.; HU, S. Persistence of gentamicin residues in milk after the intramammary treatment of lactating cows for mastitis. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 10, n. 4, p. 280-284, 2009.

TAPONEN, S.; JANTUNEN, A.; PYÖRÄLÄ, E.; PYÖRÄLÄ, S. Efficacy of targeted five day parenteral and intramammary treatment of clinical *Staphylococcus aureus* mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant bacterial isolate. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, p. 53-62, 2003.

TONG, Z.; DONG, L.; ZHOU, L.; TAO, R.; NI, L. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism *in vitro*. **Peptides**, v. 31, p. 2003-2008, 2010.

TONG, Z.; ZHANG, Y.; LING, J.; MA, J.; HUANG, L.; ZHANG, L. An *in vitro* study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. **PLoS One**, v. 9, p. e89209, 2014.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2008. n. 10.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R., et al. **Microbiologia**, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 175-182.

TREMBLAY, Y. D. N.; LAMARCHE, D.; CHEVER, P. HAINE, D.; MESSIER, S.; JACQUES, M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 234-246, 2013.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S. C.; ALLEY, T. K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in umbred and primigravid dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 107-114, 1990.

TÜRKYILMAZ, S.; TEKBIYIK, S.; ORYASIN, E.; BOZDOGAN, B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 3, p. 197-203, 2010.

ULLAH, F.; MALIK, S. A. ; AHMED, J.; ULLAH, F.; MAJID, S. S.; AYAZI, M.; HUSSAIN, S.; KHATOON, L. Investigation of the genetic basis of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 6, p. 925-931, 2012.

ÜNAL, N.; ÇINAR, O. D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 369-375, 2012.

VANDERHAEGHEN, W.; CERPENTIER, T.; ADRIAENSEN, C.; VICCA, J.; HERMANS, K.; BUTAYE, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 166-171, 2010.

VERONESI, R.; CORREA, A.; ALTERIO, D. Single dose immunization tetanus. Promising results in human trials. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**, v. 12, p. 46-54, 1970.

VIANA, G.; RINALDI, R. N. Principais fatores que influenciam o desempenho da cadeia produtiva de leite - Um estudo com os produtores de leite do município de Laranjeiras do Sul - PR. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 12, n. 2, p. 263-274, 2010.

VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 244, p. 427-431, 2001.

VIEIRA, T. S. W. J.; RIBEIRO, M. R.; NUNES, M. P.; JUNIOR, M. M.; NETTO, D. P. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 791-796, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. (http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/97892_41503181_eng.pdf).

WU, J.; HU, S.; CAO, L. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3131-3135, 2007.

XU, J.; TAN, X.; ZHANG, X.; XIA, X.; SUN H. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 29-38, 2015.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, p. 127-138, 2013.

ZAFALON, L. F.; POZZI, C. R.; CAMPOS, F. P.; ARCARO, J. R. P.; SARMENTO, P., MATARAZZO, S. V. **Boas Práticas de ordenha**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. 50 p.