

**SARA PATRÍCIA BETTENCOURT LUNA**

Actividade antimicrobiana do *Vaccinium cylindraceum*:  
Estudo dos mecanismos de acção por análise proteómica

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia em Controlo Biológico



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PONTA DELGADA, 2011



**SARA PATRÍCIA BETTENCOURT LUNA**

Actividade antimicrobiana do *Vaccinium cylindraceum*:  
Estudo dos mecanismos de acção por análise proteómica

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia em Controlo Biológico

Orientador

Professora Doutora Maria da Graça Silveira



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PONTA DELGADA, 2011



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a várias pessoas que no decurso do mestrado me apoiaram, nomeadamente,

O Professor Doutor Artur da Câmara Machado pela oportunidade de realizar este trabalho no Centro de Biotecnologia dos Açores.

À minha orientadora Professora Doutora Maria Graça da Silveira, gostaria de agradecer por todos os ensinamentos, o tempo, a paciência e a amizade demonstrados no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Nelson Simões e seus colaboradores pela simpatia e por me acolher e permitir utilizar os seus recursos para a análise bioinformática dos resultados deste trabalho.

Ao Doutor Duarte Toubarro gostaria de agradecer os ensinamentos, amizade, compreensão e o tempo dispensados.

À minha colega de laboratório Ana Carolina Tavares quero agradecer pela sua companhia, apoio, amizade e compreensão. Para ela mando um abraço.

Ao meu namorado e seus Pais, e à minha família agradeço o imenso o apoio e compreensão demonstrados.

Por último, gostaria de agradecer à Marlene Noía e aos restantes colegas do Centro de Biotecnologia dos Açores o apoio e amizade. E a todos aqueles que de alguma forma me apoiaram no decurso do mestrado.

## Resumo

Os biopesticidas apresentam-se como uma forma de controlo biológico, podendo ser extractos de plantas e especiarias, os quais se têm revelado promissores agentes antimicrobianos naturais. Estudou-se a actividade antibacteriana do extracto aquoso de frutos de *Vaccinium cylindraceum* em relação a *Staphylococcus aureus* e a *Listeria monocytogenes*, microorganismos patogénicos de origem alimentar, tendo-se verificado que o extracto foi eficaz a reduzir o crescimento de ambos os microorganismos. Através da análise proteómica das células de *S. aureus*, verificou-se que o extracto alterou significativamente o perfil de proteínas, tendo induzido a síntese *de novo* de 111 *spots* e a completa repressão de 59. De entre os quais se conseguiu identificar 25 proteínas, das quais 14 foram induzidas, destas, 3 foram sintetizadas *de novo* (*aldH*, *glnA* e *folD*), e as restantes 11 reprimidas, das quais, 4 não foram detectadas nas células stressadas (*adh*, *menB*, *ptsH* e *ldhD*). *AldA*, *aldH* e *akr*, participam na eliminação de aldeídos (altamente reactivos com os grupos tiol), foram induzidas, o que representa uma vantagem para a célula pois diminui a sua vulnerabilidade a stress oxidativo. A indução da enzima *cysRS*, relacionada com a síntese de cisteína, e a repressão da enzima *menB*, que participa na biossíntese duma menaquinona da cadeia transportadora de electrões, são também indicadores de que o *S. aureus* sofre stress oxidativo. Verificou-se a indução de *glnA*, *fnt* e *folD* que participam na biossíntese de aminoácidos (aa). A acumulação no meio intracelular de aa como a prolina, a betaina e a glicina, constituem uma resposta de *S. aureus* a stress osmótico. Por outro lado a desaminação da arginina e consequente alcalinização do citoplasma constitui um mecanismo de resistência à acidez, o que faz sentido uma vez que o valor do pH do extracto era de 2.92, baixando o valor do pH do meio para 5.49. A proteína fosfotransportadora HPr envolvida na repressão catabólica, estava ausente nas células stressadas, o que pode representar uma estratégia de sobrevivência para a célula, podendo utilizar outros açúcares mesmo na presença de glucose. Os resultados obtidos demonstram claramente que extracto de *V. cylindraceum* constitui uma alternativa interessante como biopesticida, muito em particular de espécies agrícolas comestíveis, pois para além de inibirem o crescimento de microorganismos de origem alimentar, contribuindo para uma maior segurança alimentar dos produtos pós-colheita, tem a vantagem de ser um produto natural comestível.

**Palavras-chave:** *Vaccinium cylindraceum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, Electroforese bidimensional, actividade antimicrobiana.

## Abstract

Biopesticides can be applied as plant or spice extracts, and have revealed themselves as promising natural antimicrobials. Thus, we studied the antibacterial activity of the aqueous extract from *Vaccinium cylindraceum* berries against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, which are two foodborne pathogens. We found that the extract was effective in reducing the growth rate of both microorganisms. Proteome analysis of *S. aureus* showed that the extract induced the synthesis of 111 spots, and the shut-down of 59. Of all the spots we were able to identify 25 proteins, where 14 were induced, from which 3 were synthesized *de novo* (*aldH*, *glnA* e *fold*) and the other 11 were repressed, from which 4 were shut-down (*adh*, *menB*, *ptsH* e *ldhD*). Adh and akr are enzymes that participate in the elimination of aldehydes (highly reactive with thiol groups), what represents an advantage to the cell by decreasing their susceptibility to oxidative stress. *CysRS* which is involved in cysteine synthesis was induced, and the protein *menB* involved in the synthesis of menaquinone was repressed, both indicators of oxidative stress. *GlnA*, *fmt* and *fold* involved in the biosynthesis of amino acids (aa) where all induced. The intracellular accumulation of aa like proline, betaine and glycine represents an osmotic stress response. On the other hand, the deamination of arginine and consequent alkalization of the cytoplasm is one mechanism of resistance to acidity, which is in agreement with the pH value of the extract of *V. cylindraceum* (2.92), and consequently the lower pH of the medium with 160 mg/ml of extract (5.49). HPr protein involved in catabolic repression was completely suppressed in stressed cells, which may represent a survival strategy for the cell that can use other sugars even in the presence of glucose. The results achieved in this study clearly demonstrate that the aqueous extract of *V. cylindraceum* represents an interesting alternative as a biopesticide, especially in which concerns edible crops, due to its antimicrobial activity against foodborne pathogens, increasing the safety of products post harvest, with the additional advantage of being a natural product edible.

**Keywords:** *Vaccinium cylindraceum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, Two Dimensional Electrophoresis, antimicrobial activity.



## Índice

Resumo	
Abstract	
Conteúdos .....	1
Índice de Figuras .....	3
Índice de Quadros .....	6
Lista de Abreviaturas.....	7
1. Introdução .....	10
2. Revisão bibliográfica .....	12
2.1. Controlo biológico .....	12
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.4. Propriedades bioactivas das plantas.....	15
2.5. Actividade antimicrobiana.....	16
2.6. Mecanismos de actividade antimicrobiana.....	18
2.7. Mecanismos de resposta e adaptação ao stress.....	20
2.8. Proteómica .....	23
2.8.1. Electroforese bi-dimensional.....	24
2.8.2. Preparação da amostra .....	25
2.8.3. Focalização isoelectrica .....	26
2.8.4. Segunda dimensão .....	27
2.8.5. Visualização dos <i>spots</i> .....	28
2.8.6. Análise dos perfis proteicos.....	29
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Caracterização de <i>Vaccinium cylindraceum</i> .....	31
3.2. Caracterização das amostras de <i>Vaccinium cylindraceum</i> .....	31
3.3. Preparação do extracto aquoso de frutos de <i>V. cylindraceum</i> .....	32
3.4. Estirpes bacterianas e condições de crescimento.....	33
3.5. Actividade antibacteriana .....	33
3.6. Condições de stress.....	34
3.7. Análise proteómica .....	34
3.7.1. Extracção e preparação de proteínas citoplasmáticas.....	34
3.7.2. Determinação da concentração de proteína .....	35

3.7.3. SDS-PAGE .....	35
3.7.4. Electroforese bi-dimensional .....	36
3.7.4.1. Focalização isoelectrica .....	36
3.7.4.2. Segunda dimensão .....	37
3.7.4.3. Visualização dos spots.....	37
3.7.4.4. Análise dos perfis proteicos.....	38
4. Resultados.....	39
4.1. Actividade antibacteriana .....	39
4.2. Avaliação do estado fisiológico das células .....	40
4.3. Processo de optimização da análise proteómica.....	42
4.3.1. Quantificação da proteína.....	42
4.3.2. Focalização isoelectrica .....	43
4.3.3. Extractos de proteína .....	44
4.3.3.1. Preparação e extracção de proteínas citoplasmáticas ..	44
4.3.3.2. Concentração da proteína .....	45
4.3.3.3. Qualidade da proteína.....	46
4.3.4. Segunda dimensão .....	47
4.4. Análise dos perfis proteicos.....	47
4.4.1. SDS-PAGE.....	47
4.4.2. 2D-E .....	49
4.5. Identificação de spots .....	55
5. Discussão .....	57
6. Conclusão .....	62
7. Bibliografia.....	63
8. Anexos.....	77
8.1. Anexo I .....	77
8.2. Anexo II .....	86
8.3. Anexo III .....	87

## Índice de Figuras

Figura 3.1. A planta <i>V. cylindraceum</i> com seus frutos, do tipo baga, colhidos no sítio Furnas do Enxofre no mês de Setembro de 2010 .....	32
Figura 3.2. Frutos maduros de <i>V. cylindraceum</i> , colhidos no sítio Furnas do Enxofre no mês de Setembro de 2010.....	32
Figura 3.3: Moinho <i>MM 200</i> (Retsch, Europa), utilizado na preparação do extracto aquoso de <i>V. cylindraceum</i> .....	33
Figura 3.4: Sistema de electroforese horizontal, fonte de alimentação e sistema de refrigeração (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) utilizado para a electroforese bi-dimensional.....	36
Figura 4.1. Taxa de crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i> crescidos na presença de concentrações crescentes de extracto aquoso de <i>V. cylindraceum</i> .....	39
Figura 4.2: Contagens de Unidades Formadoras de Colónias de <i>S. aureus</i> e <i>L. monocytogenes</i> de células que não estiveram expostas a extracto (“controlo”) e que foram expostas a 60 mg/mL (tratamento “adaptadas”) (A) e a 160 mg/mL de extracto de <i>V. cylindraceum</i> (tratamento “stressadas”) (B) .....	41
Figura 4.3: Coloração de Gram de <i>S.aureus</i> ATCC 29213 após os tratamentos A) “controlo”, B) “stress” e C) “adaptadas” (ampliação 1000x).....	42
Figura 4.4: Coloração de Gram de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 após os tratamentos A) “controlo”, B) “stress” e C) “adaptadas” (ampliação 1000x) .....	42
Figura 4.5: Perfil proteico do tratamento “controlo” de <i>S.aureus</i> durante a optimização da IEF, onde A representa o programa de isofocalização recomendado pelo fabricante (300 V, 1 min.; 3500 V, 2.9 KVh; 3550 V, 8 KVh), B representa o programa em que se aplica 300 V durante 6 horas, antes de se aplicar a voltagem máxima, e C representa o programa descrito nos Materiais e Métodos (300 V 6h, 800 V 2h, 3500 V 2.9 KVh, e 3500 V 11 KVh) .....	44

Figura 4.6: Perfil proteico de <i>L. monocytogenes</i> durante a selecção da solução para a extracção das proteínas, em A a extracção foi feita com tampão Tris 10 mM, pH 7.4, e em B com solução de ureia a 9.8 M adicionada de CHAPS 4.5%; IEF (programa descrito no Materiais e Métodos). .....	45
Figura 4.7: Efeito da concentração de amostra no perfil proteico de <i>L. monocytogenes</i> onde em A foram aplicados 50 µg de proteína e em B 30 µg. Na figura A estão assinalados alguns exemplos de <i>spots</i> que não são visíveis na figura B, resultado da diferença na concentração de amostra presente em cada um dos perfis proteicos .....	46
Figura 4.8: Qualidade da proteína resultante do tratamento adaptadas de <i>S. aureus</i> (A) e <i>L. monocytogenes</i> (B), cada um com aproximadamente 40 µg de proteína, onde se verifica que ambos apresentam sinais de oxidação, provocados pelo extracto de <i>V. cylindraceum</i> .....	47
Figura 4.9: Gel de poliacrilamida (12 %) SDS-PAGE da proteína citoplasmática total de <i>S. aureus</i> e respectivas imagens de pormenor, em que C corresponde ao tratamento “controlo”, S ao “stress” e A “adaptadas”, com aproximadamente 30µg de proteína em cada tratamento.....	48
Figura 4.10: Gel de poliacrilamida (12 %) SDS-PAGE da proteína citoplasmática total de <i>L. monocytogenes</i> e respectivas imagens de pormenor, em que C corresponde ao tratamento “controlo”, S ao “stress” e A “adaptadas”, com aproximadamente 30 µg de proteína em cada tratamento.....	49
Figura 4.11. Perfil proteico de <i>S. aureus</i> no tratamento “controlo” (A) e no tratamento “stress” (B), onde foram aplicadas 30 µg de proteína e o programa de IEF descrito no Materiais e Métodos. Os únicos perfis que foram analisados no programa <i>ImageMaster 2D Platinum 6.0</i> .....	50
Figura 4.12: Imagem de pormenor dos perfis proteicos de <i>S. aureus</i> onde estão assinalados os <i>spots</i> idênticos (a verde) em ambos os tratamentos, sendo A o tratamento “stress” e B o tratamento “controlo” após a comparação dos géis onde as setas a azul representam a diferença na posição dos <i>spots</i> entre os géis .....	50
Figura 4.13 : <i>Spots</i> detectados pelo programa <i>ImageMaster 2D Platinum 6.0</i> , nos tratamentos “controlo” e “stress” de <i>S. aureus</i> .....	51

Figura 4.14 : Variação na percentagem de volume dos *spots* comuns a ambos os tratamentos. As barras a roxo representam os *spots* que apresentavam maior percentagem de volume no tratamento “stress” e as barras de cor verde representam os *spots* que apresentaram menor percentagem de volume no tratamento “stress” .....52

Figura 4.15: Percentagem de volume de cada *spot* presentes apenas no tratamento “controlo” .....53

Figura 4.16: Percentagem de volume de cada *spot* induzido apenas no tratamento “stress” .....54

Figura 4.17: Concentração dos *spots*, tendo em conta a sua percentagem de volume. Onde apenas 12 *spots* com percentagem de volume igual ou superior a 2 representam 40% da concentração total dos *spots* no tratamento “controlo”, e no tratamento “stress” 14 *spots* representam 42% da concentração total de *spots* .....55

## Índice de Quadros

Quadro 4.4. <i>Spots</i> identificados por comparação com o perfil proteico de <i>S. aureus</i> estabelecido por Scherl <i>et al.</i> (2005) e publicado na database <i>SWISS 2DPAGE</i> e respectivos factores de indução ou repressão .....	56
Quadro 1: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos <i>spots</i> comuns a ambos os tratamentos, “controlo” e “stress” (Anexo I) .....	78
Quadro 2: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos <i>spots</i> presentes apenas no tratamento “controlo” (Anexo I) .....	82
Quadro 3: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos <i>spots</i> presentes apenas no tratamento “stress” (Anexo I) .....	83
Quadro 4: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos <i>spots</i> cuja a sua percentagem de volume é igual ou superior a 2 (Anexo II) .....	87
Quadro 5: Identificação, pI, peso moleuclar e número de acesso na database NCBI dos <i>spots</i> identificados por comparação com o perfil proteico de <i>S. aureus</i> estabelecido por Scherl <i>et al.</i> (2005) e publicado na database <i>SWISS 2DPAGE</i> (Anexo III) .....	88

## Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

adh – Álcool desidrogenase

AEBSF – *Aminoethyl benzylsulfonyl fluoride*

aldA – Aldeído desidrogenase

aldH – Aldeído desidrogenase

akr – Aldo-ceto reductase

APS – Perclorato de amónio (*Amonium perclorate*)

arcC – Carbamato quinase

argS – Cisteína-tRNA ligase sintetase

ARN – Ácido ribonucleico

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato

$a_w$  – Actividade da água

BHI – *Brain Heart Infusion*

BCA – *Bicinchoninic Acid*

CCPA – *Catabolite control protein A*

CHAPS – *3-(3-cholamidopropyl)dimenthylammonio-1-propane sulfonate*

cm - Centímetro

CN – Caldo nutritivo

CNsupl. – Caldo nutritivo suplementado com 5 g/L de D-glucose

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

csd – Cisteína desulfurase

cte – Cadeia transportadora de electrões

DHNA – Ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoato

dH<sub>2</sub>O – Água destilada

dnaK – Chaperona hsp 70

DTE – *Dithioerythreitol*

DTT – *Dithiothreitol*

fnt – Metinoli-tRNA formiltransferase

fold – Meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase

g - Grama

GDP – guanosina difosfato

glnA – Glutamina sintetase  
groEL – Chaperona hsp 60  
h - Hora  
HCl – Ácido clorídrico  
HIV - Human immunodeficiency virus  
HMWM – Marcador de elevado peso molecular  
hsp – *Heat shock proteins*  
Hz - Hertz  
IAA – Iodoacetamida  
IEF – Focalização isoeleétrica (*Isoelectric focusing*)  
IPG – Gradiente de pH imobilizado (*Immobilized pH gradient*)  
kDa – kilodalton  
kVh – kilovolts hora  
ldhD – D-lactato desidrogenase / D-specific D-2-hidroxiácido desidrogenase  
LMWM – Marcador de baixo peso molecular  
min - Minuto  
menB – 1,4-dihidroxi-2-naftoil-CoA sintetase  
mA - Miliampères  
mg – Miligramas  
mL – Mililitro  
mm - Milímetro  
mM – Milimolar  
M - Molar  
NADH - *Nicotinamide adenine dinucleotide*  
nagB – glucosamina-6-fosfato desaminase  
ndk – nucleosido difosfato quinase  
NH<sub>3</sub> - Amónia  
nm - Nanómetro  
NP-40 - *nonyl phenoxypolyethoxylethanol*  
OD<sub>595</sub> – Densidade óptica a 595 nm  
p - Peso  
PBS – Tampão fosfato (*Phosphate buffered saline*)  
pdxs – Piridoxal biossíntese liase  
pI – Ponto isoeletrico (*Isoelectric point*)

ptsH – Proteína fosfotransportadora HPr  
purN – Fosforibosilglicinamida formiltransferase  
PMSF – Fluoreto fenilmetanosulfonil (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*)  
RC – Repressão catabólica  
roc2D – Ornitina-oxo-ácido aminotransferase  
rpm – Rotações por minuto  
s - Segundo  
SDS – Sulfato de sódio dodecil (*Sodium dodecyl sulfate*)  
SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate-Poliacrylamide gel electrophoresis*  
spa – Proteína A de ligação à imunoglobulina G  
TBP – *Tributylphosphine*  
TCA – Ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid*)  
TEMED – Tetrametiletilenodiamina (*Tetramethylethylenediamine*)  
tsf – Factor de alongamento  
ufc – Unidades formadoras de colónias  
uv – Ultra-violeta  
v – Volume  
V - Volts  
µm - Micrometros  
2-DE – Electorforese bi-dimensional (*Two dimensional electrophoresis*)  
°C – Graus centígrados

# 1. Introdução

**A**o longo dos anos, a solução encontrada para eliminar as pragas consistiu na aplicação de compostos químicos, conhecidos por pesticidas. No entanto, tem vindo a ser demonstrado que estes compostos podem representar uma série de riscos para a saúde humana e no ambiente, nomeadamente, com o aparecimento de pragas resistentes (Maramorosch, 1991). É neste sentido que surge uma alternativa aos pesticidas convencionais, os pesticidas naturais ou biopesticidas, por serem mais seguros para a saúde humana e para o ambiente (Gupta e Dikshit, 2010).

