UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Silvana Marina Piccoli Pugine

**Efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz
forte sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus***

Pirassununga

2008

Silvana Marina Piccoli Pugine

**Efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz forte
sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Pirassununga

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

P978e

Pugine, Silvana Marina Piccoli

Efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz forte sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus* / Silvana Marina Piccoli Pugine – Pirassununga, 2008.

95 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.

Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.

Unitermos: 1. Auxina 2. Bactéria 3. AIA 4. HRP 5. Membrana I. Título.

*"O valor das coisas não está no tempo em que
elas duram, mas na intensidade com que
acontecem. Por isso existem momentos
inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis".
(Fernando Pessoa)*

Dedico esta conquista

*Ao meu marido Edno, companheiro,
incentivador e grande amor.*

*Aos meus filhos Matheus e Lucas, meus tesouros,
meu porto seguro e luz da minha vida.*

Agradeço

*A DEUS pelas dádivas e pelas oportunidades
de crescimento concedidas a cada dia.*

*Por seres a luz que me guia quando parece
não haver saída.*

*Pelos inúmeros amigos que tens colocado em
meu caminho.*

Agradeço

*Aos meus pais, Geraldo e Júlia
e a minha irmã Silvia.*

*Pelo apoio e incentivo constantes para a
realização dos meus sonhos. Pela ajuda
nos momentos difíceis e pelos
ensinamentos, que tem sido essenciais
para guiar-me ao longo da minha
caminhada.*

Agradecimento especial

A minha orientadora e amiga

Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

*Pela oportunidade, confiança em meu trabalho,
amizade e por todos os ensinamentos.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga pelo acolhimento e pela oportunidade de crescer profissionalmente.

À minha família, Edno, Lucas, Matheus, meus pais Geraldo e Júlia, minha irmã Silvinha e meu cunhado Hansen pelo apoio, carinho e preocupação com meu trabalho.

À minha grande amiga Marcia Monteiro da Silva pelos ensinamentos, paciência e por tantos anos de amizade.

Às minhas novas amigas Luciane Tavares da Cunha e Luciana Regina Mangeti Barreto Mourão, pela amizade, apoio e momentos de alegria.

À Tatiane Real Piza estagiária do laboratório de Química Biológica, pela amizade, dedicação e grande ajuda nos experimentos.

Às estagiárias do Roberta, Lívia, Juliana e Elis pelo apoio e amizade.

A todos os amigos do ZAB, Giovana, Mirele, Sandra, Andréa, Rosângela, Natália, Rafael, Nilton, Antonio (China), Ricardo e Aldo pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles por disponibilizar o biofotômetro para quantificação de DNA.

À professora Andrea Rentz Ribeiro da Pontifícia Universidade Católica – Campus de Poços de Caldas pela doação das cepas de *Staphylococcus aureus*.

À Conceição e Layla, pela paciência e atenção.

À FAPESP pelo apoio financeiro na aquisição dos materiais utilizados na execução do trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

RESUMO

PUGINE, S.M.P. Efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz forte sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus*. 2008. 95 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação do ácido indol-3-acético (AIA) combinado com a peroxidase de raiz forte (HRP), formando um sistema gerador de espécies reativas de oxigênio, sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus*. Para tal, avaliou-se a viabilidade do *S. aureus* através da contagem das unidades formadoras de colônias após crescimento em ágar manitol, potencial e integridade de membrana por citometria de fluxo e integridade do DNA através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Para realização dos ensaios foram utilizadas cepas de *S. aureus* recuperadas de casos de mastites clínicas. As cepas foram cultivadas em meio BHI (*brain-heart-infusion*) a 37°C “overnight”. Nos ensaios, o microrganismo foi incubado na ausência (controle) e presença de AIA (1 mmol/L)/HRP (1 µmol/L) em diferentes tempos (0, 1,5, 3 e 6 horas) a 37°C. Foram realizados também ensaios contendo o microrganismo incubado na presença de AIA ou de HRP. O sistema AIA/HRP inibiu em 96%, 98%, 99% a formação de colônias do microrganismo para os tempos de 1,5, 3 e 6 horas, respectivamente, em relação ao controle em cada tempo. Ocorreu uma redução na polarização da membrana do microrganismo em 38, 69 e 99% nos tempos 1,5, 3 e 6 horas, respectivamente e uma diminuição significativa do número de microrganismos com membrana íntegra de 17 e 22% quando estes foram incubados por 3 e 6 horas, respectivamente em relação ao controle nos respectivos tempos. A adição das enzimas antioxidantes catalase ou superóxido dismutase ao meio de incubação não alterou o efeito deletério promovido pelo sistema AIA/HRP avaliado pelas unidades formadoras de colônias, despolarização e integridade de membrana. O sistema AIA/HRP não induziu a fragmentação do DNA do *S. aureus* após 3 e 6 horas de incubação. No presente estudo, foi possível verificar que a oxidação do AIA pela HRP produz uma resposta citotóxica potente capaz de promover a inibição do crescimento de *S. aureus* em

ágar manitol, provocar a despolarização e a perda da integridade da membrana do microrganismo, sugerindo a possibilidade da utilização do sistema AIA/HRP como uma possível terapia alternativa contra bactérias.

Palavras-chave: auxina, bactéria, AIA, HRP, membrana.

ABSTRACT

PUGINE, S.M.P. Effect of system indol-3-acetic acid/horseradish peroxidase on the viability of *Staphylococcus aureus*. 2008. 95 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

The objective of this study was to evaluate the action of the indole-3-acetic acid (IAA) in combination with horseradish peroxidase (HRP), forming a system generator of reactive oxygen species, on the viability of *Staphylococcus aureus*. To this end, was evaluated the of viability of *S. aureus* through the counting of the colony forming units after growth in mannitol agar, membrane potential and membrane integrity by flow cytometry and integrity of the DNA through the polyacrylamide gel electrophoresis. For the tests were used strains of *S. aureus* recovered from cases of clinical mastitis. The strains were grown in BHI medium (brain-heart-infusion) at 37°C overnight. In the tests, the microorganism was incubated in the absence (control) and presence of IAA (1 mmol/L)/HRP (1 µmol/L) at different times (0, 1.5, 3 and 6 hours) at 37°C. There were also conducted tests containing the microorganism incubated in the presence of IAA or HRP. The system IAA/HRP inhibited at 96%, 98%, 99% colony formation of microorganism to the times of 1.5, 3 and 6 hours, respectively, in relation to the control in every time. There was a decrease in polarization of the membrane of the microorganism on 38, 69 and 99% at times 1.5, 3 and 6 hours, respectively, and a significant decrease in the number of microorganisms with membrane integrity, 17 and 22% when they were incubated for 3 and 6 hours, respectively, in relation to the control in their time. The addition of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase in incubation medium did not alter the deleterious effect promoted by the system IAA/HRP assessed by colony forming units, membrane potential and membrane integrity. The system IAA/HRP did not induce the DNA fragmentation of *S. aureus* after 3 and 6 hours of incubation. In the present study, it was possible to verify that the oxidation of the IAA by HRP produces a potent cytotoxic response capable of promoting the inhibition of growth of *S. aureus* in mannitol agar, causing depolarization and the loss of integrity of the membrane of the

microorganism, suggesting the possibility of using the system IAA/HRP as a possible alternative therapy against bacteria.

Keywords: auxin, bacteria, IAA, HRP, membrane.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – ácido indol-3-acético
HRP – peroxidase de raiz forte
DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
RNA - ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
EROS – espécies reativas de oxigênio
 $O_2^{\bullet -}$ – radical superóxido
 $HO^{\bullet}$ – radical hidroxil
 $RO_2^{\bullet}$ – radical peroxil
 $RO^{\bullet}$ – radical alcóxil
 $HO_2^{\bullet}$ – radical hidroperoxil
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
HOCl – ácido hipocloroso
 A_w – atividade de água
 $\Delta\psi$ – diferença de potencial
UFC – unidades formadoras de colônias
BHI – *brain heart infusion*
EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*
PBS – *phosphate buffered saline*
UV/VIS – ultravioleta/visível
DCFH-DA – *2,7-dichlorofluorescein diacetate*
DCF – *dichlorofluorescein*
UI – unidades internacionais
CAT – catalase
SOD – superóxido dismutase
 $DiOC_2(3)$ – *3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide*
PI – *propidium iodide*
TO – *thiazole orange*
NO – óxido nítrico
 $ONOO^-$ – peroxinitrito
 $CaCl_2$ – cloreto de cálcio
 $MgCl_2$ – cloreto de magnésio
ATP – *adenosine 5'-triphosphate*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano (MARCHIORO, 2005)	23
Figura 2. Peroxidase de raiz forte: Representação esquemática planar do grupo prostético da enzima denominado grupo <i>heme</i> (WILBERG, 2003).....	26
Figura 3. Ciclo clássico da HRP e vias para produção da forma ferrosa e HRP-III. Ciclo clássico da HRP (reações 1-3), redução da forma férrica da enzima à forma ferrosa (reação 4) e vias possíveis para formação de composto III (reações 5-7) (Adaptado de Dunford (1991) e de Dunford (1999)).....	28
Figura 4. Esquema ilustrando as estruturas da parede celular que envolve a membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas (Adaptado de Madigan et al., 2003)	36
Figura 5. Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por agentes antimicrobianos (Adaptado de Madigan et al., 2003).....	38
Figura 6. Esquema ilustrando os mecanismos de morte necrose e apoptose em células eucarióticas (ANAZETTI; MELO, 2007).....	41
Figura 7. Crescimento de colônias típicas de <i>S. aureus</i> em ágar <i>Baird Parker</i> . Presença de colônias pretas circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo)..	54
Figura 8. Esfregaços utilizando cepas de <i>S. aureus</i> realizados em lâminas de microscopia e corados pelo método de Gram. Aparecimento de cocos corados em roxo em forma de “cachos de uva”. (1000x).....	55
Figura 9. Presença da enzima catalase no <i>S. aureus</i> : tubo (1) presença do microrganismo, formação de bolhas indicando atividade da catalase e tubo (2) ausência do microrganismo, não formação de bolhas, indicando teste negativo.....	57

Figura 10. Presença da enzima coagulase no <i>S. aureus</i> : tubo (1) presença do microrganismo, formação de coágulo indicando a atividade da coagulase e tubo (2) ausência do microrganismo, sem o coágulo indicando teste negativo.....	58
Figura 11. Presença da termonuclease no <i>S. aureus</i> : orifício (1) presença do microrganismo, formação do halo róseo indicando atividade da termonuclease e orifício (2) ausência do microrganismo, não formação do halo indicando teste negativo..	59
Figura 12. Variação espectral da HRP (1 μ M) durante a reação com o AIA (1 mM) em PBS a 37°C. Varredura realizada entre 350 e 600 nm da HRP nativa e após 5 segundos e 120 segundos de incubação com o AIA.....	61
Figura 13. Espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP: (A) Detecção indireta de espécies reativas por medida da absorbância do DCF a 490 nm e (B) porcentagem relativa das espécies reativas calculada através dos valores de áreas abaixo da curva durante o tempo de 50 minutos extraídas da Figura 13A, excluindo-se a quantidade de espécies reativas provenientes somente do AIA. O DCF foi gerado através da reação entre o DCFH-DA e as espécies reativas geradas. Os dados estão representados como a média e desvio padrão (n=6)..	64
Figura 14. Crescimento de <i>S. aureus</i> incubados por 0h, 1,5h, 3h e 6h em PBS na ausência (controle) e presença de CAT, HRP, AIA, AIA/HRP ou AIA/HRP + CAT, avaliado após 48 h de cultura em ágar manitol.	67
Figura 15. Efeito do sistema AIA/HRP sobre o potencial de membrana do <i>S. aureus</i> após incubação (0, 1,5, 3 e 6 horas) em PBS na ausência (controle) presença de HRP, AIA ou AIA/HRP. Os resultados indicam o número de microrganismos com membrana polarizada e foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n=8).	72

Figura 16. Efeito do sistema AIA/HRP sobre a integridade de membrana do *S. aureus* após incubação (0, 1,5, 3 e 6 horas) em PBS na ausência (controle) e presença de HRP, AIA ou AIA/HRP. Os resultados indicam o número de microrganismos com membrana íntegra e foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n=8)..... 73

Figura 17. Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *S.aureus* após 3 horas de incubação em PBS: **(1)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(2)** *S. aureus* antes da incubação (tempo zero); **(3)** *S. aureus* após incubação; **(4)** *S. aureus* após incubação na presença de HRP; **(5)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA; **(6)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA/HRP. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características..... 76

Figura 18. Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *Staphylococcus aureus* após 6 horas de incubação em PBS: **(1)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(2)** *S. aureus* antes da incubação (tempo zero); **(3)** *S. aureus* após incubação; **(4)** *S. aureus* após incubação na presença de HRP; **(5)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA; **(6)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA/HRP. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Unidades formadoras de colônias (UFC/mL x 10³) de *S. aureus* cultivados em ágar manitol por 48 horas após incubação do microrganismo em PBS (0, 1,5, 3 e 6 horas) na ausência (controle) e presença de AIA/HRP, AIA/HRP/CAT, HRP, AIA, ou CAT 68