Os biopesticidas apresentam-se como uma forma de controlo biológico, podendo ser extractos de plantas e especiarias, ou compostos extraídos destes, os quais se têm revelado promissores agentes antimicrobianos naturais, pois possuem actividade antimicrobiana contra um largo espectro de bactérias patogénicas (Kivanc *et al.*, 1991; Akroum *et al.*, 2009), e leveduras (Akroum *et al.*, 2009). Pensa-se que esta actividade esteja associada a compostos resultantes do metabolismo secundário da planta, como por exemplo os compostos fenólicos e alcalóides. Estes compostos podem ainda desempenhar funções ecológicas importantes, tais como a propriedade insecticida/pesticida, podendo actuar como repelentes, xenobióticos e aleloquímicos (Nivsarkar *et al.*, 2001). Estas funções defensivas são essenciais para a planta no seu meio natural (Buchanan *et al.*, 2000; Stalikas, 2007) e têm vindo a ser aproveitadas no controlo biológico (Castillo-Sánchez *et al.*, 2010).

Os frutos tipo baga possuem uma grande variedade de compostos fitoquímicos, que, pensa-se, contribuem grandemente para a sua actividade antimicrobiana (Kivanc *et al.*, 1991; Burdulis *et al.*, 2009). Neste sentido, achou-se pertinente avaliar a capacidade antimicrobiana do *Vaccinium cylindraceum*, uma espécie endémica dos Açores conhecida por “uva da serra”, em relação a microorganismos patogénicos de origem

alimentar, nomeadamente *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Estes microorganismos para além de provocarem graves doenças em humanos e animais, através do consumo dos alimentos contaminados (Hecker *et al.*, 2003; Lowy, 2003; Peiris, 2005; Buchanan *et al.*, 2004; Hamon *et al.*, 2006; Adams e Moss, 2008) podem também provocar a deterioração dos alimentos (Roller, 1999). Segundo McIntyre *et al.* (2007), a forma mais frequente de exercer controlo biológico sobre estes microorganismos é através da aplicação directa nos alimentos de, por exemplo, óleos essenciais cuja actividade antimicrobiana já foi demonstrada sobre uma variada gama de organismos patogénicos de origem alimentar, tais como *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e algumas espécies de *Vibrio*.

Segundo Bandow *et al.* (2003), a análise proteómica permite-nos ter uma visão ampla sobre o estado fisiológico das células, e é útil tanto para a identificação do objectivo como para a sua validação, neste caso, a capacidade antimicrobiana dos compostos naturais (Vihinen, 2001). Assim, no presente trabalho pretendeu-se estudar os mecanismos envolvidos na resposta ao stress desencadeado pelo *V. cylindraceum*, através da análise do nível de expressão de proteínas por parte das bactérias testadas em diferentes estados fisiológicos: células crescidas em condições óptimas (controlo), células crescidas em condições óptimas e sujeitas a uma elevada concentração de extracto de *V. cylindraceum* (stressadas) e células crescidas na presença de uma concentração sub-letal de extracto de *V. cylindraceum* (adaptadas). Esta análise foi feita utilizando a técnica de electroforese bidimensional, permitindo-nos identificar as proteínas que desempenham um papel fundamental nos mecanismos de adaptação e resposta ao stress desencadeado pelo *V. cylindraceum*.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Controlo biológico

O termo controlo biológico foi utilizado pela primeira vez por Smith, em 1919, para definir a utilização de inimigos naturais, nativos ou introduzidos, para combater e suprimir as populações de insectos indesejados, considerados como sendo uma praga (Rechcigl e Rechcigl, 2000). No meio ambiente, estes eventos ocorrem naturalmente e com frequência, constituindo um importante componente na regulação das populações. Na agricultura, a sua aplicação tem como objectivo reduzir a actividade de uma praga tendo em conta o meio ambiente, e as situações económica e legal (Lazarovits *et al.*, 2007).

O controlo biológico mais comumente observado e explorado acontece quando se aplicam ou libertam insectos para controlar outros insectos indesejáveis, como por exemplo a *Harmonia axyridis* que foi utilizada para controlar populações de afídeos (Snyder *et al.*, 2004). Mais recentemente, num trabalho descrito por Pimenta *et al.* (2007), utilizaram-se leveduras para controlar o crescimento de fungos. Nos Açores, está a ser estudada a possibilidade do fungo *Metarhizium anisopliae* ser utilizado no controlo do escaravelho japonês (*Popillia japonica*) (Medeiros *et al.*, 2009). No entanto, o exemplo de controlo biológico mais antigo que se conhece será, provavelmente, o da aplicação de óleos essenciais ou compostos extraídos de plantas para controlar e tratar doenças infecciosas, provocadas por bactérias, leveduras ou fungos (Rios e Recio, 2005).

Na indústria alimentar a praga é representada, por exemplo, pelos microorganismos patogénicos presentes num determinado alimento, tais como *L. monocytogenes* e *S. aureus*, ou ainda os microorganismos responsáveis pela sua deterioração (McIntyre *et al.*, 2007). Bacteriófagos, bacteriocinas (Leverentz *et al.*, 2003; McIntyre *et al.*, 2007), sideróforos (moléculas que captam ferro), *quorum sensing* (onde a presença de um autoindutor de uma espécie pode influenciar o crescimento de outra), organismos competitivos, e vários compostos antimicrobianos derivados de microorganismos e de plantas (Lin *et al.*, 2004; McIntyre *et al.*, 2007; Apostolidis *et al.*, 2008) representam potenciais agentes de biocontrolo sobre os microorganismos praga da indústria alimentar (McIntyre *et al.*, 2007).

Apesar de haver um crescente número de documentos científicos que descrevem a bioactividade de derivados de plantas contra diferentes pragas, na actualidade são poucos os produtos que estão estabelecidos comercialmente como biopesticidas derivados de plantas, de entre eles encontram-se os produtos da árvore *neem* (*Azadirachta indica*). Mais recentemente alguns óleos essenciais de plantas superiores têm sido utilizados como agentes antimicrobianos contra pragas desenvolvidas durante o armazenamento de produtos alimentares. Esta solução tem tido grande aceitação pelos consumidores devido ao seu estatuto relativamente seguro e além disso alguns destes produtos possuem forte actividade antioxidante, uma propriedade favorável para combater os radicais livres responsáveis pela deterioração organoléptica, aumentando a vida útil dos produtos alimentares. No contexto de manejo de pragas agrícolas, os pesticidas de origem vegetal são os mais adequados para utilizar na protecção da colheita e pós-produção de produtos alimentares (Dubey *et al.*, 2008).

## 2.2. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* já foi alvo de várias classificações taxonómicas, como por exemplo, em 1911 como *Bacillus hepatis* (Adams e Moss, 2008). É um organismo Gram-positivo, aeróbio (Lin *et al.*, 2004) e anaeróbio facultativo, psicotrófico (podendo crescer entre os 0 e os 45°C, com o seu óptimo entre os 30 e os 37°C) (Lin *et al.*, 2004; Buchanan *et al.*, 2004), é catalase-positivo, oxidase-negativo, e não-esporulado. Pode ter forma de coco a bastonete (0,4-0,5 µm x 0,5-2,0 µm), ocorrendo isolados ou em pequenos grupos, em cadeia, geralmente em forma de “V” ou “Y”. Quando crescido a 20-25°C desenvolve flagelos peritricos (distribuídos de forma homogénea pela superfície da bactéria) e exhibe uma motilidade característica (Peiris, 2005). Abaixo dos 5°C o seu crescimento tende a ser extremamente lento com fases *lag* que podem ir até aos 33 dias, e com tempos de geração que podem atingir 130h (Adams e Moss, 2008). É uma bactéria neutrófila, com pH de crescimento óptimo entre 7 e 8 (Lin *et al.*, 2004). O seu crescimento pode ser inibido quando o pH se encontra abaixo dos 5.5, no entanto, o pH mínimo de crescimento é dependente da estirpe e do acidulante, já tendo sido relatado o seu crescimento para valores de pH de 4.4 (Georg *et al.*, 1988 *apud* Saklani-Jusforgues *et al.*, 2000). É tolerante a sais, podendo crescer num meio contendo 10% cloreto de sódio (NaCl) e sobreviver por um ano em 16% NaCl a pH 6.0 (Adams e Moss, 2008).

No ambiente, é um organismo ubíquo, podendo ser encontrada no solo, em água potável e salgada, esgotos, vegetais em deterioração, silagem (Adams e Moss, 2008), vegetais frescos, redes hidráulicas (Folio *et al.*, 2004; Leverentz *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004; Mena *et al.*, 2004), fezes de animais e de humanos e em alimentos (Trémoulet *et al.*, 2002; Leverentz *et al.*, 2003; Folio *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004; Mena *et al.*, 2004; Hamon *et al.*, 2006). É também conhecida por ser um patógeno intracelular facultativo de animais e humanos, com a capacidade de se multiplicar em células do sistema monócito-macrófago, podendo provocar listeriose, meningite, encefalite, infecções transplacentais, septicemia e aborto, com taxa de mortalidade elevada, geralmente associadas à ingestão de produtos alimentares contaminados (Peiris, 2005; Buchanan *et al.*, 2004; Hamon *et al.*, 2006; Adams e Moss, 2008).

Quando as condições de crescimento se demonstram adversas, como osmolaridade elevada, temperaturas reduzidas e choque ácido, esta bactéria tem a capacidade de desenvolver mecanismos que lhe permitem resistir à adversidade e eventualmente de se adaptar para sobreviver (Phan-Thanh e Mahouin, 1999; Duché *et al.*, 2002), através da regulação da síntese de várias proteínas, incluindo factores de virulência específicos (Gahan *et al.*, 1996).

### 2.3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, descrita pela primeira vez por Alexander Ogston em 1882 (Adams e Moss, 2008). É um microorganismo aeróbio, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, coagulase-positivo, com 1 µm de tamanho, de forma esférica e imóvel. Cresce em cachos, como as uvas, pois a sua divisão celular ocorre em mais de um plano. De facto, *staphyle* em grego significa “grupo de uvas”, e *cocci*, significa “bactérias esféricas”. E o nome *aureus*, que significa “ouro”, foi adicionado porque esta bactéria forma grandes colónias de cor amarelada (Freeman-Cook e Freeman-Cook, 2006; Adams e Moss, 2008). Este microorganismo pode ser isolado de fezes e esporadicamente de uma variada gama de locais ambientais, tais como solo, água do mar e potável, superfícies de plantas, do pó e do ar (Adams e Moss, 2008).

*Staphylococcus aureus* é um patógeno de grande importância, pois tem a capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, desenvolvendo resistências a diferentes

stresses ambientais (Binh, 2008). Este microorganismo pode crescer num espectro de temperaturas dos 15-45°C (Freeman-Cook e Freeman-Cook, 2006), sendo que o seu óptimo se encontra entre os 35 e 37°C; é um organismo neutrófilo, no entanto, pode crescer em pH entre 4-9,8; é tolerante a sais podendo crescer na presença de 20% de NaCl e com reduzida  $a_w$  (0,83) com valores óptimos entre 0,98 e 0,99 (Adams e Moss, 2008).

O *S. aureus* pode sobreviver extremamente bem fora do hospedeiro, e caracteriza-se por ser responsável por uma gama muito diversificada de infecções graves (Hecker *et al.*, 2003; Lowy, 2003), nomeadamente a intoxicação alimentar (Freeman-Cook e Freeman-Cook, 2006), que se caracteriza por náuseas, vómitos, dores abdominais, prostração e diarreia (Adams e Moss, 2008). A patogenicidade do *S. aureus* é muito complexa e envolve uma elevada coordenação na síntese de proteínas associadas à parede celular e toxinas extracelulares (Hecker *et al.*, 2003).

Se as condições para o crescimento forem desfavoráveis, o *S. aureus* pode entrar em estado de dormência, durante anos. Mais tarde, quando as condições se tornarem favoráveis, pode voltar a crescer normalmente (Freeman-Cook e Freeman-Cook, 2006). Uma das razões pela qual o *S. aureus* é muito resiliente deve-se à sua parede celular, que ao microscópio electrónico aparece como uma estrutura homogénea relativamente espessa (cerca de 20 a 40 nm) (Giesbrecht *et al.*, 1998), mais espessa que a parede celular da maioria das outras bactérias (Freeman-Cook e Freeman-Cook, 2006), o que pode dificultar a entrada de compostos antibacterianos (Freeman-Cook e Freeman-Cook, 2006).

#### 2.4. Propriedades bioactivas das plantas

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em investigar as propriedades medicinais de certas plantas, devido a uma maior consciencialização dos seus efeitos positivos na saúde (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). De facto, cerca de 25% dos medicamentos prescritos em todo mundo são de origem vegetal (Rates, 2001). O Instituto Nacional do Cancro, nos Estados Unidos da América, já testou mais de 50 000 plantas para actividade anti-HIV, e cerca de 33 000 para actividade anti-tumoral (Rates, 2001).

Pensa-se que as propriedades bioactivas das plantas são originadas por compostos de baixo peso molecular que resultam essencialmente do metabolismo secundário. Estes compostos desempenham funções importantes para o desempenho da planta que os produz, como a defesa contra herbívoros, fungos e bactérias, vírus, e outras plantas que competem por luz, água e nutrientes. Podem também actuar como compostos de sinal para atrair animais polinizadores e dispersores de sementes, para a comunicação entre plantas e microorganismos simbiotes e podem ainda actuar ao nível da protecção contra os raios UV ou outro stress físico (Wink, 2010).

De entre os metabolitos secundários, os compostos fenólicos, terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas e polipéptidos, e poliacetilenos, constituem o principal grupo de compostos com actividade antimicrobiana (Cowan, 1999). Os compostos fenólicos, são os que se encontram em maior abundância nas plantas (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Doughari *et al.*, 2009), podendo ser ácidos hidroxibenzóicos, derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonóis, algumas fitoalexinas, antocianinas e taninos (Rhodes, 2004) e são os principais responsáveis pelas actividades antioxidante e antimicrobiana observadas, sendo as bactérias Gram-positivas os microorganismos mais susceptíveis (Doughari *et al.*, 2009). São compostos orgânicos com um ou mais grupos hidroxilo no anel aromático, geralmente ácidos, que podem formar pontes de hidrogénio por interacções intra- e inter- moleculares, e podem formar moléculas complexas com iões metálicos, principalmente ferro e alumínio (Cowan, 1999).

Os frutos do tipo baga são constituídos em grande parte por compostos bioactivos, tais como compostos fenólicos e ácidos orgânicos, que, pensa-se serem os responsáveis pela actividade antimicrobiana exercida por estas bagas (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Rauha *et al.*, 2000). Existem alguns trabalhos que reportam a actividade antimicrobiana de vários extractos de bagas, como por exemplo, o extracto metanólico de *Hippophae rhamnoides* (Chaman *et al.*, 2011), os óleos essenciais de bagas de *Juniperus* (Filipowicz *et al.*, 2003), e os extractos fenólicos de outras bagas (Nohynek *et al.*, 2006).

## 2.5. Actividade antimicrobiana

A actividade antimicrobiana de várias espécies do género *Vaccinium* encontra-se descrita em vários trabalhos, nomeadamente, contra *Staphylococcus aureus* (Rauha *et*

*al.*, 2000; Hui *et al.*, 2004; Magariños *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Akroum *et al.*, 2009; Burdulis *et al.*, 2009; Rahbar e Diba, 2010; Côté *et al.*, 2011), *Listeria monocytogenes* (Magariños *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Burdulis *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2011), *Bacillus subtilis* (Rauha *et al.*, 2000; Akroum *et al.*, 2009; Burdulis *et al.*, 2009), *Bacillus cereus* (Akroum *et al.*, 2009), *Citrobacter freundii* (Burdulis *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (Rauha *et al.*, 2000; Magariños *et al.*, 2008; Burdulis *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Rahbar e Diba, 2010), e *Pseudomonas aeruginosa* (Magariños *et al.*, 2008; Burdulis *et al.*, 2009).

Verificou-se que o sumo concentrado de *Vaccinium* apresentava actividade antimicrobiana (em método de difusão em agar) tanto em relação a *L. monocytogenes* como a *S. aureus*, tendo este demonstrado ser mais susceptível (Magariños *et al.* 2008). No entanto, noutro trabalho em que a actividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de diluição e espalhamento em meio sólido e consequente determinação de células viáveis, revelou que *L. monocytogenes* apresentou maior susceptibilidade ao concentrado de *Vaccinium* do que o *S. aureus* (Wu *et al.* 2008). Os mesmos autores testaram ainda o efeito do pH do concentrado em comparação com uma solução ácida (com a mesma concentração e pH) e verificaram que o concentrado apresentava maior actividade antibacteriana que a solução ácida, concluindo que a actividade antimicrobiana do concentrado de *Vaccinium* se deve, para além do efeito do pH, a outros compostos presentes nas bagas, nomeadamente os compostos fenólicos.

Hui *et al.* (2004) demonstraram a actividade antimicrobiana de compostos isolados de *Vaccinium*, nomeadamente proantocianidinas, os quais inibiam o crescimento e a adesão de *S. aureus* em superfícies de colagénio. Mais recentemente, Côté *et al.* (2011) demonstram que o *S. aureus* era mais susceptível do que a *L. monocytogenes* à fracção de fenóis extraída de bagas de *Vaccinium macrocarpon*, tendo observado a inibição do crescimento de *S. aureus* na presença de apenas 25.20 µg de fenóis.

A actividade antimicrobiana das bagas é, provavelmente, devida a múltiplos mecanismos e sinergias, uma vez que estas contêm vários compostos, nomeadamente ácidos orgânicos fracos, ácidos fenólicos, taninos e as misturas das suas diferentes formas químicas (Nohynek *et al.*, 2006).