Tabela 2. Unidades formadoras de colônias (UFC/mL x 10³) de *S. aureus* cultivados em ágar manitol por 48 horas após incubação do microrganismo em PBS enriquecido com manitol, CaCl₂ e MgCl₂ (0, 1,5, 3 e 6 horas) na ausência (controle) e presença de AIA/HRP, HRP ou AIA..... 69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Ácido indol-3-acético (AIA)	22
2.2 Peroxidase de raiz forte (HRP).....	24
2.3 Sistema AIA/HRP	28
2.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	30
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	31
2.6 Parede celular e membrana citoplasmática dos microrganismos	35
2.7 Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos sobre os microrganismos	37
2.8 Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose	40
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Reagentes	44
4.2 Caracterização do <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.2.1 Crescimento do microrganismo em ágar <i>Baird Parker</i>	45
4.2.2 Morfologia celular	45
4.2.3 Presença da catalase	45
4.2.4 Presença da coagulase	46
4.2.5 Presença da termonuclease.....	46
4.3 Verificação do ciclo catalítico da HRP	47
4.4 Determinação de espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP	47

4.5 Preparo do microrganismo para incubação com o sistema AIA/HRP.....	48
4.6 Incubação do microrganismo com o sistema AIA/HRP	48
4.7 Avaliação da viabilidade do microrganismo por unidades formadoras de colônias (UFC).....	49
4.8 Avaliação do potencial de membrana do microrganismo por citometria de fluxo	50
4.9 Avaliação da integridade da membrana do Microrganismo por Citometria de Fluxo	50
4.10 Análise da integridade do DNA.....	51
4.10.1 Extração de DNA.....	52
4.10.2 Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida	53
4.11 Análise dos resultados	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Caracterização do <i>Staphylococcus aureus</i>	54
5.1.1 Crescimento do microrganismo em ágar <i>Baird Parker</i>	54
5.1.2 Morfologia celular	55
5.1.3 Presença da catalase	56
5.1.4 Presença da coagulase	57
5.1.5 Presença da termonuclease	59
5.2 Ciclo catalítico da HRP na presença de AIA e espécies reativas geradas pelo sistema HRP/AIA	60
5.2.1 Verificação do ciclo catalítico da HRP.....	60
5.2.2 Determinação de espécies reativas geradas pelos sistemas HRP/AIA	62
5.3 Ação do sistema AIA/HRP sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	65

5.3.1 Ação do sistema AIA/HRP sobre a formação de colônias de <i>S. aureus</i>	65
5.3.2 Ação do sistema AIA/HRP sobre a polarização e integridade de membrana de <i>S. aureus</i>	70
5.3.3 Ação do sistema AIA/HRP sobre a integridade do DNA de <i>S. aureus</i> ..	74
6. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

O ácido indol-3-acético (AIA) é um hormônio de crescimento de plantas e sua metabolização é catalisada pela peroxidase de raiz forte (HRP). A oxidação do AIA por HRP vem sendo estudada há longa data (KENTEN, 1955), mas seu mecanismo não está totalmente elucidado.

O ácido indol-3-acético, na presença de peroxidase, age como um prooxidante avaliado pelo aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (CANDEIAS et al., 1994; CANDEIAS et al., 1997), pela sua citotoxicidade (DE MELO et al., 2004 e 1997; FOLKES; WARDMAN, 2001), indução da peroxidação lipídica e lesões em ácidos nucleicos (FOLKES et al., 1999). Em mamíferos, o estresse oxidativo causado pelo sistema AIA/HRP se apresenta como um composto alternativo na terapia contra células tumorais (FOLKES et al., 1999; FOLKES; WARDMAN, 2001; GRECO et al., 2000; KIM et al., 2004).

Atualmente, não há estudos sobre a utilização do sistema AIA/HRP na eliminação de microrganismos. Por isso, o objetivo do estudo apresentado nesta dissertação foi o de avaliar o poder prooxidante do AIA combinado com a HRP sobre a viabilidade do microrganismo *Staphylococcus aureus*.

O *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno responsável por uma ampla variedade de enfermidades comumente adquiridas como infecções, intoxicações alimentares e síndromes sistêmicas. A prevalência de múltiplas classes de resistência aos antibióticos tem complicado os tratamentos, além de aumentar a morbidez e a mortalidade associada com patologias estafilocócicas (BOZDOGAN; APPELBAUM, 2004; MEKA, et al., 2004).

A alta incidência de *S. aureus* como agente causador de mastites em rebanhos leiteiros torna esta infecção importante epidemiologicamente, estando relacionada, também, à presença deste microrganismo no leite (CENCI-GOGA et al., 2003; ZECCONI; HAHN 2000).

A mastite, um processo inflamatório da glândula mamária pode ter várias causas, sendo que a mastite infecciosa é a mais freqüente, geralmente causada por bactérias. Os fungos e as algas também podem estar envolvidos na sua etiologia (BRAMLEY; DODD, 1984).

Em qualidade e produtividade animal, objetivando buscar um melhor desempenho, é preciso vários cuidados principalmente em relação às infecções. A prevenção e o tratamento da mastite são preocupações da indústria leiteira, pois o uso de antibióticos para combater as infecções intramamárias é associado à possibilidade de desenvolver resistência ocasionando perda na produtividade e à contaminação dos alimentos com resíduos dos mesmos (COSTA, 1998). Com o surgimento de um mercado consumidor preocupado com resíduos em alimentos e com a expansão dos sistemas de produção pecuária orgânica, aumenta a necessidade de se utilizar métodos diferentes dos convencionalmente conhecidos (FONSECA, 2001).

Assim, os estudos *in vitro* para se avaliar a possível ação antimicrobiana do sistema AIA/HRP podem compor uma base sólida para futuras aplicações deste sistema no combate aos microrganismos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ácido Indol-3-acético (AIA)

O ácido Indol-3-acético é uma auxina natural presente na maioria dos organismos vivos e exerce papel importante no controle de muitos processos fisiológicos nas plantas, tais como a divisão celular, crescimento, diferenciação e resposta aos estímulos abióticos (GOLDSMITH, 1993; DAVIES, 1995; BARTEL, 1997).

O AIA, um metabólito do aminoácido triptofano (Figura 1), é produzido nas células vegetais, animais e em alguns microrganismos (GORDON; BARR; FRY, 1972; MILLS; FINLAY; HADDAD, 1991). Por ser uma auxina é largamente distribuído nos brotos, folhas jovens, flores e frutos das plantas.

Em animais o AIA está presente na urina (KOGL; HAGEN-SMITH; ERXLEBEN, 1933), no líquido cefalorraquidiano (BERTILSSON; OALMER, 1972), no plasma (MARTINEZ et al., 1993) e em diversos órgãos como pulmão, rim, fígado e cérebro (TUSELL et al., 1984). A presença de AIA nos animais pode ser devida a três vias: a) síntese a partir do triptofano (GORDON; BARR; FRY, 1972); b) absorção intestinal via produção bacteriana e c) absorção intestinal via dieta rica em vegetais (WEISSABACH et al., 1959; MARTINEZ et al., 1993). Segundo alguns autores a administração intragástrica de AIA não apresenta toxicidade para ratos (PUGINE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007) ou camundongos (MOURÃO, 2007).

Em plantas o AIA é sintetizado em folhas jovens e sementes, principalmente por via dependente de triptofano, tendo seus níveis celulares controlados pelas

taxas relativas de biossíntese, catabolismo, conjugação e transporte (CATALÁ; CROZIER; CHAMARRO; 1994). O AIA em plantas pode ser metabolizado através de duas vias: a) uma via de oxidação descarboxilativa, catalisada por peroxidases cujos principais produtos são o 3-metilenoxindol, o 3-hidroximetilenoxindol, o indol-3-aldeído e o indol-3-metanol (BRANDURSKI et al., 1995), sendo a formação dos vários produtos, dependente de fatores como a razão enzima/substrato, cofatores e pH da reação (CATALÁ et al., 1992); b) uma via de oxidação não descarboxilativa, onde o principal produto formado é o oxindol-3-acético.

Figura 1. Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano (MARCHIORO, 2005).

Em microrganismos, o AIA está envolvido no desenvolvimento morfogênico do *Saccharomyces cerevisiae*. Em baixas concentrações ele induz a adesão e filamentação do *Saccharomyces* e dos outros fungos, porém em concentrações elevadas, inibe o seu crescimento (PRUSTY; GRISAFI; FINK, 2004). Em bactérias do solo, tais como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* e *Rhizobium* sintetizam o AIA como parte de um sistema para comunicar-se com sua planta hospedeira, e muitas delas usam o AIA em interações patogênicas. Estas bactérias sintetizam AIA por 3 vias: a) duas vias dependentes de triptofano, como a via indol-3-acetamida e indol-3-piruvato; b) uma via independente de triptofano (LAMBRECHT et al., 2000).

Em *Escherichia coli* o AIA funciona como regulador do metabolismo celular: este coordena mudanças no metabolismo do carbono e nitrogênio que são usados por estas células para manutenção da homeostase metabólica e para otimização da produção de energia durante a vida aeróbica (BIANCO et al., 2006).

2.2 Peroxidase de raiz forte (HRP)

A peroxidase de raiz forte (HRP) é uma importante enzima de plantas e está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligação de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos e regulação da elongação das células, entre outras (VEITCH, 2004; HIRAGA, 2001). A HRP, na sua forma nativa contém um grupamento heme, ferriprotoporfirina IX, com quatro nitrogênios pirrólicos ligados

ao Fe(III) (Figura 2). A quinta posição de coordenação do ferro, na porção proximal do heme, está ocupada por um resíduo de histidina da cadeia polipeptídica. Já a sexta posição de coordenação do átomo de ferro, na porção distal do heme, permanece livre na enzima nativa ou ocupada com oxigênio nas formas ativas da enzima (O'BRIEN, 2000).

A HRP utiliza o peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos, como monofenóis, polifenóis e aminofenóis, dentre outros (FANTIBELLO-FILHO; CRUZ VIEIRA, 2002).

As peroxidases de plantas têm atraído, consideravelmente, o interesse de pesquisadores, pelo envolvimento dessas enzimas em diversas reações biológicas, como: reações de oxidação, processos de diferenciação celular, crescimento, controle de funções metabólicas e resistência a patógenos (SRIVASTAVA; VAN HUUSTEE, 1977; HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KERE, 1982; RAMAMURTHY et al., 2000).

A enzima HRP pode ser facilmente extraída da planta “rábano silvestre - raiz forte” e é, provavelmente, a peroxidase mais estudada (O'BRIEN, 2000).

A HRP tem sido usada na polimerização de fenólicos, despolimerização da lignina, S-oxidação de dibenzotiofeno, polimerização da acrilamida e branqueamento de corante (DURÁN; BROMBERG; KUNZ, 2001). Esta enzima é muito utilizada também como ferramenta analítica na área de análises clínicas (testes bioquímicos e imunoenzimático), controle de qualidade de alimentos e pesquisa biotecnológica, devido à facilidade de sua obtenção, especificidade e características cinéticas (ALONSO LOMILLO; KAUFFMANN; ARCOS MARTINEZ, 2003). Esta enzima apresenta uma ótima estabilidade a 37°C, alta atividade em meio neutro, ausência

de toxicidade e facilidade para ser conjugada com anticorpos e polímeros (VEITCH, 2004).

Figura 2. Peroxidase de raiz forte: Representação esquemática planar do grupo prostético da enzima denominado grupo *heme* (WILBERG, 2003).

Em geral a HRP atua sobre seus substratos através de um ciclo dependente de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos (DUNFORD, 1991).

Segundo Dunford (1999) e Berglund et al., (2002), a HRP pode apresentar-se de quatro formas diferentes:

a) HRP nativa: que apresenta como característica principal o pico máximo da banda Soret localizado em 403 nm;

b) Composto I: nesta forma o pico de absorção máxima da banda Soret decresce aproximadamente pela metade em relação à HRP nativa;

c) Composto II: que apresenta um pico de absorção máxima da banda Soret deslocado para a região de 420 nm e duas bandas bem definidas na região visível em 527 e 554 nm;

d) Composto III: é postulado como um complexo do íon ferro com superóxido, e pode se apresentar em duas formas:

Figura 3. Ciclo clássico da HRP e vias para produção da forma ferrosa e HRP-III.

Ciclo clássico da HRP (reações 1-3), redução da forma férrica da enzima à forma ferrosa (reação 4) e vias possíveis para formação de composto III (reações 5-7) (Adaptado de Dunford (1991) e de Dunford (1999)).

2.3 Sistema AIA/HRP

O AIA é oxidado pela HRP por uma via dependente de peróxidos envolvendo o ciclo normal da peroxidase (YAMADA; YAMAZAKI, 1974), ou por uma outra via envolvendo a HRP no estado ferroso e HRP-III, independente de hidroperóxidos e requerendo oxigênio (METODIEWA; DUNFORD, 1989).

A peroxidase de raiz forte, através da redução do peróxido de hidrogênio ou de outros peróxidos do tipo ROOH, catalisa a oxidação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos (DUNFORD, 1991). Entretanto, uma característica inerente ao AIA como substrato desta enzima é inicialização da ação catalítica da HRP mesmo na ausência de hidroperóxido, explicado pela autooxidação deste ácido na presença de oxigênio gerando o cátion radical indolil-3-acético um inicializador do processo. O mesmo não ocorre com outras peroxidases como a citocromo c peroxidase, peroxidases fúngicas e microperoxidases que são inativas na oxidação do AIA na ausência de peróxido de hidrogênio (SAVITSKY et al., 1999).

Em células eucarióticas, Folkes et al. (2002) demonstraram que o AIA em combinação com a peroxidase de raiz forte pode ser um composto alternativo na produção de uma terapia contra o câncer, além disso, sabe-se que o AIA sozinho não produz nenhum efeito citotóxico e se torna ativo após a descarboxilação oxidativa pela HRP (FOLKES; WARDMAN, 2001). Recentemente foi demonstrado que a combinação AIA/HRP induz a apoptose (morte programada) em células de melanoma G361 (KIM; JEON; PARK, 2004).

Kim et al., 2006, sugeriram que o peróxido de hidrogênio é o principal mediador do AIA/HRP na indução de apoptose nas células de melanoma G361. Neste caso, experimentos realizados adicionando-se catalase reduziram a indução da apoptose pelo sistema AIA/HRP, confirmando assim que o H_2O_2 é o mediador potencial deste sistema.

Radical peroxil gerado por AIA/HRP pode induzir a peroxidação lipídica em lipossomas (CANDEIAS et al., 1995a) e pode ser citotóxico a células tumorais (CANDEIAS et al., 1995b). A combinação de AIA/HRP induz a perda da integridade

da membrana, fragmentação do DNA e a condensação de cromatina em leucócitos (DE MELO et al. 2004).

2.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Consideram-se espécies reativas de oxigênio todas aquelas moléculas que contêm um oxigênio em um estado altamente reativo e com alta capacidade oxidativa, entre elas encontram-se as espécies radicalares (radicais livres) como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil ($HO^{\bullet}$), peroxil ($RO_2^{\bullet}$), alcoxil ($RO^{\bullet}$) e o hidroperoxil ($HO_2^{\bullet}$) e as espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e o oxigênio singlete ($KOHEN$; $NYSKA$, 2002).

São classificados como radicais livres as moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados ($HALLIWELL$; $GUTTERIDGE$, 1999; $ROVER JÚNIOR$ et al., 2001; $CAMPOS$; $YOSHIDA$, 2004).

As EROs são espécies extremamente instáveis, e podem atacar diversos alvos celulares, a consequência disso é a oxidação dos fosfolípidos de membranas celulares e subcelulares, DNA e proteínas ($PACKER$, 1997). O excesso das EROs é crítico para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais.

Os aminoácidos que compõem as proteínas são susceptíveis a reações com EROs. A oxidação de um ou mais aminoácidos pode romper as estruturas secundária e terciária de proteínas, aumentando sua hidrofobicidade por exposição dos aminoácidos do seu interior. O radical hidroxil é particularmente tóxico para as proteínas, pois pode reagir com o carbono alfa de qualquer aminoácido ($RYTER$; $PACIFICI$; $DAVIES$, 1990).

Os ácidos graxos polinsaturados, constituintes das membranas biológicas são também um alvo importante para o ataque de EROs. A oxidação desses lipídeos é conhecida como peroxidação lipídica; um processo degradativo que leva a alterações estruturais e funcionais das membranas celulares e intracelulares, prejudicando seu metabolismo, podendo inclusive induzir a morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). A membrana celular é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações em sua estrutura e permeabilidade (GRAY et al., 1978; FERREIRA; MATSUBARA, 1997), resultando em perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Dentre as EROs, o mais potente oxidante em sistemas biológicos é o radical hidroxil, com um tempo de vida extremamente curto e com alta reatividade a uma grande variedade de moléculas orgânicas, pois necessita apenas de mais um elétron para se estabilizar (YU, 1994).

Sabe-se que em microrganismos os agentes bactericidas, independentemente da interação droga-alvo, estimulam a produção de radical hidroxil altamente deletério para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que acabam por contribuir para a morte celular (KOHANSKI et al., 2007).

2.5 *Staphylococcus aureus*

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986), as bactérias do gênero *Staphylococcus*, pertencentes à família *Micrococcaceae*, são

cocos Gram-positivos, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μm , imóveis, não esporulados e capsulados. Quando visualizados em microscópio, podem aparecer isolados, aos pares, na forma téttrade, cadeias curtas ou na forma de cachos irregulares.

A maior parte das espécies de *Staphylococcus* apresenta metabolismo respiratório e fermentativo e têm capacidade de fermentar uma grande variedade de carboidratos em condições de aerobiose com produção final de ácido (KLOOS; BANNERMAN, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 40 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2006). O *Staphylococcus aureus* é a espécie mais relacionada com casos e surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade da maioria de suas cepas de produzir enterotoxinas (JAY, 1996; SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

Os *S. aureus* secretam várias enzimas e toxinas, consideradas fatores de virulência (LEBEAU et al., 1994), produtores de elevada quantidade da enzima catalase, parecem possuir uma maior taxa de sobrevivência no interior de fagócitos polimorfonucleares (MANDELL, 1975).

Os *S. aureus* são bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 48°C; as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, com ótimo entre 40°C e 45°C. Os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que devem estar em condições ótimas (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Em relação ao pH, *S. aureus* cresce na faixa de 4 a 9, com o ótimo entre 6 e 7 (JAY, 1996).

Segundo Franco e Landgraf (2003) estes microrganismos apresentam tolerância a concentrações de 10 a 20% de NaCl, e a nitratos, e têm capacidade de

crescer em valores de atividade de água (A_w) de 0,86 e sob condições ideais, podem se desenvolver em valores de A_w de até 0,83.

Para o isolamento, contagem e identificação de *S. aureus* utilizam-se, primeiramente, um ágar seletivo-diferencial, sendo o mais usado o ágar *Baird-Parker*, seguido da confirmação bioquímica da espécie através dos testes da catalase, coagulase e termonuclease (DOWNES; ITO, 2001; SILVA et al., 2000). Os testes da catalase e da produção de coagulase são os mais utilizados para a identificação de *S. aureus*, porém, o teste da termonuclease é muito usado como auxiliar para diferenciação entre *S. aureus* e outras espécies de estafilococos (BASCOMB; MANAFI, 1998). A capacidade da maioria das cepas de *S. aureus* de fermentar o manitol é uma característica utilizada por muitos microbiologistas para sua identificação (STEERE; MALLISON, 1989; LENNETTE, 1985; WENZEL et al, 1991).

Um fato que tem despertado a atenção dos pesquisadores é que, apesar de o *S. aureus* ser considerado um dos principais patógenos humanos, sendo encontrado em um largo espectro de doenças, desde lesões superficiais até severas infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunodeprimidos, no indivíduo sadio, esse microrganismo é freqüentemente encontrado, em baixas quantidades, em fossas nasais, pele, garganta e intestino sem causar nenhum problema (FERREIRA; GONÇALVES; ASSIS, 1985; NOVAK, 1999). O *Staphylococcus aureus* coloniza e sobrevive em uma larga variedade ambiental (WALDVOGEL, 1985).

A presença do *S. aureus* nas mãos e em outras superfícies resulta de vínculo epidemiológico decorrente de disseminação a partir dos principais sítios (RADDI; LEITE; MENDONÇA, 1988). Assim o portador de *S. aureus*, sendo manipulador de alimentos ou trabalhador em sala de ordenha representa indiscutível elo na cadeia

epidemiológica (CRUICKSHANK, 1990). Em animais, diversos trabalhos exemplificam a incidência particularizada de *Staphylococcus ssp.* no úbere de vacas e, conseqüentemente, no leite cru procedente de fêmeas sadias e/ou com mastite (NIEDBACH; BALDY-CHUDZIC; STOSIK, 2000).

A erradicação destes microrganismos é difícil, pois sua presença pode ser assintomática e estes sobrevivem fora do hospedeiro dentro de poeira, solo, água e outros ambientes. É a adaptabilidade deste microrganismo que permite que seja considerado como um patógeno oportunista (CLEMENTS; FOSTER, 1999).

A importância médico-sanitária do *Staphylococcus aureus*, face à sua patogenicidade para o homem e os animais, tem sido muito destacada, principalmente devido a sua elevada taxa de mutabilidade, e o aumento considerável do número de cepas resistentes aos agentes antibióticos (WELLER, 1959). O crescente problema da resistência microbiana aos antibióticos existentes tem estimulado grande interesse no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com novos mecanismos de ação (NICOLAS; VANHOYE; AMICHE, 2003; TOKE, 2005).

O *Staphylococcus aureus* apresenta-se como um microrganismo de grande importância e alta incidência em mastite contagiosa nos rebanhos mundiais, e devido a sua elevada resistência a antibióticos, seu tratamento torna-se difícil (ZECCONI; HAHN, 2000). Esse microrganismo é o principal agente responsável pelo aumento na contagem de células somáticas no leite, o que acarreta redução na produtividade e comprometimento na composição nutricional e microbiológica do leite (ASPENGER, 1995).

O controle da mastite bovina e a cura dos animais infectados constituem um dos maiores problemas enfrentados na pecuária leiteira (DEGRAVES; FETROW,

1993) e é a principal causa para o tratamento de vacas em lactação com antimicrobianos trazendo riscos ao consumidor (COSTA, 1996). A presença de resíduos de antimicrobianos no leite representa um problema de saúde pública, pois podem desencadear reações alérgicas em indivíduos sensíveis, contribuem para a seleção de microrganismos patogênicos resistentes e interferem na produção de derivados (COSTA, 2002).

Com o surgimento de um mercado consumidor preocupado com os resíduos em alimentos e com a expansão dos sistemas de produção pecuária orgânica, aumenta a necessidade de se utilizar métodos diferentes dos convencionalmente conhecidos (FONSECA, 2001).

2.6 Parede celular e membrana citoplasmática dos microrganismos

A parede celular dos microrganismos é uma estrutura rígida e porosa que envolve totalmente a membrana citoplasmática (Figura 4). Essa parede mantém a forma e protege os microrganismos que possuem uma alta pressão osmótica interna (PELCZAR; REID; CHAN, 1981).

A parede celular das bactérias Gram-positivas contém glicopeptídeos (polímeros de N-acetilglicosamina e de ácido N-acetilmurâmico) ligados de forma cruzada, e ácidos teicóicos que são polímeros de ribitol (monossacarídeos de cinco carbonos) com fosfato. Os ácidos teicóicos atuam na aderência específica das bactérias Gram-positivas às superfícies mucosas (KONEMAN et al., 2001; SIDOW; JOHANNSEN; LABISCHINSKI, 1990). O número de ligações cruzadas é típico para cada microrganismo e confere a rigidez final da parede celular (DIJKSTRA; KECK,

1996). A camada de peptidoglicanos das bactérias Gram-positivas é mais espessa que a de bactérias Gram-negativas (KLOSS; BANNERMAN, 1999).

Figura 4. Esquema ilustrando as estruturas da parede celular que envolve a membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas (Adaptado de Madigan et al., 2003).

A parede celular do *S. aureus* apresenta as características típicas das bactérias Gram-positivas. Sob o microscópio eletrônico aparece como uma estrutura homogênea relativamente espessa (cerca de 15 a 40 nm). (GIESBRECHT et al., 1998)

Imediatamente abaixo da parede celular do microrganismo existe uma fina membrana com espessura de aproximadamente de 7,5 nm, chamada membrana citoplasmática. Trata-se de uma membrana semipermeável, seletiva, que controla a passagem de nutrientes e resíduos, para dentro e para fora do microrganismo,

respectivamente. Qualquer lesão nesta membrana, provocada por tratamentos físicos ou químicos, pode resultar em morte celular (PELCZAR; REID; CHAN, 1981).

A utilização de critérios do funcionamento celular tais como o potencial e integridade de membrana, permite caracterizar os diferentes estados metabólicos da célula (NEBE-VON CARON et al., 2000).

Em bactérias com membranas citoplasmáticas intactas e metabolicamente ativas, o interior da membrana encontra-se carregado negativamente. A despolarização da membrana ocorre quando o valor de diferença de potencial ($\Delta\psi$) se desloca para valores menos negativos, portanto, mais próximos de zero e, a hiperpolarização ocorre quando a alteração dos valores de $\Delta\psi$ se dá na direção oposta, ou seja, para valores mais negativos. O valor de $\Delta\psi$ é nulo quando a membrana permite a livre passagem de íons, o que pode suceder quando a célula sofre, por exemplo, um tratamento térmico, ou um tratamento com antibióticos da família das beta-lactamas, entre outros (NOVO et al., 1999).

Quando uma célula encontra-se sob estresse, os sistemas de transporte ativo são afetados, seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática, a permeabilização da mesma e em consequência disso a morte (NEBE-VON-CARON; BRADLEY, 1995; HEWITT; NEBE-VON-CARON, 2001).

2.7 Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos sobre os microrganismos

De modo geral, os agentes antimicrobianos promovem dois tipos de efeitos sobre a bactéria, conduzem à morte ou inibem o crescimento ou a reprodução. Estes

efeitos são exercidos essencialmente por alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática, interferir na síntese protéica ou da parede celular ou, ainda, interferir na replicação cromossômica (Figura 5) (WALSH, 2000).

Figura 5. Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por agentes antimicrobianos (Adaptado de Madigan et al., 2003).

Atualmente terapias antimicrobianas, dividem-se em duas categorias gerais: com drogas bactericidas, que matam bactérias com eficiência maior que 99,9%, e drogas bacteriostáticas, que limita o seu crescimento (PANKEY; SABATH, 2004).