## 2.6. Mecanismos de actividade antimicrobiana

São vários os mecanismos de acção que podem inibir o crescimento dos microorganismos (Burdulis *et al.*, 2009). O local alvo da célula em que um biocida vai actuar, assim como a sua eficácia poderão ajudar-nos a compreender o modo global de acção deste mesmo biocida (Maillard, 2002).

A capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos tem sido bastante estudada (Nohynek *et al.*, 2006). O eugenol, um polifenol, actua sobre a parede celular (Walsh *et al.*, 2003), por desintegração da membrana interna (Helander *et al.*, 1998), entrando assim na célula onde vai reagir com os componentes do citoplasma e com as proteínas celulares (Walsh *et al.*, 2003). Nohynek *et al.* (2006) descreveram o mecanismo de acção dos polifenóis de framboesas sobre estirpes de *Salmonella*, como a destabilização da membrana externa, resultado da sua ligação aos lipopolissacáridos (LPS), que leva à sua libertação e conseqüentemente ao aumento da permeabilidade da membrana externa.

Em *B. cereus*, o carvacrol (monoterpeno) provoca a destabilização da membrana e um decréscimo no potencial de membrana, provavelmente devido ao decréscimo do  $\Delta\text{pH}$  (Utlea *et al.*, 2002). Estes autores sugerem que o carvacrol actua como um ionoforo, difundindo-se através da membrana citoplasmática e dissociando-se no citoplasma, onde liberta os seus protões. Posteriormente, pode transportar um ião potássio (ou outro catião monovalente) do citoplasma para o exterior da célula, através da membrana citoplasmática. Desta forma o carvacrol diminui o gradiente de pH sem afectar o gradiente eléctrico ( $\Delta\Psi$ ). A dissipação da força protomotriz resulta numa diminuição da síntese de ATP o que, eventualmente, levará à morte da célula (Maillard, 2002).

Puupponen-Pimia *et al.* (2001) verificaram que a quercetina (flavonóide) e o ácido clorogénico (ácido hidroxicinâmico), inibiam o crescimento de *E. coli* CM 871 mas não o de *E. coli* 50, pelo que hipotetizaram que a actividade antimicrobiana destes compostos era provavelmente devida à interacção com o ADN, inibindo a sua síntese (Maillard, 2002).

Roccaro *et al.* (2004) demonstraram que a epigallocatequina-galato (polifenol) tinha a capacidade de reverter a resistência do *S. aureus* à tetraciclina, e que este fenómeno se devia à inibição das bombas de efluxo de tetraciclina e conseqüentemente à sua retenção

intracelular. Noutro estudo verificou-se que a (-)-epigallocatequina (polifenol), tal como a miricetina (flavonol) e a robinetina (flavona) inibiam a síntese de ADN em *Proteus vulgaris*, e a de ARN em *S. aureus*, além de que a síntese de lípidos e de proteínas também foi afectada, mas em menor grau (Cushnie e Lamb, 2005). Os autores sugeriram que o anel B dos flavonóides poderá interferir na ligação ou intercalação do hidrogénio no emparelhamento das bases dos ácidos nucleicos, podendo explicar a inibição da síntese de ADN e ARN.

Apesar do modo de acção dos taninos ainda não ser bem conhecida, existem evidências de que a sua actividade antimicrobiana esteja associada à inibição da síntese de enzimas extracelulares, de privação de substratos necessários para o crescimento, ou da acção directa sobre o metabolismo através da inibição da fosforilação oxidativa (Scarlburt, 1991 *apud* Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). Akiyama *et al.* (2001) verificaram que todos os taninos testados inibiam a capacidade de *S. aureus* coagular o plasma, para concentrações abaixo da MIC, sugerindo assim que o mecanismo de acção provavelmente se devia à inibição da formação de fibrina pelo *S. auerus*.

O mecanismo de acção dos terpenóides não está completamente esclarecido, mas pensa-se que esteja associado com a desorganização da membrana (Cowan, 1999), por acção de compostos lipofílicos, tais como o xantorizol, o cinnamodial (Saleem *et al.*, 2010), o timol e o eugenol (Walsh *et al.*, 2003).

O mecanismo de acção das lectinas e dos polipéptidos poderá dever-se à formação de canais iónicos na membrana microbiana, ou por inibição competitiva da adesão de proteínas microbianas a receptores polissacáridos no hospedeiro (Cowan, 1999). Reid *et al.* (2001) detectaram a inibição da aderência e multiplicação de *E. coli* em uroepitélio após exposição a sumo de arando. Vários mecanismos foram propostos para a antiaderência, alteração da conformação das P-fimbrias; bloqueio da acção adesiva das P-fimbrias; remoção das P-fimbrias da célula; e alterações genéticas e fenotípicas, em que a célula deixa de expressar P-fimbria; ou, ainda, que vários destes mecanismos possam ocorrer simultaneamente (Liu *et al.*, 2005). A aderência bacteriana à superfície mucosa é geralmente considerado um pré-requisito para a colonização e infecção (Puupponen-Pimia *et al.*, 2005).

Os alcalóides são os metabolitos mais comuns das plantas (Levin e York, 1978), tendo-se proposto que o mecanismo de acção de cantin-6-um, um alcalóide, consiste na estimulação do sistema enzimático desnaturase (Saleem *et al.* 2010).

A actividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos reside na sua forma não dissociada, uma vez que sendo lipossolúveis têm a capacidade de se difundir através da membrana plasmática dissociando-se no meio intracelular para valores de pH fisiológicos, resultando na libertação de protões no citoplasma (Kashket, 1987 *apud* van Immerseel *et al.*, 2006). Para manter o pH intracelular a célula microbiana activa a bomba de protões com conseqüente gasto de energia. Quando o ATP se esgota ocorre a acidificação do meio intracelular e conseqüentemente a morte do microorganismo (Beals, 2004). Os resultados de Lacombe *et al.* (2010) confirmam que o mecanismo antimicrobiano dos ácidos orgânicos resulta do facto de estes serem ácidos fracos e conseqüentemente não se dissociarem para valores de pH baixos, perdendo o efeito antibacteriano quando valores de pH são próximos de 7. Além disso, a acumulação da forma aniónica dos ácidos orgânicos no meio intracelular pode provocar stress osmótico (van Immerseel *et al.*, 2006).

## 2.7. Mecanismos de resposta e adaptação ao stress

Condições desfavoráveis, como a falta de nutrientes ou a presença de substâncias tóxicas, podem provocar stress aos microorganismos, e conseqüentemente o seu crescimento ser inibido (Wesche *et al.*, 2009). Neste contexto, é preferível em vez de “stress” utilizar o termo “dano” que, por analogia com os organismos superiores, a sua descrição evoca uma imagem de dano físico temporal e reparável (Hurst *et al.* 1974 *apud* Wesche *et al.*, 2009). Por outro lado, o termo “stress” é utilizado para mencionar os agentes e tratamentos que provocam danos (Wesche *et al.*, 2009), podendo estes ser ácidos, bases, péptidos bioactivos com actividade antimicrobiana, oxidantes, pressão osmótica, escassez de nutrientes, sais, temperatura, congelamento e descongelamento, entre outros (Miller *et al.*, 2000 *apud* Wesche *et al.*, 2009; Yousef e Courtney, 2003), podendo resultar em stress físico, químico, ou biológico (Wesche *et al.*, 2009; Yousef e Courtney, 2003).

A adaptação ao stress pode ser entendida como o princípio geral em que um microorganismo que é exposto a concentrações sub-letais de um determinado stress

pode tornar-se resistente quando for posteriormente exposto ao mesmo stress (Hill *et al.*, 2002). A adaptação ao stress pode ser mediada por alterações estruturais ou fisiológicas, nomeadamente alterações metabólicas (Johnson, 2003).

Para tentar ultrapassar situações de stress os microorganismos desenvolvem mecanismos de resposta que variam com o tipo, magnitude, e método de aplicação do stress (Yousef e Courtney, 2003). Esta resposta pode consistir na expressão de factores de virulência, que protegem o microorganismo contra o stress ambiental, e/ou interromper a síntese de produtos desnecessários naquelas condições (Chowdhury *et al.*, 1996), permitindo-lhes assim adaptarem-se constantemente às condições ambientais em permanente mudança (Kim e Gadd, 2008). Estes mecanismos podem ser inatos, tais como a impermeabilidade da membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas, ou as substâncias lipofílicas na parede celular das bactérias Gram-positivas que dificultam a penetração de compostos antimicrobianos hidrofílicos catiónicos ou ainda a ausência de um transportador para estes compostos antimicrobianos (Volk *et al.*, 1996 *apud* Bower e Daeschel, 1999); ou adquiridos, através duma mutação espontânea (pode ocorrer com uma frequência de  $10^{-9}$  ou menos por geração) (Bower e Daeschel, 1999). No entanto, na sua maioria, a resposta aos diferentes stresses resulta na indução de várias proteínas envolvidas na protecção da célula (Yousef e Courtney, 2003).

O stress térmico, que resulta da exposição a elevadas temperaturas, foi dos primeiros a ser exaustivamente estudado (Wesche, 2009), tendo-se verificado que provoca danos nos vários componentes macromoleculares da célula e, conseqüentemente, a principal função das proteínas induzidas pelo stress térmico (heat shock proteins - hsp) é a de reparar ou destruir as macromoléculas danificadas, para que não perturbem o metabolismo celular (Kregel, 2001). Muitas das proteínas induzidas por este stress são chaperonas que auxiliam as proteínas danificadas a recuperar a forma nativa (e.g., GroEL e DnaK), ou são proteases dependentes de ATP que degradam as proteínas danificadas irrecuperáveis (e.g., Lon e ClpAP) (Arsène *et al.*, 2000).

A activação da resposta ao stress indefinido resulta, geralmente, em reduzidas taxas de crescimento ou na entrada em fase estacionária (Hengge-Aronis, 1999 *apud* Yousef e Courtney, 2003). Em *L. monocytogenes* a entrada em fase estacionária torna as células mais resistentes à destruição pelo calor (McMahon *et al.*, 2000), aos stress ácido e oxidativo (Davies *et al.*, 1996), e permite uma maior sobrevivência em condições de

stress osmótico e de escassez de nutrientes (Herbert e Foster, 2001). Os sistemas de resposta ao stress indefinido melhor caracterizados são controlados por factores sigma alternativos,  $\sigma^S$ , em *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas, e  $\sigma^B$  em *B. subtilis* e outras bactérias Gram-positivas (Yousef e Courtney, 2003). De entre os genes induzidos por  $\sigma^S$  e  $\sigma^B$ , encontram-se os que estão envolvidos na reparação do ADN, na importação de solutos compatíveis e o gene da catalase, sugerindo que a célula se prepara para enfrentar stress osmótico ou oxidativo (Hecker e Volker, 1998).

Sob condições de stress osmótico, é essencial para a bactéria manter a turgescência, a pressão e a hidratação. O mecanismo de resposta a condições hiperosmóticas melhor caracterizado envolve a acumulação intracelular de solutos compatíveis, que contrariam a pressão osmótica sem afectar as normais funções celulares, mesmo em elevadas concentrações. A acumulação destes compostos é regulada ao nível da transcrição dos genes ou por modificação directa da actividade enzimática (Bremer e Krämer, 2000 *apud* Yousef e Courtney, 2003). Duché *et al.* (2002) verificaram que em *L. monocytogenes* a resposta ao stress provocado por NaCl é um processo complexo, que envolve a modificação na síntese de proteínas do metabolismo geral (AckA, PdhD e S6) e a expressão de duas proteínas (GbuA e Ctc) directamente relacionadas com a resposta ao stress osmótico. Enquanto que em *S. aureus* se verifica o aumento da regulação do complexo multi-enzimático piruvato desidrogenase (Vilhelmsson e Miller, 2002).

O stress oxidativo caracteriza-se por um excesso de produção ou insuficiente eliminação de agentes oxidantes intracelulares, nomeadamente, os radicais livres como sejam o peróxido de hidrogénio, os radicais hidroxilo e o superóxido, os quais podem danificar proteínas celulares, lípidos e ácidos nucleicos. Muitas das proteínas induzidas pelo stress oxidativo são enzimas que desempenham funções antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (Clements *et al.*, 1999; Valderas e Hart, 2001), responsável por eliminar os aniões superóxido, reduzindo-os a peróxido de hidrogénio (Maruyama *et al.*, 2003), e a catalase (Sanz *et al.*, 2000) que elimina o peróxido de hidrogénio reduzindo-o a água (Maruyama *et al.*, 2003). Outras estão envolvidas na reparação dos danos provocados, principalmente nos ácidos nucleicos (Yousef e Courtney, 2003).

Weber *et al.* (2004) analisaram o perfil proteico de células de *S. aureus* após tratamento com 100 mM peróxido de hidrogénio, por 30 minutos, e quando comparado com o controlo verificaram apenas algumas alterações, entre elas, a modificação de ponto

isoelectrico (pI) das proteínas desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato , alquilhidroperóxido reductase e hidroximetil-glutaril-CoA-sintetase .

As bactérias respondem ao stress ácido de várias formas, incluindo alterações na composição da membrana, de forma a torná-la mais impermeável, tornar o efluxo de protões mais eficiente, nomeadamente através de um aumento do número de bombas de protões e/ou da actividade das existentes, do aumento do catabolismo de aminoácidos, com o consumo de um protão por cada aminoácido descarboxilado, e a indução de enzimas de reparação do ADN (Yousef e Courtney, 2003). Phan-Tham *et al.* (1998) estudaram a resposta e adaptação da *L. monocytogenes* ao stress ácido e verificaram que houve um aumento da expressão de proteínas constitutivas e a produção de novas proteínas. Os mesmos autores sugeriram que a adaptação a pH moderadamente ácido (5.5) e a resistência a valores de pH letais (3.5) requerem um aumento da regulação de proteínas comuns, em que muitas destas devem participar na modificação das estruturas de membrana que regulam o fluxo de protões, com o intuito de manter a homeostasia do pH intracelular.

Os compostos antimicrobianos extraídos das plantas, geralmente, actuam a vários níveis nas células bacterianas, logo, estes compostos não vão induzir respostas específicas por parte das células e, portanto, a resistência a estes compostos poderá dever-se à sua captação reduzida, não-específica, e controlada e a características inatas, já descritas anteriormente (Russell *et al.*, 1997). Sabe-se, por exemplo, que o *S. aureus* tem transportadores de membrana que lhe permitem bombear para o exterior da célula compostos antimicrobianos, ainda antes destes chegarem a identificar o alvo intracelular a atingir (Russell e Day, 1996 *apud* Bower e Daeschel, 1999). Tem-se especulado que o mecanismo de resistência em *Bacillus* spp. a vários compostos com actividade antimicrobiana reside na sua capacidade de sintetizar enzimas que degradam estes compostos (Hansen, 1994 *apud* Bower e Daeschel, 1999).

## 2.8. Proteómica

O termo “proteómica” surgiu em 1995 e foi definido como a caracterização em larga-escala do complemento proteico de uma linha celular, tecido ou organismo (Anderson e Anderson, 1996). Hoje em dia existem duas definições que podem ser aplicadas à proteómica, uma mais clássica que restringe a análise em larga escala a produtos de

genes e estudos que envolvam apenas proteínas, e outra, mais inclusiva, que combina o estudo de proteínas com a análise genética e genómica. No entanto, o objectivo da proteómica permanece o mesmo, i.e., obter uma visão global e integrada da biologia, estudando todas as proteínas de uma célula (Graves e Haystead, 2002).

A proteómica desempenha um papel muito importante na era pós-genómica, pois não sendo uma novidade em termos de fundamentos experimentais, desenvolveu-se bastante com os avanços no sequenciamento dos genomas, da bioinformática e no desenvolvimento de técnicas analíticas reprodutíveis, robustas, sensíveis e fidedignas (Monteoliva e Albar, 2004). Um estudo típico de proteómica, como o perfil de expressão de proteínas, pode ser dividido em três etapas: i) separação e isolamento das proteínas de uma linha celular, tecido ou organismo; ii) aquisição da informação estrutural das proteínas; e iii) comparação com bases de dados para a sua identificação e caracterização (Graves e Haystead, 2002).

### 2.8.1. Electroforese bi-dimensional

A electroforese bi-dimensional (*two dimensional electrophoresis* – 2-DE) é uma técnica muito utilizada na análise de misturas complexas de proteínas, enzimas e hormonas extraídas de células, tecidos, ou outras amostras biológicas, com o intuito de investigar a sua influência química, física e biológica (Westermeier, 2005). Esta técnica consiste na separação de proteínas, em gel de poliacrilamida, de acordo com duas propriedades independentes, a focalização isoelectrica (IEF), que separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoelectrico (pI), e posteriormente, segundo o seu peso molecular, resultando na formação de *spots* (manchas), que correspondem às diferentes proteínas presentes na amostra (Berkelman e Stensted, 1998). Posteriormente, os *spots* seleccionados podem ser identificados por métodos tradicionais como imuno detecção, pela análise da composição dos aminoácidos e pela análise da sequência N-terminal, ou por métodos mais actuais, tais como espectrometria de massa, *peptide mass fingerprinting* e por caracterização da proteína com base na técnica de espectrometria de massa (Westermeier, 2005).

### 2.8.2. Preparação da amostra

O tratamento da amostra é um passo chave para se obter resultados razoáveis, e todos os procedimentos para a sua preparação devem ser feitos de forma a evitar a alteração química das proteínas (O'Farrel, 1975; Westermeier, 2005). O procedimento ótimo deve ser determinado empiricamente para cada amostra, mas, idealmente, deverá resultar na completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas presentes na amostra, de forma a garantir que cada *spot* representa um único polipéptido (Berkelman and Stenstedt, 1998; Görg, 2007).

Existem vários protocolos para a preparação da amostra, no entanto, estes têm de ser adaptados e otimizados consoante o tipo de amostra a ser analisada. Os passos fundamentais para a preparação da amostra são: i) a lise celular, ii) remoção ou inactivação de substâncias interferentes e iii) solubilização das proteínas presentes na amostra (Görg, 2007).

A lise celular pode ser realizada de forma química (lise osmótica, por detergentes ou enzimática) ou mecânica (congelamento-descongelamento repetidos, sonicação, *french pressure*, moagem com almofariz e pilão ou homogenização com esferas de vidro), sempre a baixas temperaturas. Estes métodos de lise podem ser aplicados individualmente ou em conjunto e, apesar de todos terem prós e contras, a sua escolha deve depender primeiramente do tipo de amostra (Berkelman e Stenstedt, 1998; Görg, 2007). Para células que contém parede celular, a lise enzimática poderá não ser suficiente, de forma que deve ser utilizado um método mais vigoroso, quer seja por agitação vigorosa com esferas de vidro, sonicação em gelo com tampão de lise, ou por aquecimento da amostra com SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) (Görg, 2007).