Independente do mecanismo de ação, os agentes antimicrobianos dividem-se em várias classes: β -lactâmicos, inibidores de β -lactamase, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifamicinas, sulfonamidas, quinolonas e outros (COATES et al., 2002). Estes compostos atacam uma variedade de sistemas bacterianos incluindo replicação do DNA, transcrição, metabolismo do ácido fólico, a síntese protéica, síntese e integridade da parede celular. Cada classe tem a sua própria especificidade ou ação para uma determinada bactéria (SPRATT, 1994).

Os antimicrobianos β -lactâmicos e glicopeptídeos, por exemplo, agem como inibidores da síntese do peptidoglicano tendo dois efeitos gerais sobre a parede celular de uma bactéria em divisão: (1) inibição da ação das transpeptidases, reduzindo a quantidade de ligações cruzadas entre os peptídeos de dois resíduos de murNAc em uma rede de peptidoglicano crescente, enfraquecendo a estrutura da parede celular e (2) ativação de autolisinas que digerem o peptidoglicano, causando a lise da bactéria (GIESBRECHT et al., 1998). Por serem geralmente bem absorvidos, eles são clinicamente úteis, no entanto, a sua utilidade clínica é frequentemente limitada pelo aparecimento de resistência (MANDELL; PERTI, 1996).

Na medicina veterinária, os aminoglicosídeos são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas, como mastites e enterites (BOGIALLI et al, 2005). Na maioria dos produtos estes estão combinados com penicilina G e outros β -lactâmicos (WHITTEM; HANLON, 1997). Os aminoglicosídeos penetram a parede celular e a membrana, ligando-se aos ribossomos 30S, diminuem a síntese protéica levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, isto promove alteração na membrana celular com saída de constituintes essenciais ao funcionamento da célula, provocando a morte da bactéria (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

A tetraciclina utilizada no tratamento de infecções em aves, bovinos, ovinos e suínos, (CHOPRA; HAWKEY; HINTON, 1992) inibe a síntese protéica bacteriana, impedindo a associação de aminoacil-tRNA com o ribossomo bacteriano (SCHNAPPINGER; HILLEN, 1996). Para interagir com os seus objetivos estas moléculas necessitam percorrer um ou mais sistemas de membranas, dependendo se o organismo for Gram-positivo ou Gram-negativo.

Por outro lado, a telavancina um agente bactericida lipogligopeptídeo, causa alterações no potencial e permeabilidade da membrana de bactérias Gram-positivas (HIGGINS et al., 2005). Já a teicoplanina promove a lise de bactérias Gram-positivas por que afetam a integridade da membrana celular (CHMARA, et al., 1991).

2.8 Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose

Nos últimos anos vários estudos foram realizados com o intuito de compreender os mecanismos de morte celular das células eucarióticas. Entretanto, não há enfoque na literatura para os mecanismos de morte celular de microrganismos.

Sabe-se que a morte celular das células eucarióticas pode ocorrer por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose. A necrose ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas danificando a membrana plasmática e conseqüentemente levando a morte celular, também é chamada de morte celular patológica ou acidental. Já a apoptose tem como objetivo remover células infectadas, danificadas ou transformadas, pela ativação de um programa de autodestruição celular intrínseco e controlado, é um importante

mecanismo celular, tanto no desenvolvimento quanto na homeostase de tecidos adultos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; RAFFRAY; COHEN, 1997; MCCONKEY, 1998, ANAZETTI; MELO, 2007).

Apoptose caracteriza-se biologicamente por fragmentação cromossomal do DNA, associado a uma série de anormalidades de expressão genética, descrita inicialmente por Kerr, Wyllie e Currie em 1972. Pode ser diferenciada da necrose por alterações típicas celulares, como redução de volume celular e condensação da cromatina nuclear, além de pequenas formações bolhosas na membrana celular (Figura 6).

Figura 6. Esquema ilustrando os mecanismos de morte necrose e apoptose em células eucarióticas (ANAZETTI; MELO, 2007).

Em geral, quando um agente tóxico está presente no meio biológico em concentrações capazes de provocar lesões celulares intensas, a célula morre por

necrose. No entanto, acredita-se que essas sejam condições extremas e que na maioria das vezes as células afetadas sejam removidas por apoptose. Atualmente, acredita-se que a apoptose é a principal forma de morte celular em decorrência de processos fisiológicos e que a necrose ocorre raramente, somente em situações em que se observam danos celulares extremos (RAFFRAY; COHEN, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz forte (AIA/HRP) sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- a) Verificar o ciclo catalítico da HRP (1 $\mu\text{mol/L}$) na presença de AIA (1 mmol/L) em pH 7,4;
- b) Avaliar as espécies reativas geradas pelo sistema AIA (1 mmol/L)/HRP (1 $\mu\text{mol/L}$);
- c) Avaliar a ação sistema AIA (1 mmol/L)/HRP (1 $\mu\text{mol/L}$) sobre a viabilidade do microrganismo *Staphylococcus aureus* após diferentes tempos de incubação, investigando o comportamento e as injúrias causadas no microrganismo através da:
 - Determinação da viabilidade através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC);
 - Análise do potencial e integridade da membrana;
 - Análise da integridade do DNA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes são de grau analítico e foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Os meios de cultura *Baird-Parker Agar*, *Mannitol-Salt Agar* (ágar manitol) e *Brain-Heart-Infusion* (BHI) foram adquiridos da Oxoid (Basingstoke, Hampshire, UK).

4.2 Caracterização do *Staphylococcus aureus*

Para realização dos ensaios foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de casos de mastites clínicas, diagnosticados em vacas criadas em fazendas comerciais e doadas pela professora Andrea Rentz Ribeiro da Pontifícia Universidade Católica – Campus de Poços de Caldas.

Foram realizados alguns testes como apresentado em 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 e 4.2.5 para confirmação da presença do microrganismo *Staphylococcus aureus* e posterior utilização deste nos ensaios contendo o sistema ácido indol-3-acético/peroxidase.

4.2.1 Crescimento do microrganismo em ágar *Baird Parker*

A amostra foi semeada em superfície de placa contendo ágar *Baird Parker* enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio. A placa foi incubada por 48 horas a 37°C. Foi realizado o registro fotográfico da placa em câmara digital (OLYMPUS, D-540 ZOOM).

A partir desta placa foram selecionadas colônias típicas (colônia preta com halo precipitado e transparente) que foram incubadas em caldo BHI em frasco mantido sob agitação lenta e constante a 37°C “overnight”.

4.2.2 Morfologia celular

A morfologia celular foi observada a partir de crescimento recente em caldo BHI. Foram realizados esfregaços em lâminas de microscopia, posteriormente corados pelo método de Gram e observados em microscópio óptico (BEL Engineering, Itália).

4.2.3 Presença da catalase

A pesquisa da enzima catalase foi realizada através de teste em tubo de ensaio contendo 3 mL da solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v), onde foi adicionado 0,3 mL da suspensão bacteriana em BHI. Paralelamente, foi realizado um controle negativo da reação adicionando-se 0,3 mL de BHI num tubo contendo a

solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) (MAC FADDIN, 1980). Foi realizado o registro fotográfico do ensaio em câmara digital (OLYMPUS, D-540 ZOOM).

4.2.4 Presença da coagulase

Para a detecção da enzima coagulase, uma alíquota de 0,2 mL da suspensão bacteriana em BHI foi adicionada de 0,5 mL de plasma de coelho, coletado com EDTA 1% (p/v) e diluído a 1:5 em solução salina 0,85% (p/v). Durante a incubação a 37°C, os tubos foram observados quanto à formação de coágulo a cada 1 hora até a 8ª hora e finalmente após 24 horas. Paralelamente, foi adicionado 0,2 mL de BHI num tubo contendo plasma de coelho com EDTA, diluído 1:5 em salina, como controle negativo da reação (SPERBER; TATINI, 1975). Foi realizado o registro fotográfico do ensaio em câmara digital (OLYMPUS, D-540 ZOOM).

4.2.5 Presença da termonuclease

Para a detecção da termonuclease, uma alíquota da suspensão bacteriana em BHI foi incubada por 15 minutos em banho-Maria fervente e após resfriamento foi adicionada em orifícios, com cerca de 2 mm de diâmetro, em placa contendo ágar com azul de toluidina e DNA, e incubada a 37°C por 18 horas. O BHI foi utilizado como controle negativo (LACHICA; GENIGEORGIS; HOEPRICH, 1971). Foi realizado o registro fotográfico do ensaio em câmara digital (OLYMPUS, D-540 ZOOM).

4.3 Verificação do ciclo catalítico da HRP

O espectro de absorção da HRP (1 $\mu\text{mol/L}$) foi monitorado em espectrofotômetro Beckman Coulter DU-800 (UV/VIS) a 37°C, zerando o equipamento com PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,4). A reação foi iniciada com a adição do AIA (1 mmol/L) e realizou-se a varredura entre 350 e 600 nm após 5 e 120 segundos. Os ensaios foram realizados também na presença de superóxido dismutase 1000 UI/mL ou catalase 1000 UI/mL.

4.4 Determinação de espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP

A formação de espécies reativas foi determinada usando o DCFH-DA (2,7-*dichlorofluorescein diacetate*). O DCFH-DA é oxidado a DCF (*dichlorofluorescein*) por estas espécies presentes no ensaio.

Para preparar a mistura de reação, 350 μL de DCFH-DA 1 mmol/L preparado em etanol, foi adicionado em 1,75 mL de hidróxido de sódio 10 mmol/L e após 20 minutos acrescentou-se 17,9 mL de tampão fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,2 (VALKONEN; KUUSI, 1997; KIM; JEON; PARK, 2004).

Em 1 mL da mistura de reação contendo AIA (1 mmol/L), HRP (1 $\mu\text{mol/L}$) ou AIA(1mmol/L)/HRP(1 $\mu\text{mol/L}$), avaliou-se a absorbância a 490 nm em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU-800, USA) a cada 10 minutos, durante 50 minutos, demonstrando assim a formação das espécies reativas ao longo tempo. Para este ensaio o espectrofotômetro foi zerado com a mistura de reação.

Com a finalidade de se verificar a formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, acrescentou-se ao sistema AIA/HRP, superóxido dismutase (SOD) 1000 UI/mL ou catalase (CAT) 1000 UI/mL, respectivamente, ou ambas simultaneamente.

4.5 Preparo do microrganismo para incubação com o sistema AIA/HRP

O microrganismo foi cultivado em caldo BHI em frasco mantido sob agitação lenta e constante a 37°C “overnight”. Após este período, o mesmo foi lavado três vezes com PBS e centrifugado a 800 x *g* por 10 minutos.

A suspensão foi diluída a fim de se obter a concentração de 3×10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro), utilizando-se a escala de McFarland como parâmetro. A densidade óptica medida no espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 800, USA) a 625 nm, para esta concentração, foi de 0,20.

4.6 Incubação do microrganismo com o sistema AIA/HRP

A partir da amostra contendo *S. aureus* (3×10^8 UFC/mL) foi obtida a concentração de 3×10^4 UFC/mL para a determinação das unidades formadoras de colônias, potencial e integridade de membrana. Para a determinação da integridade de DNA a concentração utilizada de *S. aureus* foi de 3×10^7 UFC/mL. Estas diluições foram utilizadas para incubação do microrganismo na ausência (controle) e presença do sistema AIA (1 mmol/L)/HRP(1 µmol/L) em diferentes tempos (0, 1,5, 3

e 6 horas) a 37°C sob agitação lenta e constante. Utilizou-se PBS como meio de incubação e foram realizados ensaios contendo somente microrganismo/AIA ou microrganismo/HRP.

Com a finalidade de se verificar a influência de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio nas UFC, potencial e integridade de membrana, acrescentou-se ao meio de incubação contendo o microrganismo-AIA/HRP superóxido dismutase 1000 UI/mL ou catalase 1000 UI/mL, respectivamente, ou ambas enzimas simultaneamente.

4.7 Avaliação da viabilidade do microrganismo por unidades formadoras de colônias (UFC)

Após os diferentes tempos de incubação, 100 µL da amostra de todos os ensaios (descritos no item 4.6) contendo *S. aureus* (3×10^4 UFC/mL) foi diluída para 3×10^3 UFC/mL e em seguida 100 µL desta foi plaqueada em ágar manitol. As placas foram mantidas em aerobiose por 48 horas a 37°C. O número de colônias foi determinado utilizando-se um contador de colônias automático e os resultados foram expressos em UFC por mililitro. A viabilidade do microrganismo foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônias e foi feito o registro fotográfico das placas em câmara digital (OLYMPUS, D-540 ZOOM).

A ação do sistema AIA/HRP sobre as UFC do *S. aureus* foi avaliada também após o microrganismo ser incubado (0, 1,5, 3 e 6 horas) em PBS contendo manitol (10 mmol/L), CaCl₂ (1,3 mmol/L) e MgCl₂ (0,6 mmol/L) como descrito em Ben-Amor et al. (2002) modificado, substituindo a glicose pelo manitol.

4.8 Avaliação do potencial de membrana do microrganismo por citometria de fluxo

O potencial de membrana do microrganismo incubado em diferentes tempos como descrito no item 4.6 foi avaliado por citometria de fluxo. O ensaio foi realizado incubando-se por 4 minutos 500 μL da amostra com 5 μL de 3,3'-*diethyloxacarbocyanine iodide* ($\text{DiOC}_2(3)$) 30 $\mu\text{mol/L}$, preparado em dimetilsulfóxido (DMSO). A fluorescência vermelha foi detectada a 610 nm usando o equipamento de citometria de fluxo (BD FACSAria, USA) em comprimento de onda para excitação em 488 nm, sendo a emissão vermelha quantificada através do programa BD FACSDiva (NOVO, et al., 1999). Os resultados foram expressos como sendo o número de células (eventos) fluorescentes em 610 nm representando as células com membranas polarizadas.