São vários os compostos que podem provocar interferência durante a separação das proteínas, de entre estes encontram-se i) proteases, que podem ser libertas aquando da lise celular e provocar a degradação de proteínas, no entanto, isto pode ser evitado utilizando inibidores de proteases, tais como PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*) ou AEBSF (*4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*); ii) sais, que podem interferir com a corrida electroforética, provocando a precipitação das proteínas e aumentando o tempo de isofocalização, a sua remoção pode ser efectuada através de diálise ou precipitação com acetona ou TCA (*Trichloroacetic acid*); iii) lípidos, que

podem interagir com proteínas de membrana alterando a solubilidade da amostra e afectar a separação tanto ao nível do pI como do peso molecular. A extracção com solventes orgânicos, ultracentrifugação ou precipitação com acetona podem ajudar a remover os lípidos presentes na amostra; iv) polissacáridos e ácidos nucleicos, ambos podem aumentar a viscosidade da amostra podendo colmatar os poros do gel e interagir com as proteínas retardando ou até mesmo impedindo a isofocalização ou provocar distorções na imagem do gel da segunda dimensão. Um método muito comum para a eliminação dos polissacáridos e ácidos nucleicos da amostra é através da precipitação com TCA/acetona, no entanto, a proteína pode ter dificuldade em resolubilizar. Outra forma de eliminar os ácidos nucleicos é através de digestão com RNAses e DNAses livres de proteases ou ainda por ultracentrifugação; e finalmente v) fenóis, presentes principalmente nas plantas, podem interagir e provocar alterações nas proteínas através de reacções catalizadas por enzimas e provocar distorções no gel da segunda dimensão. Os fenóis podem ser removidos por diferentes técnicas de precipitação (Berkelman e Stenstedt, 1998; Görg, 2007) como, por exemplo, com TCA 10% em acetona (Nagaraj *et al.*, 2007), com PVPP 2% (polivinilpolipirrolidona) no tampão de lise (Berkelman e Stenstedt, 1998; Nagaraj *et al.*, 2007), ou ainda através de extracção com fenol (Berkelman, 2008).

### 2.8.3. Focalização isoeléctrica

A focalização isoeléctrica ou isofocalização consiste num método electroforético que separa as proteínas de acordo com o seu pI. A amostra é aplicada numa fita de gel de poliacrilamida que contém um gradiente de pH, as chamadas fitas de IPG (*immobilized pH gradient*), posteriormente, é aplicado um campo eléctrico que vai forçar as proteínas a migrar até atingirem a posição em que a sua carga eléctrica é nula, i.e., o seu pI (Berkelman e Stenstedt, 1998; Westermeier, 2005; Reddy *et al.*, 2009).

De forma a se obter uma boa isofocalização é necessário que as proteínas da amostra estejam completamente desagregadas e solubilizadas. Para tal, utiliza-se geralmente o tampão de lise de O'Farrell (ureia 9 M, CHAPS (3-(3-cholamidopropyl)dimenthylammonio-1-propane sulfonate) 2-4% (p/v), DTT (*Dithiothreitol*) 1% (p/v), e anfólitos 2% (v/v)), ou um tampão com base neste mas com determinadas modificações, pois nem todas as classes de proteínas se conseguem

solubilizar neste tampão, principalmente as proteínas mais hidrofóbicas. A ureia e/ou tiureia, podem ser utilizadas em separado ou em conjunto, com o objetivo de desnaturar e solubilizar as proteínas. O CHAPS, NP-40 (*nonyl phenoxypolyethoxylethanol*) e Triton X-100, são detergentes zwitteriônicos com a capacidade de solubilizar a amostra, e de prevenir a sua agregação através de interações hidrofóbicas. O DTT, DTE (*Dithioerythritol*) e TBP (*Tributylphosphine*) são agentes redutores, utilizados para quebrar as ligações dissulfeto e manter as proteínas no seu estado reduzido, i.e., impedir a sua re-oxidação. E os anfólitos são utilizados para solubilizar a amostra, actuando sobre as interações entre cargas, evitando a agregação das proteínas (Berkelman e Stenstedt, 1998; Westermeier, 2005; Görg, 2007).

#### 2.8.4. Segunda dimensão

A segunda dimensão é feita em géis de poliacrilamida, de maiores dimensões, contendo SDS, método também conhecido por SDS-PAGE. É um método electroforético utilizado para a separação de polipéptidos de acordo com o seu peso molecular (Berkelman e Stenstedt, 1998; Westermeier, 2005).

Após a isofocalização as fitas IPG, contendo as proteínas separadas pelo seu pI, têm de ser equilibradas em tampão de SDS, uma vez que os grupos carboxílicos da fita IPG captam cargas e podem provocar efeitos de electroendosse (Westermeier, 2005). O tampão de equilibração é geralmente constituído por 50 mM de Tris-HCl pH 8.8, que permite manter o pH das fitas; a ureia, a 6 M, juntamente com glicerol, a 30% (v/v), tornam o tampão mais viscoso e reduzem os efeitos de electroendosse; o SDS a 2% (p/v) desnatura as proteínas e forma complexos proteína-SDS com carga negativa. A quantidade de SDS que se liga à proteína, e portanto, a carga negativa adicional é directamente proporcional à massa da proteína. Assim, a electroforese de proteínas em gel poroso na presença de SDS separa as proteínas com base na sua massa molecular; o azul de bromofenol, permite a monitorização da electroforese; o DTT preserva o estado reduzido das proteínas; e a IAA (iodoacetamida) alquila os grupos tiol, impedindo a reoxidação das proteínas durante a electroforese (Berkelman e Stenstedt, 1998).

### 2.8.5. Visualização dos *spots*

A selecção do método de visualização dos *spots* é extremamente importante, uma vez que a proteómica mede as alterações quantitativas ao nível de expressão. Idealmente, a técnica de detecção deve ter uma ampla dinâmica linear, deve ser sensível, quantitativa, compatível com outras técnicas que utilizam a espectrometria de massa, deve ser rápida, não-tóxica e de custo razoável (Westermeier e Marouga, 2005). No entanto, até à data, não existe um método que combine todas estas características pelo que se torna necessário seleccionar o método que melhor se adapte ao tipo da amostra. De entre os vários métodos de detecção, os mais utilizados são a coloração com azul de Coomassie e a coloração com prata (Tissot *et al.*, 2000; Monteoliva e Albar, 2004).

A coloração com azul de Coomassie foi introduzida por Fazekas de St. Groth e consiste num método de fácil realização, de baixo custo, compatível com espectrometria de massa, no entanto, com pouca sensibilidade e baixa dinâmica linear. Este corante aniónico pode ser utilizado sob duas modificações: Coomassie R-250 ou G-250 que em condições ácidas vão ligar-se aos grupos amina das proteínas por interacções electrostáticas e hidrofóbicas. Existem vários protocolos para este tipo de coloração, sendo que aquele que utiliza o G-250 demonstra melhor reproducibilidade e pode atingir elevada sensibilidade quando aplicado durante longos períodos de tempo ou de forma repetida (Westermeier e Marouga, 2005).

A coloração com prata, introduzida por Merrill em 1979 (Westermeier e Marouga, 2005), é a técnica mais utilizada, pois tem a capacidade de detectar até um nanograma, no entanto, a sua gama dinâmica é restrita a uma única ordem de escala de magnitude, para além disso não é um método quantitativo, uma vez que as diferentes proteínas tendem a interagir de forma diferente com os iões de prata (Tissot *et al.*, 2000; Monteoliva e Albar, 2004, Westermeier e Marouga, 2005). Basicamente, a detecção de proteínas depende da ligação dos iões de prata às cadeias de aminoácidos, primeiramente aos grupos sulfidrilo e carboxilo, seguido por redução. As proteínas são visualizadas como pontos onde ocorre a redução e, como resultado, a imagem da distribuição da proteína no gel é baseada na diferença de potencial de oxidação-redução entre a área do gel ocupado pela proteínas e os locais livres adjacentes (Gromova e Celis, 2006; Miller *et al.*, 2006). São vários os protocolos que podem ser utilizados para

a coloração com prata, e aqueles que se apresentam mais rápidos são, geralmente, menos sensíveis e reprodutíveis que os mais morosos (Tissot *et al.*, 2000).

### 2.8.6. Análise dos perfis proteicos

Após a separação e visualização dos *spots* segue-se a análise bioinformática para detectar as diferenças na expressão das proteínas (Monteoliva e Albar, 2004). Esta análise apresenta-se como uma parte essencial no estudo da proteómica (Wojcik e Schachter, 2000), de tal forma que em muitos casos se pode tornar mais morosa que a optimização da própria experiência (Vihinen, 2001; Monteoliva e Albar, 2004).

Na prática, procuram-se as proteínas que sofreram uma maior ou menor expressão, resultado da aplicação de um estímulo às células, por exemplo, através de tratamentos farmacológicos, eliminação de nutrientes, ou por estimulação física ou química (Westermeier, 2005). O grande desafio da proteómica consiste em encontrar proteínas alvo com elevada significância, no entanto, nem todas as proteínas podem ser analisadas, nomeadamente as proteínas muito básicas (pI maior que 11) que não são fáceis de analisar por 2-DE; também as proteínas hidrofóbicas e de elevado peso molecular (> 200 KDa) resistem a entrar no gel 2-DE. Noutros casos, as proteínas são expressas em tão baixo número de cópias, na sua maioria proteínas regulatórias, que os métodos de detecção não as conseguem identificar devido à sua baixa sensibilidade (Westermeier, 2005).

Esta análise é, geralmente, efectuada através de programas informáticos, como *PDQuest* (BioRad), *Progenesis* (Nonlinear Dynamics), *Image Master 2D Platinum* and *Melanie Software* (Amersham Biosciences), entre outros, em que é possível processar a imagem do gel 2-DE, aumentando o contraste ou diminuindo o *background*, para posterior detecção e comparação da quantidade e qualidade das proteínas expressas (Vihinen, 2001; Monteoliva e Albar, 2004). A análise manual da imagem constitui um forte estrangulamento em todo o processo e representa uma fonte adicional de variação. Os principais passos são a detecção dos *spots*, normalização e correspondência de *spots* entre diferentes géis, e finalmente a comparação quantitativa dos volumes dos *spots*. A significância das alterações na expressão das proteínas em diferentes géis, e o nível dos rácios medidos são verificados por análise estatística, que são geralmente fornecidos com o software (Westermeier e Marouga, 2005). São várias as bases de dados

disponíveis, como por exemplo ExPASy do Instituto de Bioinformática Sueco, para comparar *spots*, pesquisar a sua função, perfil da expressão e localização de determinadas proteínas através de imagens de géis 2-DE de diferentes origens, podendo-se, assim, identificar vias de resposta proteica, vias metabólicas, entre outras, e ainda, permite a validação dos resultados (Vihinen, 2001).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Caracterização de *Vaccinium cylindraceum*

O *Vaccinium cylindraceum* é uma planta endémica dos Açores, onde é conhecida como uva-da-serra ou uva-do-mato. O género é constituído por cerca de 450 espécies, sendo originário da Europa e da América do Norte, onde são largamente cultivados e utilizados na alimentação humana e de um sem número de espécies animais (Anjos e Silva *et al.*, 2008).

Caracteriza-se por ser um arbusto, de folha caduca; as suas flores revelam-se no mês de Junho, em cachos de 10-12 flores, cor-de-rosa a quase branco (Sjörgren, 2000); e os seus frutos, do tipo baga, são de cor violeta-profundo. Os frutos deste género possuem um valor significativo no mercado, nomeadamente no mercado Norte-Americano, devido, não só, ao seu sabor mas também devido às suas propriedades medicinais (Anjos e Silva *et al.*, 2008). São frutos ricos em água, sacarose (Skupien, 2006), vitaminas A e C, potássio e ácido fólico, antocianinas (pigmentos pertencentes ao grupo dos bioflavonóides, responsáveis pela cor do fruto) e proantocianidinas, flavonóis, e têm baixo conteúdo em gorduras e sódio (US Highbush Blueberry Council, 2005). Sendo que, muitas vezes, este tipo de fruto é transformado em sumos e concentrados, e outros tipos de alimentos processados.

#### 3.2. Caracterização das amostras de *V. cylindraceum*

As amostras de *V. cylindraceum* (Figura 1 A e B) consistiram em bagas maduras de cor violeta profundo a quase preto (Figura 2), em estado selvagem, colhidas no final do mês de Setembro de 2010, na localidade Furnas do Enxofre da ilha Terceira. As amostras foram transportadas para o laboratório onde foram seleccionadas apenas aquelas que aparentavam estar isentas de doenças, e armazenadas a -80°C, até à sua utilização.

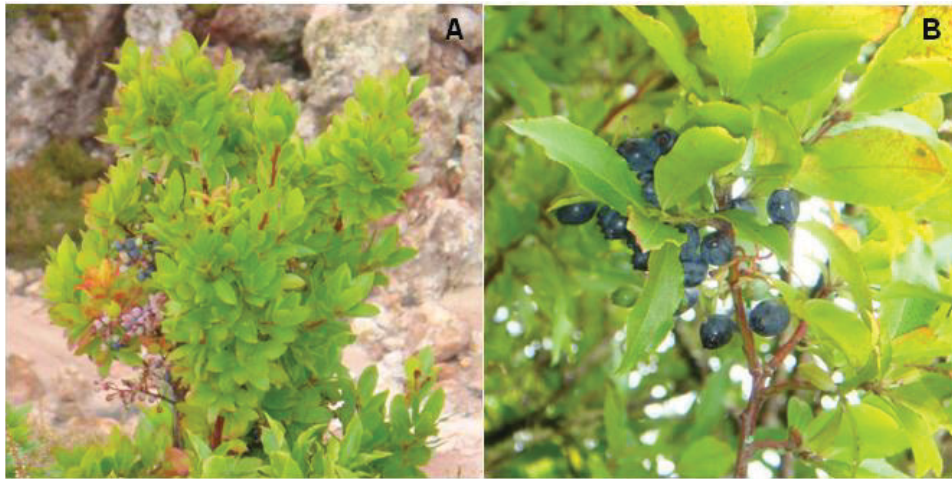


Figura 3.1. A planta *V. cylindraceum* com seus frutos, do tipo baga, colhidos na localidade Furnas do Enxofre no mês de Setembro de 2010.



Figura 3.2. Frutos maduros de *V. cylindraceum*, colhidos no sítio Furnas do Enxofre no mês de Setembro de 2010.

### 3.3. Preparação do extracto aquoso de frutos de *V. cylindraceum*

O extracto aquoso de *V. cylindraceum* foi preparado na proporção de 1 g de bagas para 1 mL de dH<sub>2</sub>O. As bagas, congeladas a -80°C, foram trituradas no moinho *MM 200* (Retsch, Europa) (Figura 3.3), com a ajuda de esferas de aço inox com 1 cm de diâmetro, a 30 Hz por segundo, durante 45 segundos. Posteriormente, às bagas trituradas, adicionou-se o respectivo volume de água destilada a 4°C. Misturaram-se, brevemente as fases, centrifugou-se a 14 000 rpm por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi filtrado com membranas *Minisart High-Flow* de poro 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). O extracto assim esterilizado foi armazenado a -80°C, até à sua utilização. Aquando da sua utilização, este extracto apresentava pH igual a 2.92.



Figura 3.3: Moinho MM 200 (Retsch, Europa), utilizado na preparação do extracto aquoso de *V. cylindraceum*.

### 3.4. Estirpes bacterianas e condições de crescimento

No presente trabalho utilizaram-se duas estirpes comerciais uma de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e outra de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (MicroBiologics, Medimark Europe). As culturas liofilizadas foram preparadas segundo instruções do fabricante, crescidas em meio BHI e mantidas em água peptonada com glicerol a 30% (v/v), a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até à sua utilização. As culturas foram crescidas em Caldo Nutritivo suplementado com 5 g/L de glucose (CNsupl.), pH 7.4, a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas (*overnight*), permitindo às bactérias recuperarem de eventuais danos e stresses provocados pelo congelamento e descongelamento. Após o que foram re-inoculadas a 2% (v/v), e crescidas durante 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  até atingirem uma  $\text{OD}_{595}$  de 0.5, correspondendo a meio da fase exponencial. As células assim obtidas constituem os inóculo para as diferentes condições de crescimento e/ou diferentes tratamentos a serem analisados.

### 3.5. Actividade antibacteriana

A actividade antibacteriana foi testada em diferentes concentrações (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 mg/mL) de extracto de *V. cylindraceum*, sobre as culturas *S. aureus* e *L. monocytogenes*, inoculadas a 2 % (v/v), em CNsupl., pH 7.4. A monitorização do crescimento de cada uma das culturas foi feita em quadruplicado (em placa de 24 poços Greiner bio-one, Alemanha), através da leitura da densidade óptica a 595 nm ( $\text{OD}_{595}$ ) num espectrofotómetro *Infinite F200 Pro* (Tecan, Áustria), durante 24 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Após se ter escolhido as concentrações a que se iriam pré-adaptar as células a extracto de *V. cylindraceum* e a concentração a que se iriam stressar as células, fomos testar a viabilidade das culturas tanto de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, através do método de diluição em tampão fosfato (PBS) e posterior espalhamento em meio sólido (CNSupl. + 13 g/L de Pastagar), pH 7.4. As diluições foram feitas de forma a se obter, no máximo, 300 colónias por cada placa. As colónias formadas foram contadas após incubação a 37°C durante 24 horas.

### 3.6. Condições de Stress

As culturas, tanto de *L. monocytogenes* como de *S. aureus* recolhidas a meio da fase exponencial foram diluídas 50 vezes em meio fresco ou em meio adicionado de 60 mg/mL de extracto e crescidas a 37°C durante 4h para o *S. aureus* e 4h30 m para a *L. monocytogenes*, no meio sem adição de extracto, enquanto que na presença deste ambas as culturas cresceram durante 10h. As células crescidas na ausência de extracto foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos a 20°C e ressuspendidas em meio CNSupl., pH 7.4 adicionado de 160 mg/mL de extracto e incubadas durante 1 h a 37°C. No fim de cada tratamento as células foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos a 20°C e lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio (50 mM), pH 7.4, à temperatura ambiente. Este passo serviu para retirar grande parte das substâncias provenientes do meio e do extracto das bagas e que podem interferir nas fases posteriores.

### 3.7. Análise proteómica

#### 3.7.1. Extracção e preparação de proteínas citoplasmáticas

As células lavadas foram transferidas para microtubos de 2 mL aos quais se adicionou 100 µL de tampão constituído por ureia 9.5 M, CHAPS 4.5% (p/v) e PMSF 1 mM ou Tris-HCl 10 mM, pH. 7 e PMSF 1 mM, e 0.5 g/tubo de esferas de zircónia (0.01 mm, Biospec), optando-se, assim, por efectuar a lise mecânica. Colocaram-se os tubos em gelo, cerca de 30 segundos, retirou-se e efectuou-se a lise mecânica no moinho *MM 200* (Retsch, Europa), seis vezes a 30 Hz, durante 30 segundos, com intervalos de 30 segundos em gelo. Para separar as proteínas de células e de partículas resultantes da lise,

centrifugou-se a 13 200 rpm durante 20 minutos a 4°C, e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo. Armazenou-se a -80°C, em aliquotas de 20 µL, até à sua utilização.

### 3.7.2. Determinação da concentração de proteína

As proteínas das células controlo, ou seja, crescidas na ausência de extracto e que não foram sujeitas a stress na presença de extracto foram quantificadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA), através do *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma-Aldrich, USA) procedendo de acordo com as instruções do fabricante. Para todas as outras proteínas que estiveram em contacto com extracto de bagas, devido à sua cor azul/arroxada introduziam grande interferência na quantificação pelo método de BCA, pelo que estas foram quantificadas pelo método SDS-PAGE.

### 3.7.3. SDS-PAGE

As amostras de proteína foram diluídas em igual volume de tampão contendo Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), DTT 200 mM, azul de bromofenol 0,02% (p/v) e incubadas a 85°C durante 5 minutos. De seguida foram corridas num gel de acrilamida/bisacrilamida (30% T e 2.67% C) em sistema vertical (BioRad). O gel consistiu em gel de separação a 12 % (SDS 0,1% (p/v) e Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) e gel de concentração a 5% (SDS 0,1% (p/v) e Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8). Correu-se simultaneamente um marcador de peso molecular 11-245 kDa (Enzytech). A corrida electroforética foi feita os primeiros 10 minutos a 400 mA, 100 V e durante 60 minutos a 120 V. Para a detecção das bandas utilizou-se uma solução de azul de Coomassie coloidal em metanol 45% (v/v) e de ácido acético a 10% (v/v), deixou-se corar *overnight*. Lavaram-se os géis com água ou solução de descoloração constituída por metanol 50% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v), várias vezes até se obter o resultado pretendido. A aquisição da imagem foi realizada em *Hp Scanjet 7400c* e o tratamento da mesma em *Adobe Photoshop*, enquanto que a análise dos géis para quantificação da proteína total foi feita com a ajuda do programa *Quantity one* (Bio Rad).

### 3.7.4. Electroforese bi-dimensional

A electroforese bi-dimensional foi feita de acordo com os princípios de O'Farrell (1975), com algumas modificações. Ambos os processos de separação foram efectuados no sistema de electroforese *Multiphor II Electrophoresis System*, em conjunto com a fonte de alimentação *Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL* e o sistema de refrigeração *MultiTempIII* (Figura 3.4) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia).



Figura 3.4: Sistema de electroforese horizontal, fonte de alimentação e sistema de refrigeração (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) utilizado para a electroforese bi-dimensional.

#### 3.7.4.1. Focalização isoelectrica

Iguais quantidades de proteína (30 e 50  $\mu\text{g}$ ) foram separadas por focalização isoelectrica em géis com ponto isoelectricos (pI) entre 4 e 7, tendo-se utilizado fitas *Immobiline DryStrip pH 4-7*, de 11 cm (*GE Healthcare, Uppsala, Suécia, Uppsala, Suécia, Suécia*), as quais foram passivamente hidratadas, *overnight*, em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de rehidratação constituído por ureia 8 M, CHAPS 2% (p/v), anfólitos IPG pH4-7 2% (v/v), azul bromofenol 0,002 % (p/v), glicerol 10% (v/v) e DTT 0,2% (p/v), sendo o último adicionado imediatamente antes da aplicação do tampão.

Para se obter uma boa focalização é necessário que a amostra esteja completamente desagregada e solubilizada. Nesse sentido, diluiu-se a amostra, num volume total de 100  $\mu\text{L}$ , em tampão constituído por ureia a 9,8 M, CHAPS 4,5% (p/v), azul bromofenol 0,002% (p/v), DTT 600 mM e anfólitos IPG 4-7 4% (v/v). Permitiu-se que as amostras

solubilizassem durante uma hora à temperatura ambiente, antes da sua aplicação. Com o intuito de melhorar a separação das proteínas, aplicaram-se baixas voltagens no início da separação (150 V durante 30 min., 300 V durante 8 h, 800 V durante 2 h), para posteriormente, se aplicar a voltagem máxima de 3500 V até se atingir o estado estacionário, i.e. o ponto isoeléctrico de todas as proteínas presentes na amostra: aproximadamente 70.35 KVh. As fitas isofocalizadas foram guardadas em placas de Petri de plástico de 14 cm de diâmetro e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até à sua utilização.

#### 3.7.4.2. Segunda dimensão

Antes da separação, na segunda dimensão, é necessário equilibrar as fitas para que as proteínas já separadas possam interagir com o SDS e facilitar a transferência das proteínas da fita para o gel da segunda dimensão. Esta foi feita em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.8, ureia 6 M, glicerol 30 % (v/v), SDS 2 % (p/v) e azul bromofenol 0,002 % (p/v). Adicionou-se 100 mg de DTT a 10 mL de tampão e equilibrou-se cada fita durante 30 minutos com agitação (120 rpm), de seguida, transferiu-se cada fita para novo tampão ao qual se adicionou 250 mg de IAA e equilibrou-se cada uma durante 30 minutos com agitação (80 rpm).

A segunda dimensão foi corrida em geis *ExcelGel XL SDS 12-14* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia, Uppsala, Suécia) em modo de gradiente a 400 V durante 5 h ou até o azul de bromofenol chegar ao anodo. Após 30 minutos de separação retiraram-se as fitas e os papéis de filtro que continham os marcadores de peso molecular (*Molecular Weight Calibration Kit* da GE Healthcare, Uppsala, Suécia, Uppsala, Suécia) e que serviam para absorver a humidade produzida pelas fitas durante a separação. Nesta fase reajustou-se o eléctrodo negativo para o local onde estavam posicionadas as fitas IPG.

#### 3.7.4.3. Visualização dos spots

A visualização dos spots foi feita através da coloração com prata, que consistiu em fixação com etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) durante 1 h, seguida de várias lavagens com  $\text{dH}_2\text{O}$  *overnight*; a sensibilização foi feita com tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v) durante 1 minuto, seguida de três lavagens de 20 segundos com  $\text{dH}_2\text{O}$ ; incubou-se em nitrato de prata 0,1% (p/v) com formaldeído (35 %) 0,02% (v/v) durante 20 minutos, seguido de três lavagens de 20 segundos com  $\text{dH}_2\text{O}$ ; transferiram-se os geis para um

novo recipiente e lavou-se em dH<sub>2</sub>O durante 1 minuto; a revelação foi feita com carbonato de sódio 3% (p/v) e formaldeído (35%) 0,05% (v/v) até se conseguir visualizar todos os *spots*, seguido de lavagem com dH<sub>2</sub>O; e terminou-se a reacção com ácido acético a 5% (v/v) durante 5 minutos.

#### 3.7.4.4. Análise dos perfis proteicos

A aquisição da imagem dos géis foi feita em *Hp Scanjet 7400c* e o tratamento da imagem em *Adobe Photoshop*. A análise informática dos géis foi feita com a ajuda do programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (*GE Healthcare, Uppsala, Suécia, Uppsala, Suécia, Uppsala, Suécia*).

Utilizou-se a base de dados *Swiss 2DPAGE* para pesquisar perfis proteicos de *S. aureus* para identificar as proteínas expressas nos diferentes tratamentos estudados no trabalho por comparação (através do programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*) com as mesmas proteínas presentes nesses géis. Utilizou-se o número de acesso ao *NCBI* (que estava disponível no perfil encontrado na base de dados *Swiss 2DPAGE*) das proteínas identificadas, e pesquisou-se nesta base de dados (*NCBI*) a sequência de cada uma destas proteínas no formato FASTA (sequência de aminoácidos). Através desta sequência foi possível obter informação sobre a função e estrutura das diferentes proteínas por consulta da base de dados *SMART* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

## 4. Resultados

### 4.1. Actividade antibacteriana

A actividade antibacteriana do extracto de *V. cylindraceum* em relação a *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, foi analisada através do seu efeito na taxa de crescimento das respectivas estirpes tendo-se verificado que o extracto de *V. cylindraceum* apresenta actividade antibacteriana em relação tanto a *S. aureus* e *L. monocytogenes* (figura 4.1.).

O *S. aureus* revelou-se mais susceptível, apresentando uma diminuição da taxa de crescimento de, aproximadamente, 8 vezes com apenas 20 mg/mL de extracto, enquanto que para a *L. monocytogenes* este decréscimo foi apenas de 3 vezes. No entanto, para todas as outras concentrações testadas o efeito foi muito semelhante para ambas as bactérias testadas, apesar de que para *S. aureus* o crescimento é praticamente inibido a 80 mg/mL de extracto de *V. cylindraceum*, enquanto que para a *L. monocytogenes* isto só se verifica para 100 mg/mL de extracto.

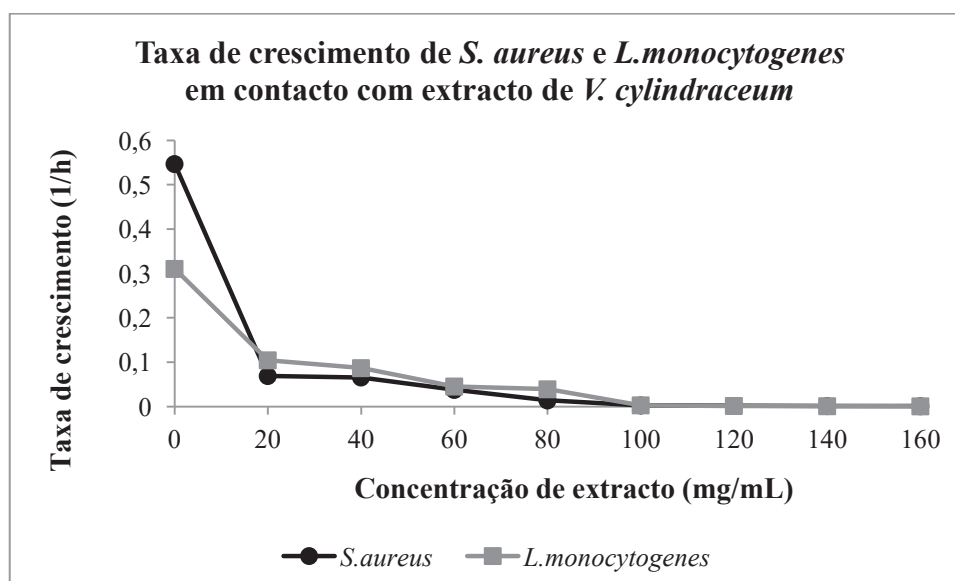


Figura 4.1. Taxa de crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* crescidos na presença de concentrações crescentes de extracto aquoso de *V. cylindraceum*.

Para uma análise comparativa entre as duas espécies de bactérias, optou-se por utilizar o mesmo tratamento para ambas. Assim, para o tratamento “adaptadas” optámos por crescer as culturas na presença de 60 mg/ml de extracto, uma vez que é menor do que

80 mg/mL, para a qual o *S. aureus* apresentou uma taxa de crescimento quase nula. Para sujeitar as células a uma situação de stress optou-se por utilizar uma concentração de extracto de 160 mg/mL de extracto de *V. cylindraceum*, por ser o dobro da concentração anterior àquela em que deixa de haver crescimento, neste caso 80 mg/mL.

Uma vez que o extracto aquoso de *V. cylindraceum* apresentava pH ácido de 2.92, decidiu-se fazer a leitura do pH no início e no fim de cada tratamento, assim, no tratamento controlo o pH inicial era de 7.39 para o *S. aureus* e 7.37 para a *L.monocytogenes*, o pH final diminui para 5.49 e 6.02 para o *S. aureus* e para a *L. monocytogenes*, respectivamente; no tratamento stress o pH inicial era 4.26 para ambas as culturas e no fim do tratamento era 4.17 para o *S. aureus* e 4.22 para a *L.monocytogenes*; enquanto que, no tratamento adaptadas o pH inicial era 5.16 e 5.38 e o final 5.39 e 5.0 para o *S. aureus* e *L.monocytogenes*, respectivamente.

#### 4.2. Avaliação do estado fisiológico das células

De forma a garantir que as células tanto de *S. aureus* como de *L. monocytogenes* mantinham a viabilidade durante o processo de adaptação ao extracto de bagas de *V. cylindraceum*, recolheram-se amostras ao longo do tempo de crescimento de ambas as culturas em meio líquido na ausência e na presença de 60 mg/ml de extracto e plaqueou-se em meio CNSupl., pH 7.4, e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Verificou-se que a partir da hora 10 a cultura de *S. aureus* começou a perder viabilidade (figura 4.2A) pelo que se determinou as 10 horas como o tempo para o crescimento das culturas na presença de extracto.

A questão da manutenção da viabilidade das células tanto de *S. aureus* como de *L. monocytogenes* tornou-se ainda mais pertinente quando estas foram sujeitas a 160 mg/mL de extracto, no entanto, verificou-se que para ambas as culturas as células mantiveram-se viáveis durante 5 horas (figura 4.2B). Nos tratamentos subsequentes as células foram expostas a 160 mg/mL durante apenas 1 hora, para haver tempo de as células responderem ao tratamento, mas sem que elas se consigam adaptar.

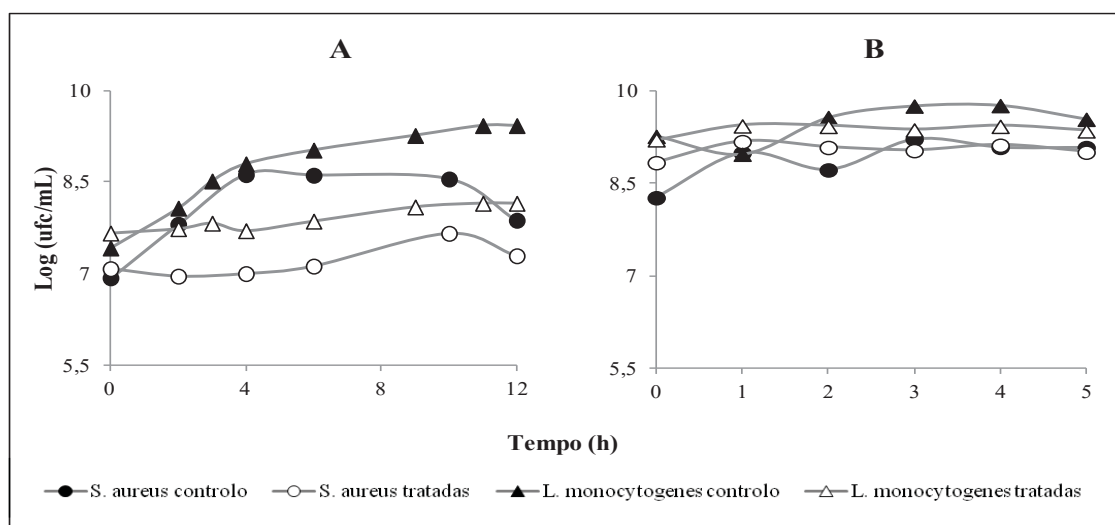


Figura 4.2: Contagens de Unidades Formadoras de Colônias de *S. aureus* e *L. monocytogenes* de células que não estiveram expostas a extracto (“controle”) e que foram expostas a 60 mg/mL (tratamento “adaptadas” (A)) e a 160 mg/mL de extracto de *V. cylindraceum* (tratamento “stressadas” (B)).

Por observação ao microscópio óptico de preparações de células dos diferentes tratamentos através do método de coloração de Gram observou-se que as células que tinham sido crescidas na presença de extracto eram bastante maiores que as células controle, especialmente em *S. aureus* (figura 4.3C), o que sugere que o extracto poderá provocar stress osmótico, a plasmólise das células. Além da questão do tamanho das células verificou-se que nestas preparações algumas células apareciam coradas de cor-de-rosa em vez de coradas do azul-escuro típico das bactérias Gram-positivas como sejam o *S. aureus* e a *L. monocytogenes* (figura 4.4C). Inicialmente pensou-se que se tratava de uma contaminação por bactérias Gram-negativas, apesar de ser uma grande coincidência acontecer em ambas as culturas simultaneamente, e no caso da de *S. aureus* ser uma contaminação por cocos e na de *L. monocytogenes* ser por bacilos. No entanto, exclui-se a possibilidade de contaminação após várias repicagens em meio selectivo, o que sugere que esta alteração fenotípica das culturas é uma consequência do crescimento na presença de *V. cylindraceum*.

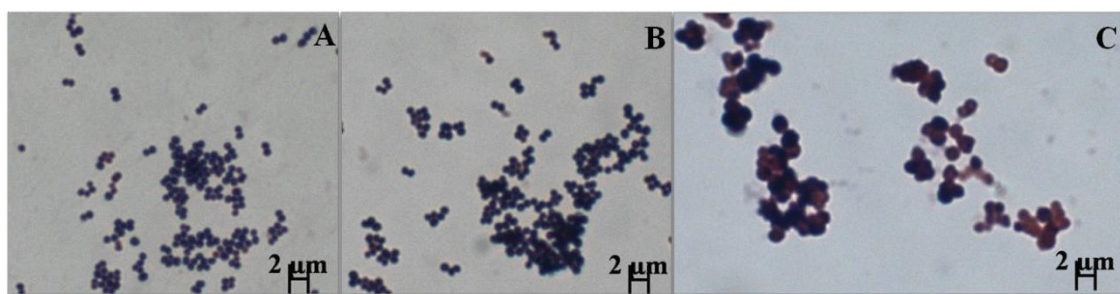


Figura 4.3: Coloração de Gram de *S. aureus* ATCC 29213 após os tratamentos A) “controlo”, B) “stress” e C) “adaptadas” (ampliação 1000x).

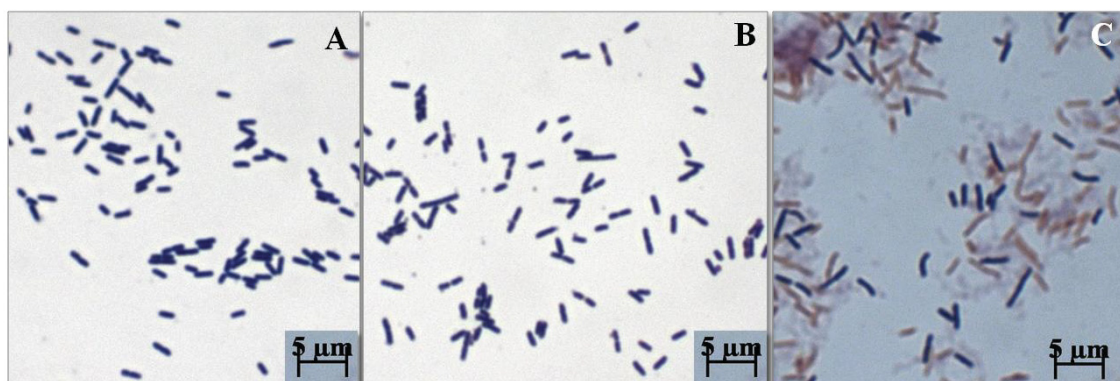


Figura 4.4: Coloração de Gram de *L. monocytogenes* ATCC 19115 após os tratamentos A) “controlo”, B) “stress” e C) “adaptadas” (ampliação 1000x).