O $\text{DiOC}_2(3)$ é um corante catiônico e lipofílico que atravessa facilmente a membrana celular. O microrganismo com a membrana polarizada normalmente apresenta em seu interior carga negativa. Nestas condições o corante $\text{DiOC}_2(3)$, por afinidade eletrostática, forma agregado no interior da célula promovendo a fluorescência vermelha (NOVO et al., 1999; SHAPIRO, 2000).

4.9 Avaliação da integridade da membrana do microrganismo por citometria de fluxo

A integridade da membrana do microrganismo incubado em diferentes tempos como descrito no item 4.6 foi avaliada por citometria de fluxo usando a combinação

de dois fluorocromos, *Propidium Iodide* (PI) e *Thiazole Orange* (TO) de acordo com *BD Cell Viability Kit*.

O ensaio foi realizado incubando-se por 5 minutos 500 µL da amostra com 5 µL de PI (4,3 mmol/L) preparado em água ultra pura e 5 µL de TO (43 µmol/L) preparado em DMSO. A fluorescência verde do TO foi detectada a 530 nm e a fluorescência vermelha do PI a 610 nm usando o equipamento de citometria de fluxo (BD FACSAria, USA) em comprimentos de ondas para excitações em 485 nm e 585 nm respectivamente, sendo estas fluorescências quantificadas através do programa BD FACSDiva.

A membrana celular integra não é permeável ao corante PI o qual apresenta afinidade pelo DNA. Quando a membrana da célula se torna permeável, o PI consegue se ligar ao DNA promovendo fluorescência vermelha. Entretanto, independente da membrana estar intacta ou permeável, o corante TO consegue atingir o interior da célula ligando-se aos ácidos nucleicos promovendo fluorescência verde (MOHR et al., 2006). Neste caso, a integridade da membrana é representada pela fluorescência verde e a perda de integridade pela fluorescência vermelha (ALSHARIF; GODFREY, 2002).

Os resultados foram expressos como número de células (eventos) fluorescentes em 530 nm, representado as células com membrana íntegra.

4.10 Análise da integridade do DNA

Após os diferentes tempos de incubação as amostras de *S. aureus* (3×10^7 UFC/mL) incubadas como descrito no item 4.6 foram centrifugadas por 30 minutos a

17.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi congelado a -20°C para posterior extração e análise da integridade do DNA.

4.10.1 Extração de DNA

Para extração do DNA do microrganismo foi utilizado o *kit illustraTM bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações.

Para a lise do microrganismo, o *pellet* obtido anteriormente e congelado, foi incubado em banho-Maria com 40 µL de EDTA 50 mmol/L pH 8,0 e 5 µL de lisostafina (1 UI/µL) por 30 minutos a 37°C. Após este período foi adicionado 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e a amostra foi incubada por mais 15 minutos a 55°C. Para remoção do RNA foi adicionado 2 µL de RNase A (20 mg/mL) seguida de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Neste *Kit* são utilizadas pequenas colunas para purificação do DNA onde a amostra foi incubada por 10 minutos com 500 µL de solução de lise e em seguida centrifugada a 11.000 x g por 1 minuto. O material que passou pela coluna foi descartado e o que ficou preso na mesma, foi lavado por duas vezes, sendo a primeira com 500 µL de solução de lise e a segunda com 500 µL de tampão de lavagem. O DNA retido na coluna foi eluído com 200 µL de tampão de eluição, após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente. A coluna foi centrifugada a 11.000 x g por 1 minuto e o material coletado (*pellet*) foi utilizado para quantificação do DNA.

A concentração de DNA foi calculada utilizando-se *BioPhotometer®* (Eppendorf, USA) através da razão das absorbâncias avaliadas em 260 nm e em

280 nm. A amostra contendo o DNA foi diluída para obter a concentração de 100 ng/ μ L, como recomendado pelo método.

4.10.2 Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida

O DNA extraído e quantificado foi submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamina 10% a 100 V por 90 minutos e corado com nitrato de prata 0,2% (p/v) (BASSAM; CAETANO-ANOLLÉS; GRESSHOFF, 1991).

4.11 Análise dos resultados

A comparação entre grupos foi realizada utilizando-se análises de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% de probabilidade. Para as diferenças significativas foram aplicadas comparações entre médias usando o teste Tukey, através do programa Minitab.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do *Staphylococcus aureus*

5.1.1 Crescimento do microrganismo em ágar *Baird Parker*

A amostra de *S. aureus* que foi semeada em superfície de placas contendo ágar *Baird Parker* enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio, incubadas por 48 horas a 37°C, apresentaram colônias típicas de *S. aureus* caracterizadas pela presença de colônia preta circundada por um halo de precipitação seguido por outro halo externo transparente (Figura 7). Este teste é muito utilizado para o isolamento e identificação de *S. aureus*, seguido da confirmação bioquímica da espécie (DOWNES; ITO, 2001; SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

Figura 7. Crescimento de colônias típicas de *S. aureus* em ágar *Baird Parker*. Presença de colônias pretas circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo).

O ágar *Baird Parker* é o meio recomendado pela *American Public Health Association* e *Food and Drug Administration* para o isolamento de *S. aureus* em alimentos. Este meio utiliza a habilidade do *S. aureus* em se desenvolver na presença de telurito de potássio, glicina, cloreto de lítio e polimixina, que são agentes seletivos. Suas características diferenciais baseiam-se na redução do telurito de potássio à telureto de potássio, produzindo colônias negras e na capacidade do microrganismo de hidrolisar proteínas e lipídeos da gema do ovo, formando halos ao redor das colônias (LANCETTE; BENNET, 2001).

5.1.2 Morfologia celular

Os esfregaços contendo o *S. aureus* realizados em lâminas foram corados pelo método de Gram para a verificação microscópica das características morfológicas e tintoriais do microrganismo (Figura 8).

Figura 8. Esfregaços utilizando cepas de *S. aureus* realizados em lâminas de microscopia e corados pelo método de Gram. Aparecimento de cocos corados em roxo em forma de “cachos de uva”. (1000x).

Foi possível observar na figura 8 a presença de cocos Gram-positivos que aparecem na forma de “cachos de uva”, e dependendo da idade da colônia, foram encontrados cocos isolados, aos pares, agrupados em tétrades ou, ainda, em pequenas cadeias.

A forma das bactérias pode ser observada através de coloração de Gram que divide as bactérias em dois grupos: Gram-positivas que coram de roxo (corante cristal violeta) e Gram-negativas que coram de vermelho (corante safranina). A reação das bactérias à técnica de Gram expressa diferentes características, de modo especial no que diz respeito à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade (BURNETT; SCHUSTER, 1982; NISENGARD; NEWMAN, 1994).

5.1.3 Presença da Catalase

Na determinação da presença da catalase foi possível visualizar a formação de bolhas resultantes da degradação do peróxido de hidrogênio (Figura 9). O teste baseia-se na capacidade da catalase, presente no microrganismo *S. aureus*, em decompor o peróxido de hidrogênio liberando oxigênio que é evidenciado por meio da formação de bolhas.

O *S. aureus* secreta várias enzimas e toxinas, consideradas fatores de virulência (LEBEAU et al., 1994), esses microrganismos são produtores de elevada quantidade da enzima catalase (MANDELL, 1975).

Figura 9. Presença da enzima catalase no *S. aureus*: tubo (1) presença do microrganismo, formação de bolhas indicando atividade da catalase e tubo (2) ausência do microrganismo, não formação de bolhas, indicando teste negativo.

5.1.4 Presença da Coagulase

Na amostra analisada foi possível visualizar a formação de coágulo indicando a atividade da enzima coagulase presente no *S. aureus* (Figura 10). A enzima coagulase é responsável pela conversão do fibrinogênio do plasma sanguíneo de coelho em fibrina evidenciada pela formação do coágulo esbranquiçado.

Figura 10. Presença da enzima coagulase no *S. aureus*: tubo (1) presença do microrganismo, formação de coágulo indicando a atividade da coagulase e tubo (2) ausência do microrganismo, sem o coágulo indicando teste negativo.

Segundo Sperber e Tatini (1975), ao verificar a presença de coágulo no teste da coagulase devem-se considerar os seguintes critérios:

- a) **Reação negativa:** não formação de coágulo;
- b) **Reação 1+:** coágulo pequeno e desorganizado;
- c) **Reação 2+:** coágulo pequeno e organizado;
- d) **Reação 3+:** coágulo grande e organizado;
- e) **Reação 4+:** coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprenderá quando o tubo for invertido. Quando a reação de coagulação for do tipo 3+ e 4+, deve-se considerar a prova positiva para *S. aureus*.

Na amostra analisada pelo teste da coagulase verificou-se a presença de um coágulo grande e organizado, considerando a reação da amostra do tipo 3+ e positiva para *S. aureus*.

5.1.5 Presença da termonuclease

No teste para detectar a presença da termonuclease no *S. aureus*, foi possível observar a formação de um halo róseo com mais de 1 mm de diâmetro ao redor do orifício onde foi depositada a amostra indicando reação positiva (Figura 11).

Figura 11 Presença da termonuclease no *S. aureus*: orifício (1) presença do microrganismo, formação do halo róseo indicando atividade da termonuclease e orifício (2) ausência do microrganismo, não formação do halo indicando teste negativo.

Segundo Oliveira et. al. (1999) o teste da termonuclease baseia-se na conversão do ácido desoxirribonucleico (DNA) presente no ágar em fosfomononucleosídeos pela ação da enzima DNase presente no microrganismo. Esta reação é caracterizada pelo aparecimento de um halo de coloração rósea no ágar contendo azul de toluidina devido à mudança de pH.

Os testes da catalase e da coagulase são os mais utilizados para a identificação de *S. aureus*, porém, o teste da termonuclease é muito usado como

auxiliar na diferenciação entre *S. aureus* e outras espécies de estafilococos (BASCOMB; MANAFI, 1998).

5.2 Ciclo catalítico da HRP na presença de AIA e espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP

5.2.1 Verificação do ciclo catalítico da HRP

Para investigar o ciclo catalítico da HRP durante a reação, acompanhou-se a mudança espectral da HRP na região UV/VIS durante o curso da reação com o AIA.

A enzima nativa foi convertida à sua forma redox composto II (HRP-II) após 120 segundos de reação, apresentando Banda Soret a 417 nm e duas bandas no visível, em aproximadamente 525 e 556 nm (Figura 12), tal mudança espectral somente foi observada após a adição do AIA. A adição da catalase e da superóxido dismutase não interferiu na formação do composto II, porém a presença da SOD acelerou a volta da enzima à sua forma nativa. Não foi observada a formação de HRP-III. Resultados semelhantes foram observados por Krylov e Dunford (1996) em que a HRP na presença de AIA em pH 7,4 foi rapidamente oxidada a HRP-II com a presença da Banda Soret a 419 nm e dois picos na região visível em aproximadamente 527 e 555 nm, não sendo observada a formação de HRP-III.

Na maioria das reações, a HRP depende de peróxidos orgânicos ou inorgânicos para oxidar seus substratos, porém o AIA pode ser eficientemente oxidado pela HRP sem adição de peróxido ao meio reacional (KRYLOV, 1998).

A reação de oxidação do AIA catalisada pela HRP pode ser conduzida por 2 vias, a peroxidásica e a oxidásica, que levam à formação de diferentes radicais

que iniciam essa reação (TAFAZOLI; O'BRIEN, 2004). Em pH neutro, prevalece a via peroxidásica com a formação da HRP-I e HRP-II. Já em meio ácido, prevalece a via oxidásica, que envolve a formação da HRP na forma ferrosa e produção de HRP-III e do radical superóxido. A HRP na presença de AIA em meio neutro não é convertida a HRP-III e acredita-se que nesse caso o AIA seja convertido ao seu radical cátion indolil (GAZARIAN et al., 1998; KRYLOV, 1998).

Figura 12. Variação espectral da HRP (1 µM) durante a reação com o AIA (1 mM) em PBS a 37°C. Varredura realizada entre 350 e 600 nm da HRP nativa e após 5 segundos e 120 segundos de incubação com o AIA.

5.2.2 Determinação de espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP

Vários autores têm demonstrado que o sistema AIA/HRP induz a formação de vários tipos de radicais livres, incluindo os radicais indolil e escatolil, ocorrendo também a formação de peróxil e outras espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (KAWANO et al., 2001; FOLKES et al., 1999).

De acordo com Kim, Jeon e Park (2004) é possível detectar as espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP através do DCFH-DA (2,7-*dichlorofluorescein diacetate*) que é oxidado pelas espécies reativas para o DCF (*dichlorofluorescein*), acompanhada a 490 nm no espectrofotômetro.

A oxidação do DCFH-DA é amplamente utilizada para medir a produção H_2O_2 , entretanto, há algumas evidências de que o óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$), que são produzidos pela interação entre NO e O_2^- (XIA; ZWEIER, 1997), podem também ser capazes de oxidar o DCFH (RAO et al., 1992; POSSEL et al., 1997).