### 4.3. Processo de optimização da análise proteómica

A proteómica é uma excelente ferramenta experimental para visualizar alterações no perfil da síntese proteica de células vivas (Hecker *et al.*, 2003). A qualidade do perfil proteico obtido na 2-DE depende, entre outros aspectos, da eficácia da solubilização das proteínas da amostra, da rehidratação das fitas IPG, do método de aplicação da amostra, da quantidade de amostra aplicada, e das condições de electroforese (Leimgruber, 2005).

#### 4.3.1. Quantificação de proteína

A quantificação de proteína pelo método do BCA deu valores anormais devido à presença de compostos coloridos provenientes do extracto que provocavam interferência, uma vez que também absorviam no mesmo comprimento de onda, influenciando o resultado da quantificação. De modo que optou-se por utilizar o método de electroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE. Em cada poço do gel colocou-se 15 μL de amostra e igual volume de tampão. Aplicou-se voltagem, e após visualização e

obtenção da imagem do gel, procedeu-se à sua análise com a ajuda do programa informático *Quantity one*. Com este programa analisou-se a intensidade total das bandas de cada tratamento, as quais foram comparadas com o marcador de peso molecular, a partir do qual se efectuou os cálculos necessários para se determinar o volume a aplicar de cada amostra para conseguirmos ter a mesma concentração.

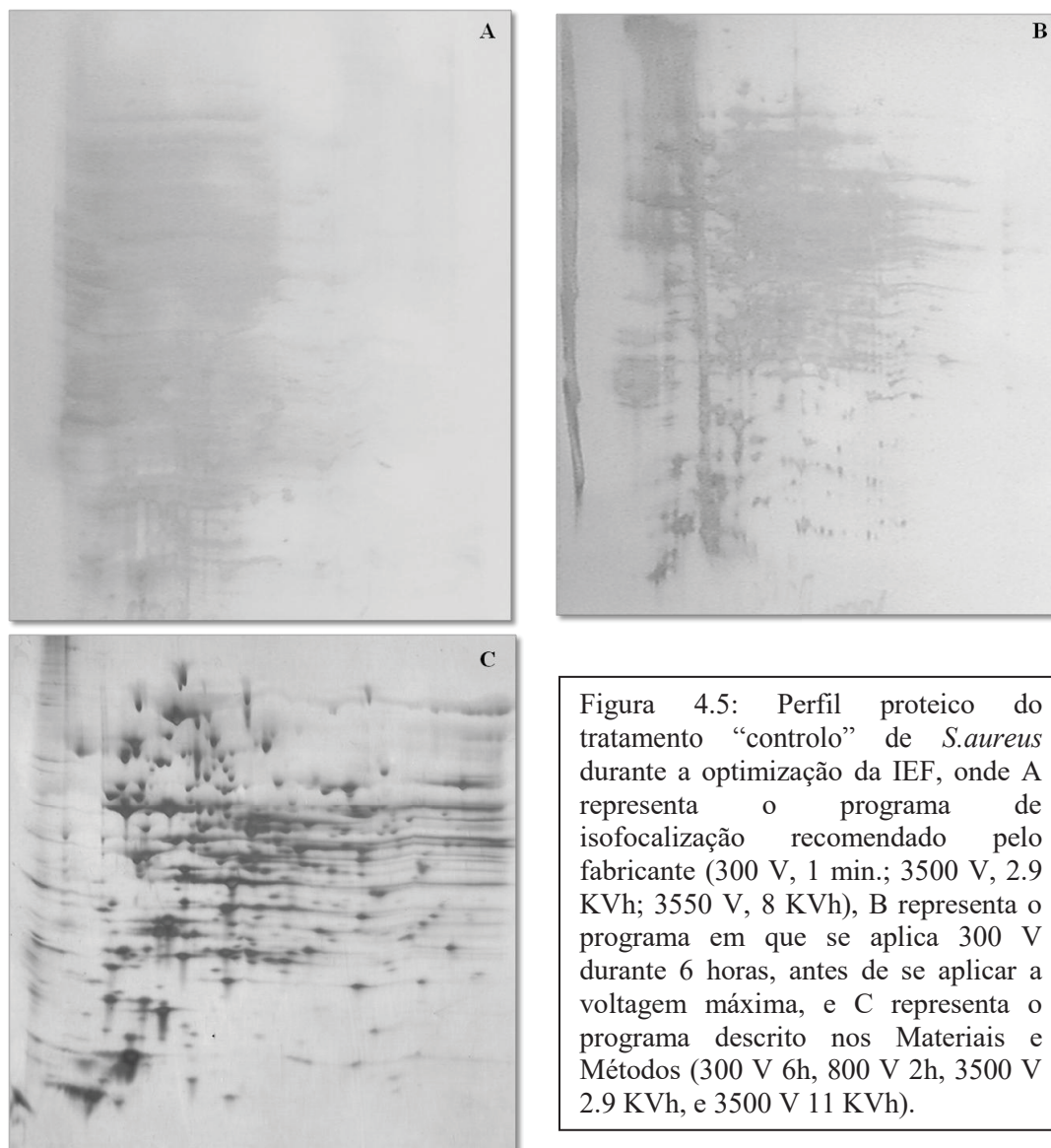
Por posterior comparação verificou-se que a diferença na concentração de proteína entre os diferentes métodos, por exemplo para o *S. aureus*, era 5.33  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  no método BCA e 4.88  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  no método de SDS-PAGE para o tratamento “stress”.

### 4.3.2. Focalização isoelectrica

A isofocalização constitui um ponto muito importante na obtenção de um perfil proteico de qualidade, onde todas as proteínas devem estar isofocalizadas para que se possam obter *spots* definidos, e sem distorções horizontais.

Inicialmente utilizou-se o programa aconselhado pelo manual da GE Healthcare (300 V 1 minuto, 3500 V a 2.9 KVh, e 3500 V a 8 KVh), no entanto, verificou-se que as proteínas não estavam isofocalizadas e que poderia haver interferência provocada por sais (figura 4.5A), pelo que se optou por aplicar voltagens baixas durante mais tempo no início da focalização, 300 V durante 6 horas, antes de se aplicar a voltagem máxima. Com este programa verificou-se uma melhoria significativa na isofocalização, no entanto, o perfil proteico continuava com distorções quer na horizontal como na vertical (figura 4.5B). As distorções horizontais podem indicar que a amostra não está completamente isofocalizada, que existe um excesso de proteína, ou que existem contaminantes na amostra, tais como sais, detergentes, péptidos, ácidos nucleicos, lípidos, compostos fenólicos e iónicos, ou ainda que a amostra não se encontra completamente solubilizada (Berkelman e Stensted, 1998). Enquanto que as distorções verticais indicam-nos, para além da incompleta solubilização e da excessiva aplicação de amostra, que a amostra sofreu oxidação, que a etapa de equilíbrio não foi eficaz, que o gel contém poros de tamanho irregular ou ainda que as soluções e reagentes utilizados são de baixa qualidade (Berkelman e Stensted, 1998; Westermeier, 2005).

Optou-se então por alterar o tempo de isofocalização com o seguinte programa 300 V durante 6 h, 800 V 2h, 3500 V a 2.9 KVh e 3500 V a 11 KVh (figura 4.5C). Onde se observou uma melhoria significativa no perfil proteico e na definição dos *spots*.



### 4.3.3. Extractos de proteína

#### 4.3.3.1 Preparação e extração de proteínas citoplasmáticas

A solução na qual as proteínas se encontram solubilizadas representa um aspecto de grande importância, pois o objectivo é ter as proteínas completamente solubilizadas e livres de contaminantes. Testou-se o tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7 e a solução de ureia 9.8 M adicionada de CHAPS 4.5% (p/v) (figura 4.6), tendo-se verificado que esta

última seria a melhor para efectuar a extracção das proteínas, pois permite um perfil proteico praticamente livre de contaminantes, e conseqüentemente uma melhor imagem e definição dos *spots* (Figura 4.6B).

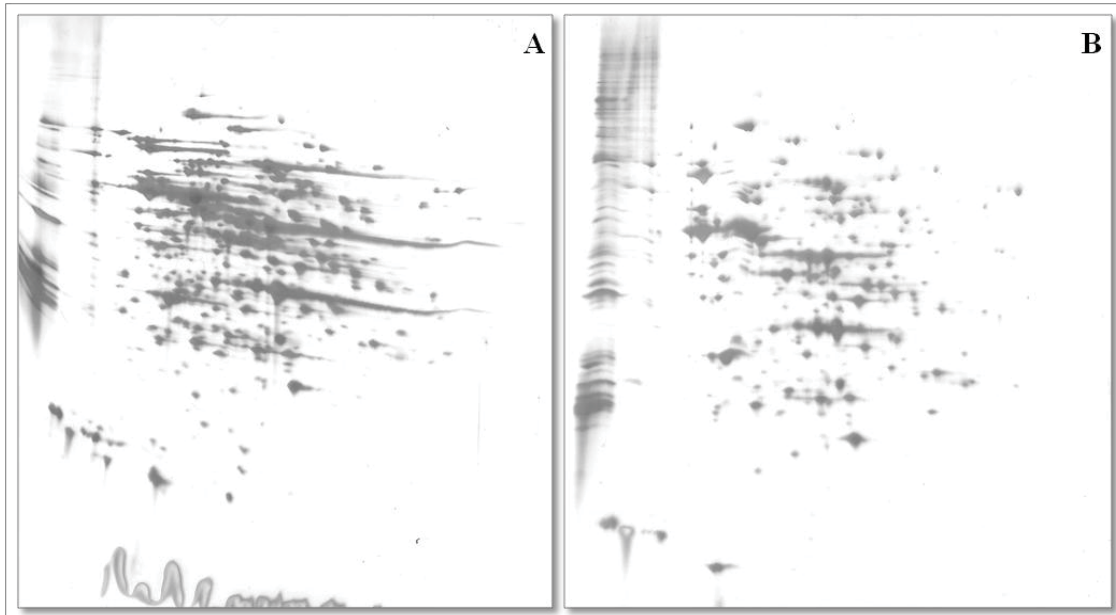


Figura 4.6: Perfil proteico de *L. monocytogenes* durante a selecção da solução para a extracção das proteínas, em A) a extracção foi feita com tampão Tris 10 mM, pH 7, e em B) com solução de ureia a 9.8 M adicionada de CHAPS 4.5% (p/v); IEF (programa descrito no Materiais e Métodos).

#### 4.3.3.2. Concentração da proteína

A concentração da proteína aplicada constitui outro aspecto importante, pois o excesso de proteína pode, como já referido, provocar distorções horizontais e verticais tornando difícil a definição dos *spots*. Na figura 4.7 podemos verificar que quando se aplicou apenas 30  $\mu\text{g}$  obteve-se um gel com uma resolução dos *spots* muito superior (figura 4.7B), no entanto, houve algumas proteínas que se observavam no gel onde se aplicou uma quantidade de proteína superior (50  $\mu\text{g}$ ) que não se conseguiram visualizar quando se aplicou menor quantidade de proteína (figura 4.7A).

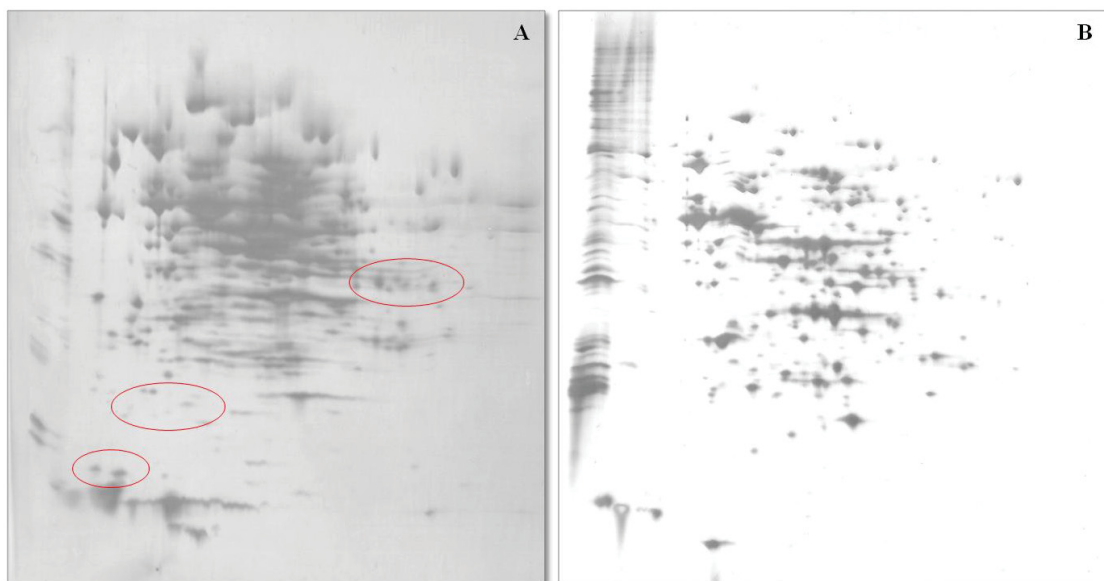


Figura 4.7: Efeito da concentração de amostra no perfil proteico de *L. monocytogenes* onde em A) foram aplicados 50  $\mu\text{g}$  de proteína e em B) 30  $\mu\text{g}$ . Na figura A estão assinalados alguns exemplos de *spots* que não são visíveis na figura B, resultado da diferença na concentração de amostra presente em cada um dos perfis proteicos.

#### 4.3.3.3. Qualidade da proteína

A qualidade da proteína é um dos aspectos mais importantes na análise de um perfil proteico. O tratamento da amostra não deve provocar a perda ou modificação das proteínas presentes na amostra, as quais devem permanecer na sua forma reduzida e livres de contaminantes. No entanto, no tratamento “adaptadas” (figura 4.8) verificou-se a ocorrência de algum tipo de modificação nas proteínas de maior peso molecular, provavelmente oxidação, e/ou a presença de contaminantes provenientes do extracto de *V. cylindraceum*, nomeadamente compostos fenólicos.

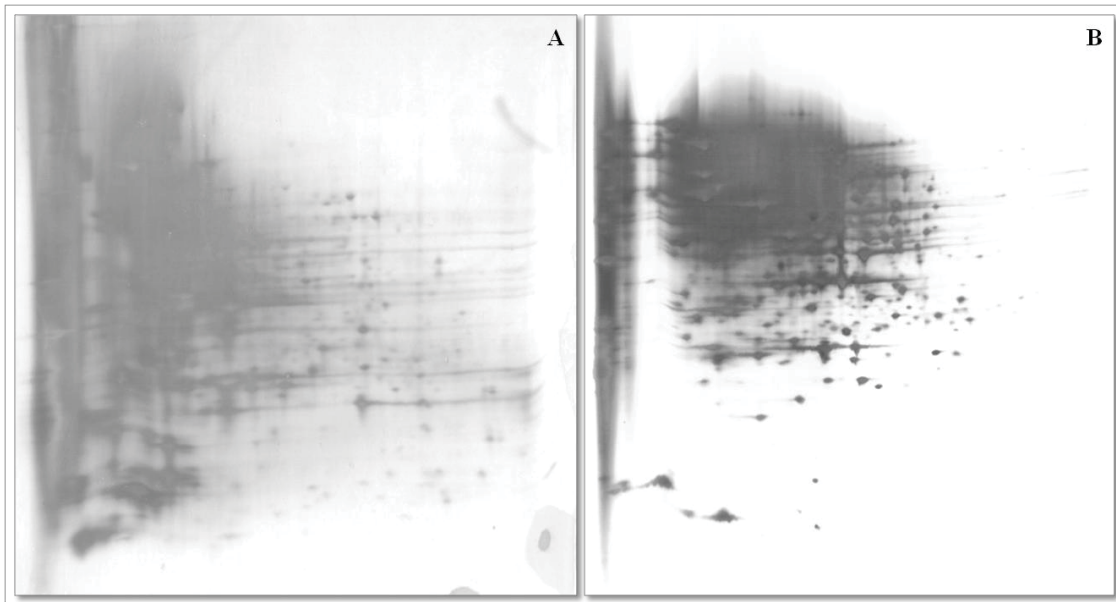


Figura 4.8: Qualidade da proteína resultante do tratamento adaptadas de *S. aureus* (A) e *L. monocytogenes* (B), cada um com aproximadamente 40  $\mu\text{g}$  de proteína, onde se verifica que ambos apresentam sinais de oxidação, provocados pelo extracto de *V. cylindraceum*.

#### 4.3.4. Segunda dimensão

A única optimização que se efectuou ao nível da segunda dimensão residiu nas voltagens aplicadas, em que o fabricante recomenda aplicar 1000 V durante 4 horas e nós optámos por aplicar 400 V durante 5 horas, para permitir um melhor separação.

#### 4.4. Análise dos perfis proteicos

##### 4.4.1. SDS-PAGE

Após a optimização da preparação e extracção das proteínas citoplasmáticas, efectuou-se novo gel com aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra. Uma breve análise do gel de *S. aureus* (Figura 4.9) indica-nos que existem diferenças no perfil de bandas entre tratamentos. Na imagem ampliada I verificamos que existem bandas que são expressas em menor quantidade tanto no tratamento “stress” como no tratamento “adaptadas”, e verificamos o desaparecimento de algumas bandas no tratamento “adaptadas”, nomeadamente na zona de maior peso molecular ( $>75$  kDa). Enquanto que nas imagens II e III verificamos que existem bandas que são expressas em maior quantidade no tratamento “stress” (63 kDa) e “adaptadas” (20 kDa), respectivamente. Podemos ainda verificar que a amostra do tratamento “adaptadas” se encontra com um

*background* mais escuro, o que nos leva a pensar que algumas proteínas poderão estar degradadas ou oxidadas, ou que existe a presença de contaminantes devido à interacção com o extracto, como já referido anteriormente.