As espécies reativas geradas foram acompanhadas ao longo de 50 minutos (Figura 13A). Os resultados mostraram que 50% destas espécies é peróxido de hidrogênio avaliado pela inibição em 50% da detecção de espécies reativas pela presença de catalase. Por outro lado, a superóxido dismutase inibiu apenas 6% a detecção de espécies reativas pelo sistema AIA/RHP (Figura 13B). No presente estudo não foi possível determinar e identificar os 44% restante das espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP.

Através de ensaios acompanhando a oxidação do DCFH-DA à DCF em 490 nm, foi possível observar que o sistema AIA/HRP produz espécies reativas com

eficiência e que a reação é iniciada sem a adição de peróxido de hidrogênio (Figura 13A).

Folkes e Wardman (2001), acompanhando a reação de oxidação do AIA por peroxidase de raiz forte através de cromatografia líquida de alta performance, identificaram como produtos gerados o indol-3-carbinol, oxindol-3-carbinol e 3-metileno-2-oxindol (MOI). Segundo esses autores o indol-3-carbinol em baixas concentrações, na ausência ou presença de HRP, não apresentou toxicidade para células V79.

O 3-metileno-2-oxindol foi o primeiro produto da oxidação do AIA por HRP identificado em 1961 (STILL; FUKUYAMA; MOYED, 1965), sendo originado do oxindol-3-carbinol. Estudos realizados mostraram que o MOI é tóxico para *Escherichia coli* e algumas plantas. A fotoxidação do AIA na presença de riboflavina provoca a morte celular em *E. coli*, e pode ser devido à produção de MOI (FUKUYAMA; MOYED, 1964; STILL; FUKUYAMA; MOYED, 1965).

Os resultados apresentados na Figura 13A mostraram que o AIA em meio reacional conduz a geração de espécies reativas independentemente da presença de HRP, em acordo com os trabalhos realizados por outros autores que mostraram que o AIA pode gerar espontaneamente hidroperóxidos (METODIEWA; DUNFORD, 1989).

Figura 13. Espécies reativas geradas pelo sistema AIA/HRP: (A) Detecção indireta de espécies reativas por medida da absorbância do DCF a 490 nm e (B) porcentagem relativa das espécies reativas calculada através dos valores de áreas abaixo da curva durante o tempo de 50 minutos extraídas da Figura 13A, excluindo-se a quantidade de espécies reativas provenientes somente do AIA. O DCF foi gerado através da reação entre o DCFH-DA e as espécies reativas geradas. Os dados estão representados como a média e desvio padrão (n=6).

5.3 Ação do sistema AIA/HRP sobre *Staphylococcus aureus*

5.3.1 Ação do sistema AIA/HRP sobre a formação de colônias de *S. aureus*

Para avaliar a ação do sistema AIA/HRP sobre as unidades formadoras de colônias de *S. aureus*, o microrganismo incubado por 0, 1,5, 3 e 6 horas em PBS, na ausência (controle) e presença de HRP, AIA, CAT, AIA/HRP ou AIA/HRP/CAT, foi cultivado em ágar manitol por 48 horas a 37°C (Figura 14).

O ágar manitol é um meio seletivo para estafilococos devido à elevada concentração de cloreto de sódio (7,5 %) que somente essas bactérias suportam. A presença de manitol se torna um diferencial para *S. aureus*, uma vez que as espécies potencialmente patogênicas do gênero *Staphylococcus* são fermentadoras desta substância. O acúmulo dos produtos da fermentação acidifica o meio e o indicador de pH vermelho de fenol muda de vermelho (cor original do meio) para amarelo, originando colônias amarelas rodeadas de um halo também amarelo.

A capacidade da maioria das cepas de *S. aureus* de fermentar o manitol é uma característica utilizada por muitos microbiologistas para sua identificação (STEERE; MALLISON, 1989; WASHINGTON et al., 1985; WENZEL et al., 1991).

A inibição da formação de colônias de *S. aureus* foi observada após 1,5 h de incubação na presença do sistema AIA/HRP, comparado ao crescimento do microrganismo na ausência do sistema (Figura 14). Os resultados mostraram também que o AIA ou a HRP individualmente não alteraram a formação de colônias deste microrganismo. Além disso, realizou-se o experimento com o sistema AIA/HRP na presença de catalase, mostrando que o peróxido de hidrogênio não está envolvido nos mecanismos de lise do microrganismo.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos para a contagem em placas de *S. aureus* após incubação em PBS na ausência (controle) e presença de AIA/HRP, AIA/HRP+CAT, HRP, AIA, e CAT em tempos determinados e crescimento em ágar manitol durante 48 horas. Estes resultados foram expressos em UFC/mL.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, foi possível verificar que o sistema AIA/HRP inibiu em 96%, 98%, 99% o crescimento do microrganismo para os tempos de 1,5, 3 e 6 horas, respectivamente, em relação ao controle em cada tempo. Esse resultado demonstra o efeito tóxico do sistema AIA/HRP sobre *S. aureus*.

Entretanto, a ação do sistema AIA/HRP sobre a formação de colônias de *S. aureus* na presença de catalase não foi alterada, quando comparada aos efeitos deste sistema sobre as UFC do microrganismo na ausência desta enzima antioxidante. Portanto, pode-se deduzir que o peróxido de hidrogênio, composto metabolizado pela enzima catalase, não é a espécie reativa envolvida na morte do *S. aureus*.

Os resultados apresentados na Tabela 1, também, mostraram que a HRP ou AIA adicionados individualmente no meio de incubação do *S. aureus* não alterou a capacidade de formação de colônias deste microrganismo em nenhum dos tempos estudados em comparação ao controle nos respectivos tempos.

Não existem até o momento trabalhos científicos que relatam o efeito do sistema AIA/HRP sobre microrganismos. Contudo, vários autores utilizaram este sistema para verificar o seu efeito em células eucarióticas.

Em células humanas de melanoma G361, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é o principal mediador da ação do sistema AIA/HRP na indução de apoptose, sendo que

a adição da catalase no meio reduz a citotoxicidade do sistema AIA/HRP (KIM et al., 2006).

Folkes e Wardman (2001), Greco et al. (2000) e Wardman (2002) observaram que o AIA na presença de HRP é citotóxico para células de mamíferos, incluindo células tumorais humanas. O primeiro mecanismo de toxicidade envolvido pode ser o 3-metileno-2-oxindol, conhecido como um produto da reação entre HRP e o AIA que mostra alta reatividade para células.

Figura 14. Crescimento de *S. aureus* incubados por 0h, 1,5h, 3h e 6h em PBS na ausência (controle) e presença de CAT, HRP, AIA, AIA/HRP ou AIA/HRP + CAT, avaliado após 48 h de cultura em ágar manitol.

Tabela 1 – Unidades formadoras de colônias (UFC/mL x 10³) de *S. aureus* cultivados em ágar manitol por 48 horas após incubação do microrganismo em PBS (0, 1,5, 3 e 6 horas) na ausência (controle) e presença de AIA/HRP, AIA/HRP/CAT, HRP, AIA ou CAT.

	TEMPO (h)			
	0	1,5	3,0	6,0
Controle	1,72 ± 0,37	1,70 ± 0,45	1,23 ± 0,22 [#]	1,17 ± 0,30 [#]
AIA/HRP	1,69 ± 0,34	0,06 ± 0,05*	0,02 ± 0,02*	0,01 ± 0,01*
AIA/HRP/CAT	1,68 ± 0,37	0,08 ± 0,09*	0,02 ± 0,02*	0,02 ± 0,03*
HRP	1,71 ± 0,46	1,71 ± 0,51	1,30 ± 0,33	1,27 ± 0,34
AIA	1,70 ± 0,52	1,65 ± 0,47	1,12 ± 0,34	1,02 ± 0,19
CAT	1,68 ± 0,34	1,66 ± 0,36	1,29 ± 0,31	1,26 ± 0,37

*p < 0,05 em relação ao sistema controle nos respectivos tempos. [#] p ≤ 0,05 comparação em relação ao próprio controle no tempo zero. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 9).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1 verificou-se no ensaio controle (microrganismo incubado apenas em PBS) um decréscimo de 28% e 32% nas unidades formadoras de colônias do *S. aureus* para os tempos de 3 e 6 horas, respectivamente, em relação ao tempo zero. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada após 1,5 h de incubação do microrganismo em PBS em relação ao tempo zero.

Verificou-se na Tabela 2, que o *S. aureus* incubado em PBS enriquecido com manitol, CaCl₂ e MgCl₂ apresentou um decréscimo de 23% nas unidades formadoras

de colônias apenas após 6 horas de incubação, em relação ao tempo zero, sugerindo que as condições encontradas no PBS enriquecido (Tabela 2) aumenta a viabilidade deste microrganismo após 3 horas de incubação quando comparada ao PBS não enriquecido (Tabela 1). Entretanto, a ação inibitória do sistema AIA/HRP sobre as unidades formadoras de colônias de *S. aureus* incubados em PBS enriquecido (Tabela 2) foi de 95%, 97% e 99% em relação ao controle, nas mesmas condições, para os tempos de 1,5, 3 e 6 horas respectivamente; semelhantes aos resultados encontrados em PBS não enriquecido, demonstrando que o sistema AIA/HRP foi eficiente nos dois casos.

Tabela 2 – Unidades formadoras de colônias (UFC/mL x 10³) de *S. aureus* cultivados em ágar manitol por 48 horas após incubação do microrganismo em PBS enriquecido com manitol, CaCl₂ e MgCl₂ (0, 1,5, 3 e 6 horas) na ausência (controle) e presença de AIA/HRP, HRP ou AIA.

	TEMPO (h)			
	0	1,5	3,0	6,0
Controle	1,71 ± 0,18	1,63 ± 0,21	1,50 ± 0,25	1,31 ± 0,28 [#]
AIA/HRP	1,70 ± 0,19	0,08 ± 0,05*	0,05 ± 0,04*	0,01 ± 0,01*
HRP	1,70 ± 0,21	1,61 ± 0,25	1,50 ± 0,40	1,25 ± 0,27
AIA	1,70 ± 0,37	1,72 ± 0,34	1,42 ± 0,16	1,03 ± 0,36

*p < 0,05 em relação ao sistema controle nos respectivos tempos. [#] p ≤ 0,05 comparação em relação ao próprio controle no tempo zero. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n = 9).

No presente estudo, com base nos resultados apresentados, foi possível verificar que a oxidação do AIA pela HRP produz uma resposta citotóxica potente capaz de promover a inibição do crescimento de *S. aureus* em ágar manitol.

Segundo Nebe-Von Caron et al. (2000), as informações sobre os estados fisiológicos das células, que se pode retirar do ensaio de contagem de colônias em placas, são limitadas a dois níveis extremos de atividade metabólica: o viável, presente em células com capacidade de se dividirem, e o correspondente à morte celular.

5.3.2 Ação do sistema AIA/HRP sobre a polarização e integridade de membrana de *S. aureus*

No presente trabalho as análises do potencial e integridade de membrana do *S. aureus* foram realizadas para tentar elucidar a ação do sistema AIA/HRP sobre a parede celular e membrana citoplasmática do microrganismo.

As Figuras 15 e 16 apresentam os resultados onde o sistema AIA/HRP reduziu a viabilidade do microrganismo avaliada através da polarização e integridade da membrana do *S. aureus* exposto ao AIA/HRP.

O sistema AIA/HRP promoveu uma redução na polarização da membrana do microrganismo em 38, 69 e 99% nos tempos 1,5, 3 e 6 horas, respectivamente em relação ao controle nos respectivos tempos (Figura 15). Para o microrganismo incubado apenas em PBS (controle), observou-se um decréscimo de 35% na polarização da membrana somente após 6 horas de incubação em relação ao tempo zero.

Foi possível verificar uma diminuição significativa do número de microrganismos com membrana íntegra, de 17 e 22%, quando foram incubados por 3 e 6 horas, respectivamente, na presença de AIA/HRP, comparados ao controle nos respectivos tempos (Figura 16). Para o controle, ou seja, o microrganismo incubado apenas em PBS, nenhuma diferença significativa foi encontrada nos diferentes tempos de incubação comparada ao tempo zero.

A adição de catalase ou de superóxido dismutase ao meio de incubação não alterou o efeito deletério promovido pelo sistema AIA/HRP, avaliado através da polarização e integridade da membrana do *S. aureus* incubados na presença destas enzimas antioxidantes, comparados com o sistema AIA/HRP na ausência destas enzimas. Isto sugere que o efeito deletério do sistema de AIA/HRP sobre a viabilidade do *S. aureus* não ocorreu devido à presença de H_2O_2 ou $O_2^{\cdot-}$.

A utilização de critérios do funcionamento celular tais como o potencial e integridade de membrana, permite caracterizar os diferentes estados metabólicos de microrganismos (NEBE-VON CARON et al., 2000).

Em acordo com os resultados apresentados nesta dissertação, referentes ao potencial e integridade de membrana, estão os estudos mostrando que o potencial de membrana de *S. aureus* apresenta-se significativamente reduzido na presença do antimicrobiano daptomicina (ALBORN JR; ALLEN; PRESTON, 1991), sendo este efeito relacionado com a redução da integridade de membrana deste microrganismo (SILVERMAN; PERLMUTTER; SHAPIRO, 2003).