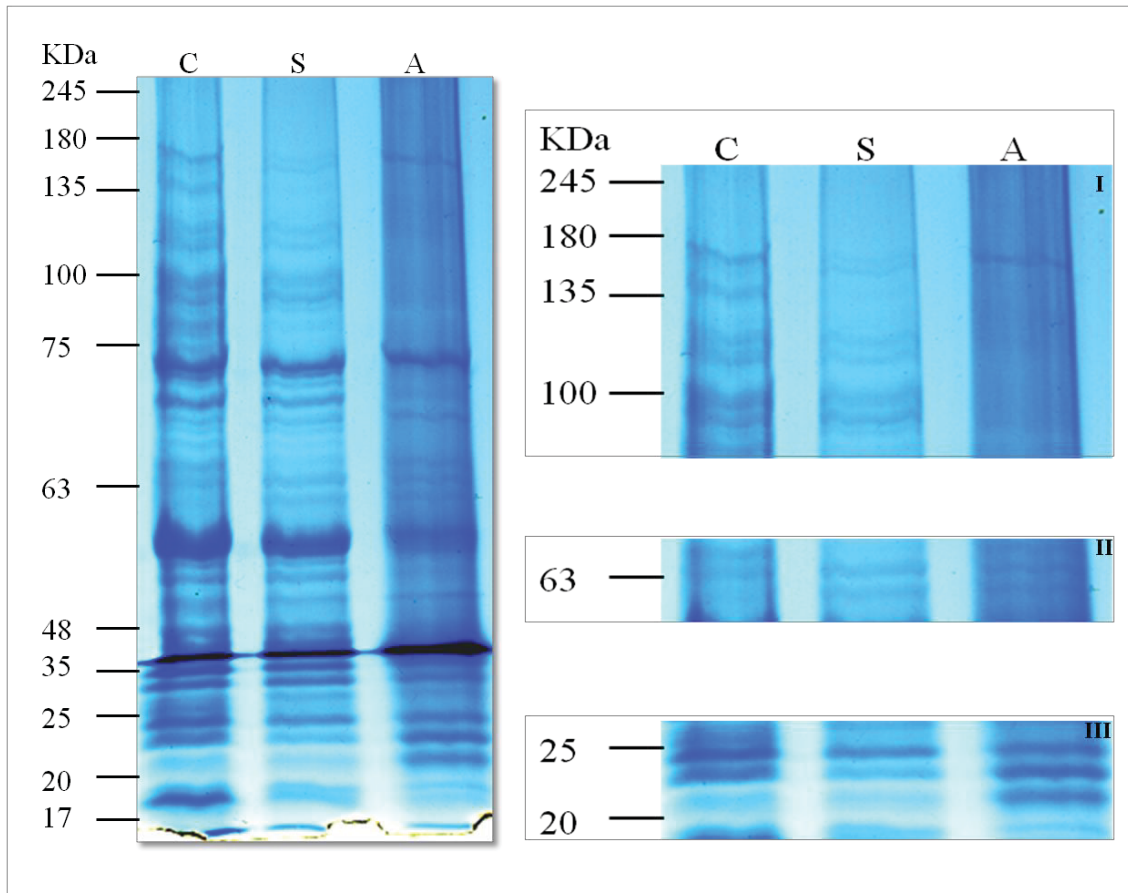


Figura 4.9: Gel de poliacrilamida (12%) SDS-PAGE da proteína citoplasmática total de *S. aureus* e respectivas imagens de pormenor, em que C corresponde ao tratamento “controlo”, S ao “stress” e A “adaptadas”, com aproximadamente 30µg de proteína em cada tratamento.

A quantificação de proteína em *L. monocytogenes* por SDS-PAGE apresentou alterações semelhantes no perfil proteico (figura 4.10), onde podemos verificar que na imagem de ampliação I existe uma menor expressão de algumas bandas nos tratamentos “stress” e “adaptadas”, e ainda o desaparecimento de algumas bandas no tratamento “adaptadas”, principalmente na zona de maior peso molecular ( $>75$  kDa). Na imagem II verifica-se um aumento na expressão de uma banda no tratamento “stress”, na zona dos 63 kDa. Tal como o que acontece com o *S. aureus*, no entanto em menor quantidade, a amostra do tratamento adaptadas de *L. monocytogenes* encontra-se com algum nível de degradação ou oxidação, ou contaminação como já referida anteriormente.

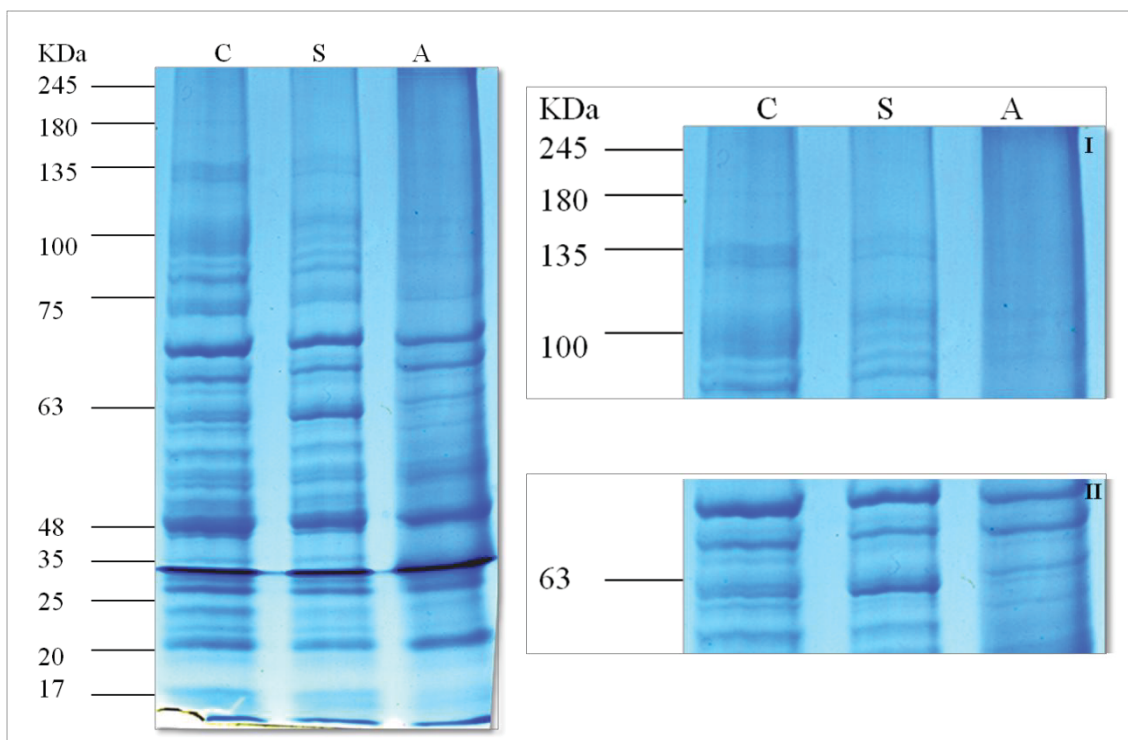


Figura 4.10: Gel de poliacrilamida (12%) SDS-PAGE da proteína citoplasmática total de *L. monocytogenes* e respectivas imagens de pormenor, em que C corresponde ao tratamento “controlo”, S ao “stress” e A “adaptadas”, com aproximadamente 30 $\mu$ g de proteína em cada tratamento.

#### 4.4.2. 2D-E

Só foi possível fazer a análise bioinformática dos perfis proteicos dos tratamentos “controlo” e “stress” de *S. aureus* (figura 4.11). Estes foram analisados com a ajuda do programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*, onde se seleccionaram alguns dos *spots* idênticos em ambos os géis (13 *spots*) e que serviram de referência para a sua comparação. Houve a preocupação de seleccionar *spots* nas diferentes regiões dos géis (figura 4.12 a verde) para o alinhamento dos mesmos. Efectuou-se a correspondência entre os géis para determinar quais os *spots* comuns aos diferentes tratamentos, onde se verificou (figura 4.12B) que os diferentes géis correram de forma diferente quer durante a IEF quer na separação por peso molecular, como demonstram as setas de cor azul.

É de referir que o programa informático utilizado na análise dos perfis proteicos, para além de detectar os *spots*, dá-nos os seus respectivos valores de pI, peso molecular, área, volume, percentagem de intensidade, percentagem de volume e saliência, os quais foram exportados e trabalhos em folha de excel para chegar aos valores aqui apresentados.

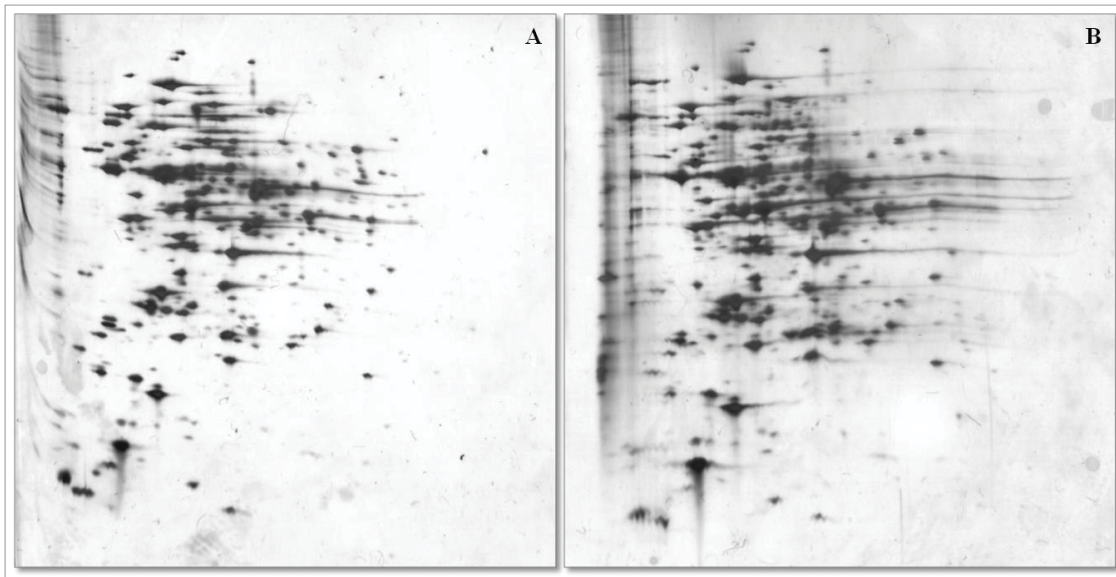


Figura 4.11. Perfil proteico de *S. aureus* no tratamento “controlo” (A) e no tratamento “stress” (B), onde foram aplicadas 30  $\mu\text{g}$  de proteína e o programa de IEF descrito no Materiais e Métodos. Estes constituem, os únicos perfis que foram analisados no programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*.

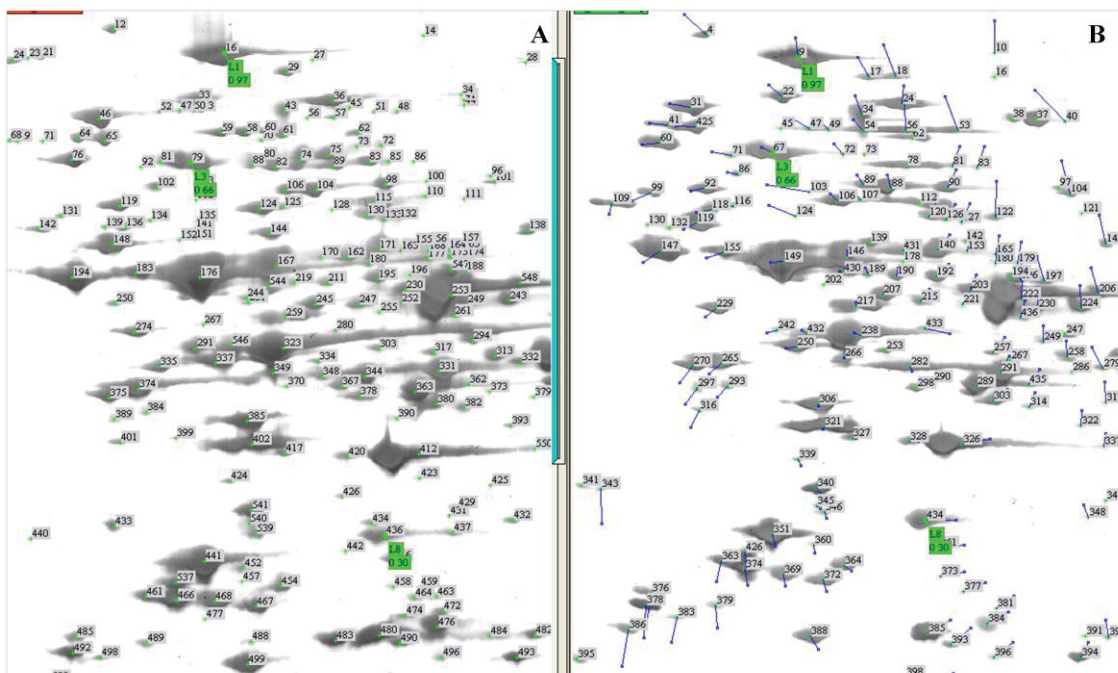


Figura 4.12: Imagem de pormenor dos perfis proteicos de *S. aureus* onde estão assinalados os *spots* idênticos (a verde) em ambos os tratamentos, sendo A o tratamento “stress” e B o tratamento “controlo” após a comparação dos géis onde as setas a azul representam a diferença na posição dos *spots* entre os géis.

Da análise e comparação dos géis pelo programa informático resultou a detecção de 502 *spots*, 225 pertencentes ao tratamento “controlo” e 277 ao tratamento “stress”. Destes, 166 *spots* encontravam-se presentes em ambos os tratamentos, 111 foram induzidos no tratamento “stress” e 59 estavam presentes apenas no tratamento “controlo” (figura 4.13).

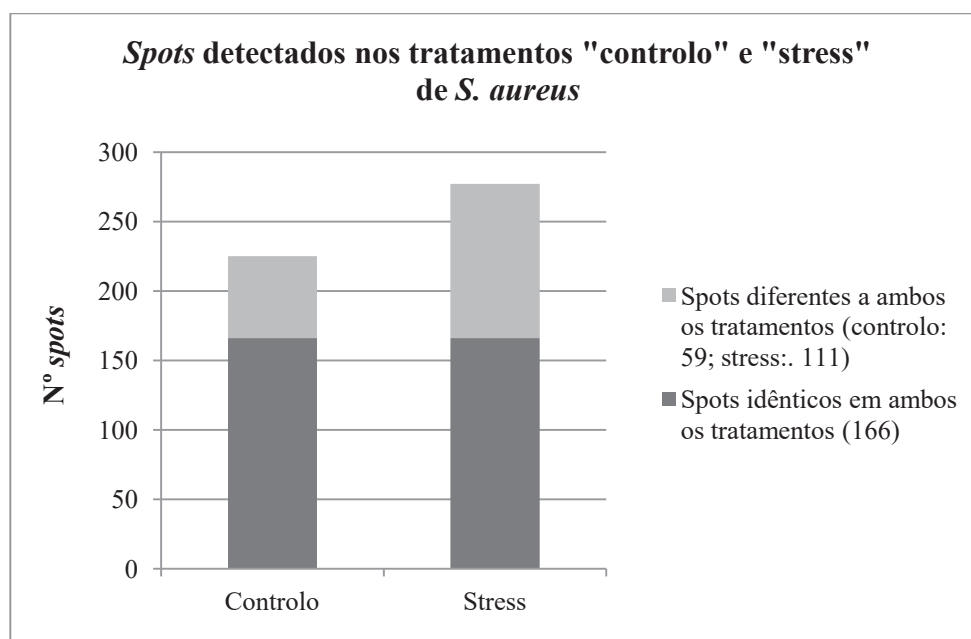


Figura 4.13 : *Spots* detectados pelo programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*, nos tratamentos “controlo” e “stress” de *S. aureus*.

Os 166 *spots* comuns a ambos os tratamentos possuíam um peso molecular que variou entre 14 e 116 kDa, tendo-se verificado que 23 destes *spots* têm pontos isoeléctricos (PI) no intervalo de pH de 4-5, e os restantes 143 no intervalo 5-6 (quadro 1 do anexo I). Os *spots* em comum representam 67% do total da percentagem de volume (medida da intensidade dos *spots* detectados), ou seja do total de proteína analisada.

Na figura 4.14 está representada a variação na percentagem de volume dos *spots* comuns a ambos os tratamentos, tendo-se verificado que a expressão de 79 proteínas foi induzida durante o tratamento de stress (47.59%) de onde se destaca o *spot* 143 (identificação do tratamento controlo, quadro 1, anexo I) cuja intensidade duplica no tratamento stress (*spot* 138, quadro 1, anexo I). Observou-se ainda uma diminuição da expressão de 87 proteínas (52.41%), sendo o *spot* 282 (do controlo, quadro 1, anexo I) aquele onde se verifica maior diminuição (1,24 vezes) após o tratamento stress (*spot* 367, quadro 1, anexo I).

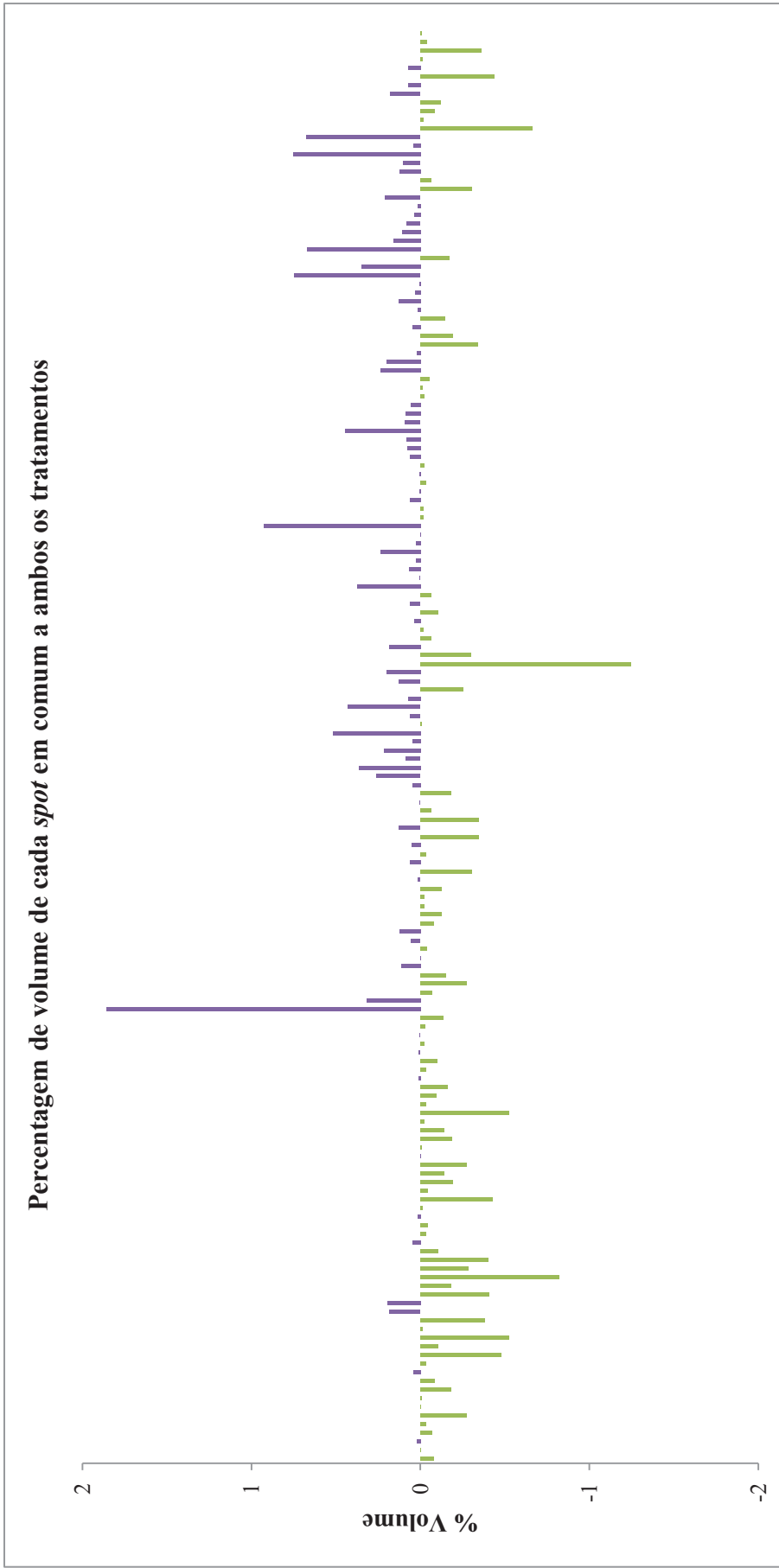


Figura 4.14 : Variação na percentagem de volume dos *spots* comuns a ambos os tratamentos. As barras a roxo representam os *spots* que apresentavam maior percentagem de volume no tratamento “stress” e as barras de cor verde representam os *spots* que apresentaram menor percentagem de volume no tratamento “stress”. Os *spots* apresentam-se ordenados de acordo com o quadro 1 (anexo I).