Figura 15. Efeito do sistema AIA/HRP sobre o potencial de membrana do *S. aureus* após incubação (0, 1,5, 3 e 6 horas) em PBS na ausência (controle) presença de HRP, AIA ou AIA/HRP. Os resultados indicam o número de microrganismos com membrana polarizada e foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n=8).

O potencial de membrana é um parâmetro muito empregado em microbiologia para se avaliar a viabilidade e atividade metabólica de microrganismos. O potencial de membrana é gerado pela diferença de concentrações de íons no interior e no exterior da membrana citoplasmática e, como componente do gradiente eletroquímico, está intimamente relacionado com a formação de ATP e, portanto, com a manutenção energética da célula (SHAPIRO, 2000).

De acordo com Silverman, Perlmuter e Shapiro (2003) a daptomicina, um antimicrobiano lipopeptideo cíclico usado para o tratamento de infecções causadas

por microrganismos Gram-positivos, incluindo *S. aureus*, se liga à membrana bacteriana e provoca rápida despolarização da mesma. A perda do potencial da membrana causa inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, o que resulta na morte das células bacterianas (HERNÁNDEZ MARTÍ, et al., 2007)

Figura 16. Efeito do sistema AIA/HRP sobre a integridade de membrana do *S. aureus* após incubação (0, 1,5, 3 e 6 horas) em PBS na ausência (controle) e presença de HRP, AIA ou AIA/HRP. Os resultados indicam o número de microrganismos com membrana íntegra e foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n=8).

Segundo Cushnie e Lamb (2005), o Galangin, um dos princípios ativos antimicrobianos presente na própolis, promove ação sobre a integridade da membrana citoplasmática de *S. aureus*. Segundo estes autores este flavonóide

provoca um aumento significativo na perda de potássio neste microrganismo, o que pode ser atribuído aos prejuízos diretos na membrana citoplasmática ou aos danos indiretos através de autólise, enfraquecimento da parede celular e conseqüente lise osmótica.

Higgins et al. (2005) demonstraram que a telavancina, um antimicrobiano lipoglicopeptídeo, causa alterações no potencial e integridade da membrana de bactérias Gram-positivas. Em *S. aureus* meticilina-resistente, a telavancina causa rápida despolarização da membrana plasmática, aumenta a permeabilidade e promove extravasamentos celulares de K^+ e ATP.

Antimicrobianos como teicoplanina, um glicopeptídeo, promovem a lise de bactérias Gram-positivas por que afetam a integridade da membrana celular (CHMARA, et al., 1991).

De acordo com os resultados de polarização e integridade de membrana apresentados nesta dissertação conclui-se que o sistema AIA/HRP exerceu um efeito drástico sobre a parede celular e membrana citoplasmática de *S.aureus* detectado pela despolarização e perda da integridade de membrana.

5.3.3 Ação do sistema AIA/HRP sobre a integridade do DNA do *S. aureus*

O sistema AIA/HRP não promoveu a fragmentação do DNA do *S. aureus*, avaliada por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10% e coradas com nitrato de prata, após 3 e 6 horas de incubação, respectivamente (Figuras 17 e 18).

Embora não haja relatos na literatura mostrando que o sistema AIA/HRP causa lesões no DNA de microrganismos, sabe-se que em células humanas de

melanoma G361 a combinação AIA/HRP induz a fragmentação de DNA (KIM et al., 2004). Entretanto, os resultados apresentados nesta dissertação mostraram que o sistema AIA/HRP foi citotóxico para *S. aureus*, porém, não alterou a integridade de seu DNA.

Poucos estudos apresentam resultados envolvendo os mecanismos de ação de antimicrobianos e o DNA. Segundo Edwards (1993) o nitroimidazol, um agente microbida de amplo espectro com atividade contra bactérias anaeróbicas e protozoários, induz lesão oxidativa sobre o DNA promovendo a perda da sua estrutura helicoidal com subsequente morte do microrganismo.

Por outro lado, estudos mostram que antimicrobianos como as quinolonas agem nos processos de replicação e transcrição do DNA celular (THAKENOUCI et al. 1995, ZHANEL et al. 1995) e que a rifampicina, derivado semi-sintético da rifamicina, é extremamente efetiva contra *Mycobacterium tuberculosis*, e possui uma atividade bactericida rápida inibindo a etapa de transcrição (BLANCHARD, 1996); sem avaliarem, entretanto, a ação destes antimicrobianos sobre a integridade do DNA.

Estudos utilizando células eucarióticas mostram que a ação de um agente biológico sobre a viabilidade celular caracterizada pela redução da polarização e integridade da membrana plasmática está diretamente relacionada com o processo necrótico, e que a fragmentação de DNA está relacionado à apoptose (ARENDS; MORRIS; WYLLIE, 1990; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002; MCCONKEY, 1998; DE MELO et al., 2004). Neste contexto, por comparação, é possível sugerir que o mecanismo de ação do sistema AIA/HRP sobre a morte de *S. aureus* ocorre aleatoriamente, envolvendo as espécies reativas geradas pelo AIA/HRP que lesam a membrana celular deste microrganismo.

Figura 17. Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *S.aureus* após 3 horas de incubação em PBS: **(1)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(2)** *S. aureus* antes da incubação (tempo zero); **(3)** *S. aureus* após incubação; **(4)** *S. aureus* após incubação na presença de HRP; **(5)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA; **(6)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA/HRP. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características.

Figura 18. Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *Staphylococcus aureus* após 6 horas de incubação em PBS: **(1)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(2)** *S. aureus* antes da incubação (tempo zero); **(3)** *S. aureus* após incubação; **(4)** *S. aureus* após incubação na presença de HRP; **(5)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA; **(6)** *S. aureus* após incubação na presença de AIA/HRP. Os resultados são ilustrativos de três repetições ($n=3$) em que todas apresentaram as mesmas características.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho foi possível concluir que o sistema AIA/HRP foi eficiente na morte de *Staphylococcus aureus* inibindo a formação de colônias em ágar manitol, reduzindo a polarização e integridade da membrana, sem alterar a integridade do DNA. Conclui-se que o sistema AIA/HRP possa ser utilizado em estudos futuros visando uma possível terapia alternativa contra bactérias.

REFERÊNCIAS

- ALBORN JR, W. E.; ALLEN, N.E.; PRESTON, D.A. Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.35, p.2282–2287, 1991.
- ALONSO LOMILLO, M.A.;KAUFFMANN, J.M.; ARCOS MARTINEZ, M.J. HRP-based biosensor for monitoring rifampicin. **Biosensors and Bioelectronics**, v.18, p.1165-1171, 2003.
- ALSHARIF, R.; GODFREY, W. Bacterial detection and live/dead discrimination by flow cytometry. **Microbial Cytometry Application Note**. BD Biosciences, Immucytometry, San Jose, 2002.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, p.37-58, 2007.
- ARENDS, M.J.; MORRIS, R.G.; WYLLIE, A.H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **The American Journal of Pathology**, v.136, p.593-608, 1990.
- ASPENGER, H. *Staphylococcus aureus* In: IDF Group of Experts A10/11 The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. 2.ed. **International Dairy Federation**, 1995, p.24-43.
- BARTEL, B. Auxin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.51–66, 1997.
- BASCOMB, S.; MANAFI, M. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.318-340, 1998.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v.198, p.217, 1991.

BEN AMOR, K.; BREEUWER, P.; VERBAARSCHOT, P.; ROMBOUTS, F.M.; AKKERMANS, A.D.; DE VOS, W.M.; ABEE, T. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5209-5216, 2002.

BERGLUNG, G.I.; CARLSSON, G.H.; SMITH, A.T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v.417, p.463-468, 2002.

BERTILSSON, L.; OALMER, L. Indole-3-acetic acid in human cerebrospinal fluid: identification and quantification by mass spectrography. **Science**, v.117, p.74-76, 1972.

BIANCO, C.; IMPERLINI, E.; CALOGERO, R.; SENATORE, B.; PUCCI, P.; DEFEZ, R. Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.152, p.2421-2431, 2006.

BLANCHARD, J.S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 215-239, 1996.

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; LAGAN, A.; MELE, M.; NAZZARI, M. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v.1067, p.93-100, 2005.

BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C. Onxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v.23, p.113-119, 2004.

BRAMLEY, A. J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control progress and prospects. **Journal Dairy Research**, v.51, p.481-512, 1984.

BRANDURSKI, R.S.; COHEN, J.D.; SLOVIN, J.P.; REINECKE, D.M. Auxin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones**. Boston: Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995, p.39-65.

BURNETT, G.W.; SCHUSTER, G.S. **Microbiologia Oral e Enfermidades infecciosas**. Buenos Aires: Panamericana, 1982, p.31-70.

CAMPOS, E.B.P; YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, p.357-366, 2004.

CANDEIAS L.P.; FOLKES L.K.; WARDMAN P. Amplification of oxidative stress by decarboxylation: a new strategy in anti-tumour drug design. **Biochemical Society transactions**, v.23, p.262, 1995b.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; DENNIS, M.F.; PATEL, K.B.; EVERETT, S.A.; STRATFORD, M.R.L.; WARDMAN, P. Free radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic acid. **Journal of Physical Chemistry**, v.98, p.10131-10137, 1994.

CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P.; MASON, R. P. The reaction of oxygen with radical from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid. **Biophysical Chemistry**, v.67, p.229-237, 1997.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; PORSSA, M.; PARRICK, J.; WARDMAN, P. Enhancement of lipid peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives: substituent effects. **Free Radical Research**, v.23, p.403-418, 1995a.

CATALÁ, C.; CROZIER, A.; CHAMARRO, J. Decarboxylative metabolism of [1'-C-14]-indole-3-acetic acid by tomato pericarp disks during ripening – Effects of wounding and ethylene. **Planta**, v.193, p.508-513, 1994.

CATALÁ, C.; OSTIN, A.; CHAMARRO, J.; SANDBERG, G.; GROZIER, A. Metabolism of indole-3-acetic acid by pericarp disks from immature and mature tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Physiology**, v.100, p.1457-1463, 1992.

CENCI-GOGA, B.T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P.V.; MORGANTE, R.A.; CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows. **Journal of food protection**, v.66, p.1693-1696, 2003.

CHMARA, H.; RIPA, S.; MIGNINI, F.; BOROWSKI, E. Bacteriolytic effect of teicoplanin. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.913-919, 1991.

CHOPRA, I.; HAWKEY, P. M.; HINTON, M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.29, p.245-277, 1992.

CLEMENTS, M.O.; FOSTER, S.J. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.7, p.458-462, 1999.

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

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada**, São Paulo, v.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.443-455.

COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, p.15-17, 1996.

CRUICKSHANK, J.G. Food handlers and food poisoning. Training programmes are the best. **British Medical Journal**, v.300, p.207-208, 1990.

CURTIN, J.F.; DONOVAN, M.; COTTER, T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunology Methods**, v.265, p.49-72, 2002.

CUSHNIE, T.P.T; LAMB, A.J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**. v.101, p.243–248, 2005.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1995.

DE MELO, M. P.; CURI, T. C. P.; CURI, R.; DI MASCIO, P.; CILENTO, G. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. **Photochemistry and Photobiology**, v.65, p.338-341, 1997.

DE MELO, M.P.; DE LIMA, T.M.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology letters**, v.148, p.103–111, 2004.

DEGRAVES, F.J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.9, p.421-434, 1993.

DIJKSTRA, A.J.; KECK, W. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.5555–5562, 1996.

DOWNES, F.P.; ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p.676.

DUNFORD, H.B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley-VCH, 1999.

DUNFORD, H.B. Horseradish peroxidase: Structure and Kinect Propierts. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.; GRISHAM, M.B. **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boston: CRC, 1991, v.2, p.1-24.

DURÁN, N.; BROMBERG, N.; KUNZ, A. Kinetic studies on veratryl alcohol transformation by Horseradish peroxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.84, p.279-286, 2001.

EDWARDS, D.I. Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.31, p.9-20, 1993.

EUZÉBY, J. P. **List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet**. Disponível em: <http://www.bacterio.net>. Acesso em 23 de janeiro de 2007.

FANTIBELLO-FILHO, O.; CRUZ VIEIRA, I. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais com fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, p.455-464, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FERREIRA, M.S.; GONÇALVES, E.G.; ASSIS, V.P. Infecções estafilocócicas **Revista Brasileira de Medicina**, v.42, p.179-189, 1985.

FOLKES, L.K.; DENNIS, M.F.; STRATFORD, M.R.; CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P. Peroxidase catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membranes, DNA, and mammalian cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.375-382, 1999.

FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species - a potential new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.61, p.129-136, 2001.

FOLKES, L.K.; GRECO, O.; DACHS, G.U.; STRATFORD, M.R.L.; WARDMAN, P. 5-Fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in target cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p.265–272, 2002.

FONSECA, M.F.A.C. Cenário da produção e da comercialização dos alimentos orgânicos. In: FERNANDES, E.N.; BRESSAN, M.; VILELA, D. **Produção orgânica de leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001, p.93-101.

FRANCO, B.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p.184.

FRANCO, B.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p.181.

FUKUYAMA, T.T.; MOYED, H.S. Inhibition of cell growth by photooxidation products of indole-3-acetic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v.239, p.2392–2397, 1964.

GAZARIAN, I.G.; LAGRIMINI, L.M.; MELLONS, F.A.; NALDRETT, M.J. ASHBY, G.A.; THONELEY, R.N.F. Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid. **The Biochemical Journal**, v.333, p.223-232, 1998.

GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHOF, H.; WECKE, J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.1371-1414, 1998.

GOLDSMITH, M.H. Cellular signaling: new insights into the action of the plant growth hormone auxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.90, p.11442-11445, 1993.

GORDON, S.A.; BARR, S.; FRY, R.J.M. Origin of urinary auxin in germfree and conventional mouse. **American Journal of Physiology**, v. 222, p. 399-403, 1972.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, p.539-546, 1978.

GRECO, O.; FOLKES, L. K.; WARDMAN, P.; TOZER, G. M.; DACHS, G. U. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. **Cancer gene therapy**, v.7, p.1414-1420, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3.ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999. 936p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2.ed. Oxford: University Press, 1989. 543p.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KERE, J. Association of enhanced peroxidase activity in induced systemic resistance of cucumber to *Colettotrichum lagenarium*. **Physiology Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HERNÁNDEZ MARTÍ, V.; ROMÁ SÁNCHEZ, E.; SALAVERT LLETÍ, M.; BOSÓ RIBELLES, V.; POVEDA ANDRÉS, J.L. Daptomycin: revitalizing a former drug due to the need of new active agents against Gram positive multiresistant bacterias. **Revista Española de Quimioterapia**, v.20, p.261-276, 2007.

HEWITT, C.J.; NEBE-VON-CARON, G. An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiology state and its application to the study of microbial fermentations. **Cytometry**, v.44, p.179–187, 2001.

HIGGINS, D.L.; CHANG, R.; DEBABOV, D.V.; LEUNG, J.; WU, T.; KRAUSE, K. M.; SANDVIK, E.; HUBBARD, J.M.; KANIGA, K.; SCHMIDT JR., D.E.; GAO, Q.; CASS, R.T.; KARR, D.E.; BENTON, B.M.; HUMPHREY, P.P. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.1127-1134, 2005.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.462–468, 2001.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 5.ed. London: Chapman & Hall, 1996, p.661.

KAWANO, T.; KAWANO, N.; HOSOYA, H.; LAPEYRIE, F. Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.288, p.546-551, 2001.

KENTEN, R.H. The oxidation of indole-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. **The Biochemical Journal**, v. 59, p.110-121, 1955.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-range implications in tissues kinetics. **British Journal of Cancer**, n.26, p.239-257, 1972.

KIM, D.S.; JEON, S.E.; JEONG, Y.M.; KIM, S.Y.; KWON, S.B.; PARK, K.C. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis. **FEBS Letters**, v.580, p.1439-1446, 2006.

KIM, D.S.; JEON, S.E.; PARK, K.C. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. **Cellular Signalling**, v.16, p.81-88, 2004.

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. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999, p.264-282.

KOGL, R.; HAGEN-SMITH, A.J.; ERXLEBEN, H. Vegetable growth substances, phytohormones of cell extension. Purification of auxin from human urine. **Journal of Physical Chemistry**, v.214, p.241-246, 1933.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C.A.; COLLINS, J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v.130, p.797-810, 2007.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v.30, p.620-50, 2002.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KRYLOV, S.N. Computer simulation of damped oscillations during peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. **Biophysical chemistry**, v.72, p.285-295, 1998.

KRYLOV, S.N.; DUNFORD, H.B. Accelerating effect of umbelliferone on peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid at neutral pH. **Journal of Physical Chemistry**, v.100, p.19719-19727, 1996.

LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P.D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. **Applied Microbiology**, v.21, p.585-587, 1971.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LANCETTE, G.A.; BENNET, R.W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* enterotoxins. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: Sheridan, 2001. p.387-404.

LEBEAU, C.; VANDENESH, F.; GREENLAND, T.; NOVICK, R.P.; ETIENNE, J. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulation by an agar-dependent mechanism. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.5534-5536, 1994.

LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; SHADOMY, H.J. A susceptibility test: agar dilution. **Manual of Clinical Microbiology**, 4.ed. American Society for Microbiology, Washington, 1985.

MAC FADDIN, J.F. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Buenos Aires: Editora Médica Panamericana, 1980, p.301.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARCK, D.P. **Brock Biology of Microorganisms**, 2003.

MANDELL, G.; PERTI, W. Antimicrobial agents: penicillins, cephalosporins, and other b-lactam antibiotics. **The Pharmacologic Basis of Therapeutics**, New York: McGraw-Hill, 1996, p.1073–1101.

MANDELL, G.L. Catalase, Superoxide Dismutase and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. **The Journal of Clinical Investigation**, v.55, p.561-566, 1975.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARTÍNEZ, E.; ARTIGAS, F.; SUÑOL, C.; TUSSEL, J.M.; GELPÍ, E. Liquid-chromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-hydroxy-indole-3-acetic acid in human plasma. **Clinical Chemistry**, v.29, p.1354-1357, 1993.

MCCONKEY, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v.99, p.157-168, 1998.

MEKA, V.G.; PILLAI, S.K.; SAKOULAS, G.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P.C.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING JR., R.C.; GOLD, H.S. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. **The Journal of infectious diseases**, v.190, p.311-317, 2004.

METODIEWA, D.; DUNFORD, H. B. The reactions of horseradish peroxidase, lactoperoxidase, and myeloperoxidase with enzymatically generated superoxide. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.272, p.245-253, 1989.

MILLS, M.H.; FINLAY, D.C.; HADDAD, P.R. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interaction chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.564, p.93-102, 1991.

MOHR, H.; LAMBRECHT, B.; BAYER, A.; SPENGLER, H.P.; NICOL, S.B.; MONTAG, T.; MÜLLER, T.H. Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates. **Transfusion**, v.46, p.41-49, 2006.

MOURÃO, L.R.M.B. **Efeito antioxidante do ácido indol-3-acético sobre fígado de camundongos submetidos à hepatocarcinogênese induzida**. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

NEBE-VON-CARON, G.; BADLEY, R. A. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. **Journal of microscopy**, v.179, p.55–66, 1995.

NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P. J. ; HEWITT, C. H.; POWELL, J. R.; BADLEY, R. A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal of microbiological methods**, v.42, p.97–114, 2000.

NICOLAS, P.; VANHOYE, D.; AMICHE, M. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. **Peptides**, v.24, p.1669-1680, 2003.

NIEBACH, J.; BALDY-CHUDZIC, K.; STOSIK, M. Rep-PCR fingerprinting as a tool for the analysis of genomic diversity of *Escherichia coli* strains isolated from a water environment. **Cellular and Molecular Biology Letters**, p.309, 2000.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Oral Microbiology and Immunology**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1994, p.477.

NOVAK, F.R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. Rio de Janeiro, 1999. 106p. Tese de doutorado - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

NOVO, D.; PERLMUTTER, N.G.; HUNT, R.H.; SHAPIRO, H.M. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethylcarbocyanine and a ratiometric technique. **Cytometry**, v. 35, p.55-63, 1999.

O'BRIEN, P.J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v.129, p.113-139, 2000.

OLIVERIRA, D.L.; PUGINE, S.M.P.; FERREIRA, M.S.L.; LINS, P.G.; COSTA, E.J.X.; DE MELO, M.P. Influence of indole-3-acetic acid on antioxidant levels and enzyme activities of glucose metabolism in rat liver. **Cell Biochemistry and Function**, v.25, p.195-201, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; CHIANCA, T. C. M. Estudo da flora microbiana de pessoal de enfermagem de uma unidade de centro cirúrgico de um hospital universitário de Belo Horizonte. **Revista Mineira de Enfermagem**, v.3, p.13-19, 1999.

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.21, p.444-452, 2006.

PACKER, L. Oxidants, antioxidants, nutrients and the athlete. **Journal of Sports Sciences**, v.15, p.353-363, 1997.

PANKEY, G.A.; SABATH, L.D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p. 864–870, 2004.

PELCZAR, M.S.; REID, R.D.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, v.1, 1981.

POSSEL, H.; NOACK, H.; AUGUSTIN, W.; KEILHOFF, G.; WOLF, G. 2,7-dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. **FEBS Letters**, v.416, p.175-178, 1997.

PRUSTY, R.; GRISAFI, P.; FINK, G.R. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.4153–4157, 2004.

PUGINE, S.M.P.; BRITO, P.P.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; COSTA, E.J.X.; CURI, R. DE MELO, M.P. Effect of indole-3-acetic acid administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v.25, p.723-730, 2007.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v.22, p.36-40, 1988.

RAFFRAY, M.; COHEN, G.M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? **Pharmacology Therapy**, v.75, p.157-177, 1997.

RAMAMURTHY, M. S.; USSUF, K. K.; NAIR, P. M.; THOMAS, P. Lignin biosynthesis during wound healing of potato tubers in response to gamma irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v.18, p.267-272, 2000.

RAO, K.M.K.; PADMANABHAN, J.; KILBY, D.L.; COHEN, H.J.; CURRIE, M.S.; WEINBERG, J.B. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **Journal of Leukocyte Biology**, v.51, p.496-500, 1992.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v.24, p.112-119, 2001.

RYTER, S.W.; PACIFICI, R.E.; DAVIES, K.J.A. **Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress**. In: Biological Oxidation Systems, New York: Academic Press, 1990, p.929-952.

SAVITSKY, P.A.; GAZARYAN, I.G.; TISHKOV, V.I.; LAGRIMINI, L.M.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. **The Biochemical Journal**, v.340, p.579–583, 1999.

SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, v.165, p.359-369, 1996.

SHAPIRO, H. M. Membrane potential estimation by flow cytometry. **Methods**, v.21, p.271-279, 2000.

SIDOW, T.; JOHANNSEN, L.; LABISCHINSKI, H. Penicillin-induced changes in the cell wall composition of *Staphylococcus aureus* before the onset of bacteriolysis. **Archives Microbiology**, v.154, p.73-81, 1990.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 2001, p.317.

SILVA, W.P.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.103-106, 2000.

SILVERMAN, J.A.; PERLMUTTER, N.G.; SHAPIRO, H.M. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.2538-2544, 2003.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. Gram positive cocci. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: The Willians and Wilkins, 1986. v.2, p.999-1103.

SPERBER, W.H.; TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v.29, p.502-505, 1975.

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

SRIVASTAVA, O. P.; VAN HUUSTEE, R. B. An inter-relationship among peroxidase, IAA oxidase and polyphenoloxidase from plant cells. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p. 2630-2636, 1977.

STEERE, A.C.; MALLISON, G.F. **Controle de infecções em hospital**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

STILL, C.C.; FUKUYAMA, T.T.; MOYED, H.S. Inhibitory oxidation products of indole-3-acetic acid. Mechanism of action and route of detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v.240, p.2612-2618, 1965.

TAFAZOLI, S.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cytotoxic effects of indole-3-acetic acid derivative radicals. **Chemical Research in Toxicology**, v.17, p.1350-1355, 2004.

THAKENOUCI, T.; ISHII, C.; SUGAWARA, M.; TOKUE, Y.; OHYA, S. Incidence of various gyr A mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1414-1418,1995.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v.80, p.717-735, 2005.

TUSSELL, J.M.; ARTIGAS F.; SUNOL C.; MARTINEZ E.; GULPI E. Comparison of high-performance liquid-chromatography and gas-chromatography mass-spectrometry for the analysis of indole-3-acetic acid in brain-tissue. **Journal of Chromatography**, v.306, p.338-344, 1984.

VALKONEN, M; KUUSI, T.J. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. **Journal of Lipid Research**, v.38, p.823-833, 1997.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v.65, p.249-259, 2004.

WALDVOGEL, F.A. In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS, R. G.; BENNET J.E. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, New York: Churchill Livingstone, 1985, p.1097-1116.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v.406, p.775–781, 2000.

WARDMAN, P. Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: a new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. **Current pharmaceutical design**, v.8, p.1363-1374, 2002.

WASHINGTON, I.I.; LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; SHADOMY, H.J. A susceptibility test: agar dilution. **Manual of Clinical Microbiology**, 4.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985.

WEISSABACH, H.; KING, W.; SJOERDSMA, A.; UDENFRIEND, S. Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a method for estimation of indole-3-acetic acid in tissue. **Journal of Biology Chemistry**, v.234, p.81-86, 1959.

WELLER, W.E. Staphylococcal infections. **Pediatrics**, v.23, p.927-929, 1959.

WENZEL, R.P.; NETTLEMAN, M.D.; JONES, N.R.; PFALLER, M.A. A methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*: Implications for the 1990s and effective control measures. **The American Journal of Medicine**, v.91, p. 221-227, 1991.

WHITTEM, T.; HANLON, D. Dihydrostreptomycin or streptomycin in combination with penicillin in dairy cattle therapeutics: a review and re-analysis of published data, Part 2: Resistance and residues. **New Zealand Veterinary Journal**, v.45, p.223-229, 1997.

WILBERG, K.Q. **Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais**. 2003. 156f. Tese (Doutorado) - Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.6954-6958, 1997.

YAMADA, H.; YAMAZAKI, I. Proton balance in conversions between five oxidation-reduction states of horseradish peroxidase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 165, p.728-738, 1974.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-162, 1994.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of International Dairy Federation**, v.345, p.15-18, 2000.

ZHANEL, G.G.; KARLOWSKY, J.A.; SAUNDERS, M.H.; DAVIDSON, R.J.; HOBAN, D.J.; HANCOCK, R.E.; MCLEAN, I.; NICOLLE, L.E. Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.489-495, 1995.