Os 59 *spots* que estavam presentes apenas no controlo, ou seja, cuja expressão foi reprimida durante o tratamento de stress, possuíam um peso molecular que variou entre 13 e 100 kDa, tendo-se verificado que 20 (33.89%) destes *spots* tinham ponto isoeléctrico no intervalo de pH de 4-5, e os restantes 39 no intervalo 5-6 (quadro 2 do anexo I). De entre estes, o *spot* 247 foi aquele que apresentou a maior percentagem de volume (figura 4.15), provavelmente correspondente a uma proteína importante para o crescimento de *S. aureus* nestas condições.

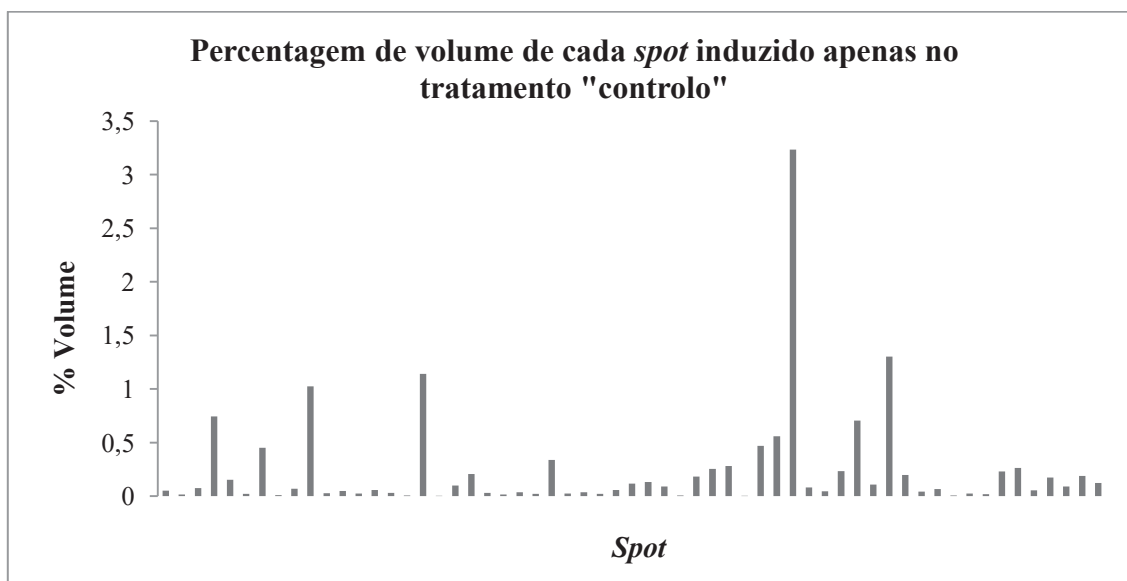


Figura 4.15: Percentagem de volume de cada *spot* presentes apenas no tratamento “controlo”. Os *spots* apresentam-se ordenados de acordo com o quadro 2 (em anexo I).

Nas células sujeitas a condições de stress verificou-se a indução de 111 proteínas, que possuíam um peso molecular que variou entre 14 e 112 kDa, tendo-se verificado que 18 (10.81%) destes *spots* apresentavam ponto isoeléctrico no intervalo de pH de 4-5, 81 (72.97%) no intervalo 5-6 e os restantes 12 (10.81%) entre 6-7 (quadro 3 do anexo I). Na figura 4.16 podemos visualizar a percentagem de volume de cada *spot* induzido apenas no tratamento “stress”, onde o *spot* 344 se apresenta com a maior percentagem de volume, o que nos leva a crer que este *spot* representa uma proteína importante que actua de forma a proteger a célula contra extracto.

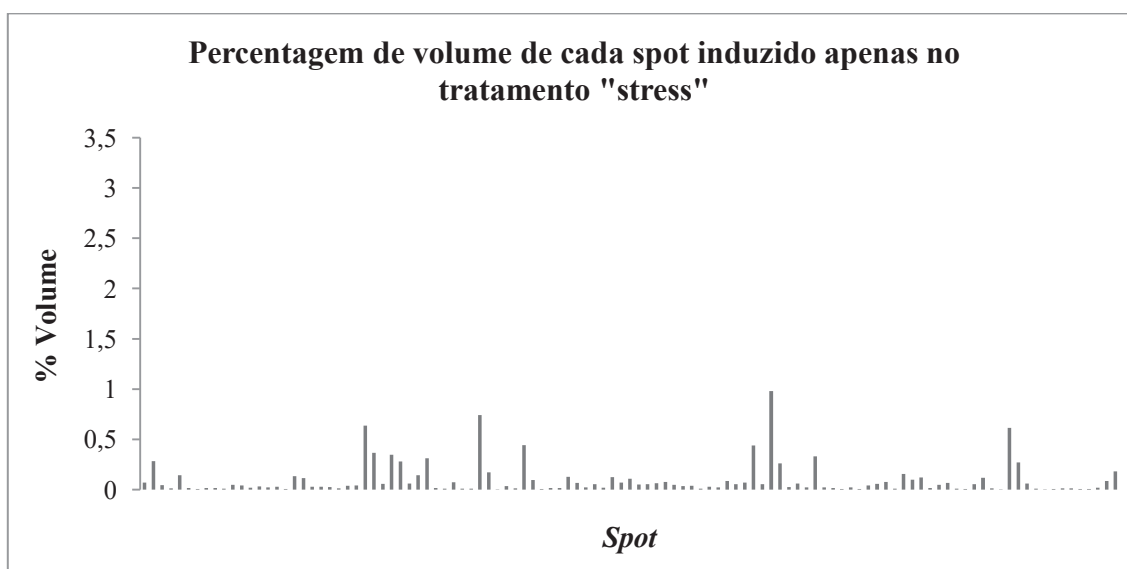


Figura 4.16: Percentagem de volume de cada *spot* induzido apenas no tratamento “stress”. Os *spots* apresentam-se ordenados de acordo com o quadro 3 (anexo I).

É de referir que apesar de o número de *spots* induzidos ser superior ao número de *spots* reprimidos, o valor da percentagem de volume do grupo de *spots* reprimidos é superior à percentagem de volume do grupo de *spots* induzidos, o que poderá sugerir que as células de *S. aureus* tornaram a síntese proteica mais eficiente, como estratégia de sobrevivência ao contacto com o extracto.

Da análise global dos perfis proteicos podemos ainda verificar que existe um pequeno número de *spots* que se destacam de todos os outros por causa da sua elevada percentagem de volume (igual ou superior a 2). Na figura 4.17 está representada a percentagem de concentração dos *spots* para cada um dos tratamentos, onde verificamos que apenas 12 (“controlo”) - 14 (“stress”) *spots* (quadro 4 do anexo II) com percentagem de volume igual ou superior a 2 prefazem uma média de 38.5% da concentração total dos *spots*, o que nos indica que estes representam proteínas muito importantes para a sobrevivência das células.

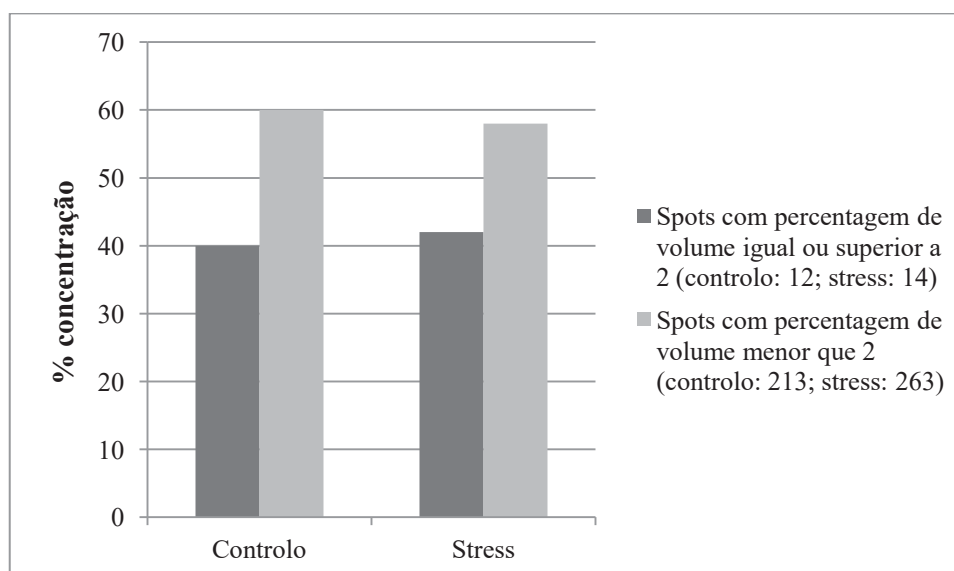


Figura 4.17: Concentração dos *spots*, tendo em conta a sua percentagem de volume. Onde apenas 12 *spots* com percentagem de volume igual ou superior a 2 representam 40% da concentração total dos *spots* no tratamento “controlo”, e no tratamento “stress” 14 *spots* representam 42% da concentração total de *spots*. Para maior detalhe consultar o quadro 4 (anexo II).

#### 4.5. Identificação de *spots*

A partir da database *SWISS 2DPAGE*, obteve-se um gel de *S. aureus* estirpe N315 (Scherl *et al.*, 2005), que por comparação com os nossos, através do programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*, detectou-se 82 *spots* comuns a ambos os organismos, de onde se identificaram 25 proteínas (quadro 4.4 e para mais promenores consultar o quadro 5 do anexo III).

Quadro 4.4. *Spots* identificados por comparação com o perfil proteico de *S. aureus* estabelecido por Scherl *et al.* (2005) e publicado na database *SWISS 2DPAGE* e respectivos factores de indução ou repressão.

(spot)	Proteína	Factor
1	Chaperona DnaK (dnaK)	2.341
2	60 KDa chaperonin (groEL)	0.720
3	Arginil-tRNA sintetase (argS)	1.008
4	SA0182 (provável descarboxilase indole-3-piruvato)	2.442
5	Cisteíne-tRNA ligase sintetase (cysRS)	14.223
6	Putative aldeído desidrogenase (aldA)	1.150
7	Provável cisteína desulfurase (csd)	0.448
8	Nucleosido difosfato quinase (ndk)	0.932
9	Ornitina-oxo-ácido aminotransferase 2 (rocD2)	0.946
10	Álcool desidrogenase (adh)	Nd
11	D-lactato desidrogenase/ D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase (ldhD)	Nd
12	D-lactato desidrogenase/ D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase (ldhD)	0.770
13	Factor de alongamento Ts (tsf)	1.086
14	Metionil-tRNA formiltransferase (fmt)	1.184
15	Carbamato quinase 1 (arcC1)	0.800
16	Piridoxal biosinteses liase (pdxS)	1.305
17	1,4-Dihidroxi-2-naftoil-CoA sintetase (menB)	Nd
18	SA1331(provável Aldo-ceto reductase )(akr)	6.705
19	Glicosamina-6-fosfato desaminase (nagB)	1.631
20	Fosforibosilglicinamida formiltransferase (purN)	1.077
21	Proteína fosfotransportadora HPr (ptsH)	Nd
22	Imunoglobulina G-binding protein A (spa)	0.974
23	Putative aldeído desidrogenase (aldH)	Dn
24	Glutamina sintetase (glnA)	Dn
25	Meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase (folD)	Dn

>1 – induzida; <1 – reprimida; Dn – sintetizada *de novo*; Nd – não detectada.

## 5. Discussão

Hoje sabe-se que os frutos tipo bagas, nomeadamente os do género *Vaccinium*, são ricos em compostos bioactivos (Vattem *et al.*, 2005; Burdulis *et al.*, 2009), na sua maioria compostos fenólicos, solúveis em água (Molan *et al.*, 2008), os quais possuem actividade antimicrobiana (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Nohynek *et al.*, 2006; Lacombe *et al.*, 2010). Neste sentido foi-se avaliar a actividade antimicrobiana do extracto aquoso de frutos de *V. cylindraceum* em relação a microorganismos de origem alimentar, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e os mecanismos envolvidos na resposta ao stress desencadeado pelo *V. cylindraceum*.

O extracto de *V. cylindraceum* provoca alterações no padrão de proteínas das células tanto stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1 hora como crescidas na presença 60 mg/ml de extracto. Estas alterações foram evidentes em ambas as bactérias testadas, i.e. *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Como se pode observar nos géis SDS-PAGE, onde, em ambos os microorganismos, se verifica uma diminuição na expressão da maioria das bandas em ambos os tratamentos com exposição ao extracto, e o desaparecimento de algumas bandas, principalmente na zona de maior peso molecular (> 75 kDa) nos tratamentos “adaptadas”. No entanto, nas células de *S. aureus* observou-se o aumento da intensidade de uma banda de aproximadamente 63 kDa e outra de 20 kDa nas células stressadas e adaptadas, respectivamente. Enquanto que, nas células de *L. monocytogenes* não se verificou a intensificação da banda 20 kDa nas células s adaptadas.

Analizou-se o proteoma das células de *S. aureus*, com o intuito de identificar e caracterizar as proteínas envolvidas na resposta ao stress do extracto de *V. cylindraceum*, verificando-se que existia alteração do perfil proteico entre as células não tratadas e as células tratadas, indicativo da existência de mecanismos de acção e de toxicidade (Anderson e Anderson, 1996).

Das 25 proteínas identificadas 14 sofreram indução, sendo elas duas aldeído desidrogenases (*aldA* e *aldH*), meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase (*folD*), glutamina sintetase (*glnA*), aldo-ceto reductase (*akr*), descarboxilase indole-3-piruvato, glucosamina-6-fosfato desaminase (*nagB*), piridoxal biosíntese liase (*pdxS*), metionil-tRNA formiltransferase (*fmt*), factor de alongamento Tsf (*tsf*), fosforibosilglicinamida formiltransferase (*purN*) e arginil-tRNA sintetase (*argS*), chaperona DnaK (*dnaK*),

cisteína tRNA sintetase (*cysRS*). Destas, a *cysRS*, *akr*, *dnaK* e a descarboxilase indole-3-piruvato apresentaram as maiores taxas de indução (14.223, 6.705, 2.341 e 2.442, respectivamente), as proteínas *aldA*, *nagB*, *pdxS*, *fnt*, *tsf*, *purN* e *argS* foram induzidas em menores quantidades (<1 vez mais que o tratamento “controle”), enquanto que as proteínas *aldH*, *fold* e *glnA* foram sintetizadas *de novo*. As restantes 11 proteínas que foram identificadas sofreram repressão, provavelmente por degradação das mesmas. De entre elas encontram-se a álcool desidrogenase (*adh*), 1,4-dihidroxi-2-naftanoil-CoA sintetase (*menB*), uma proteína fosfotransportadora HPr (*ptsH*), duas D-lactato desidrogenases (*ldhD*), a proteína A de ligação à imunoglobulina G (*spa*), chaperonina de 60 kDa (*groEL*), uma provável desulfurase cisteína (*csd*), nucleosido difosfato quinase (*ndk*), ornitina-oxo-ácido aminotransferase (*rocD2*), e carbamato quinase (*arcC*). Sendo que *adh*, *menB*, *ptsH* e uma *ldhD* estavam ausentes no gel correspondente às células stressadas com extracto.

*GroEL* e *dnaK*, chaperonas da família das *hsp*, são induzidas, geralmente, após stress térmico ou pela acumulação de polipéptidos desnaturados. Estas proteínas têm como função principal reparar e ajudar as macromoléculas danificadas a recuperar a sua forma nativa (Kregel, 2001), no entanto, também podem participar na degradação destes mesmos polipéptidos, quando a sua aberrante acumulação se torna nociva para o organismo. A degradação destes polipéptidos é feita por proteases como La e Clp, as quais necessitam de ATP e de proteínas *hsp*, como a *dnaK* e a *groEL*, para poderem actuar (Kandror *et al.*, 1994; Hayes e Dice, 1996; Arsène *et al.*, 2000). O que poderá explicar por um lado o aumento da proteína *dnaK*, necessária à degradação das proteínas desnaturadas (Hayes e Dice, 1996) e por outro a ausência de determinados *spots* nas células stressadas, correspondentes a proteínas que foram degradadas. Esta desnaturação poderá ter sido provocada por stress oxidativo, o qual promove a formação de pontes bissulfito intermoleculares e consequente perda da estrutura nativa hexamérica em dimérica no caso da *ndk* (Song *et al.*, 2000).

A diminuição da expressão da *groEL*, poderá no entanto ter outro significado, ou seja, aliada à diminuição da expressão de *ndk*, que está associada à síntese de ATP e GDP, poderão representar um indicador da entrada das células de *S. aureus* em fase estacionária (Kohler *et al.* 2005).

Durante a oxidação do etanol este é convertido a acetaldeído pela *adh* e depois a acetato pela *aldH*, o qual entra no ciclo de krebs e é completamente oxidado a CO<sub>2</sub>. A acumulação de aldeídos, nomeadamente o acetaldeído, tende a ser tóxico para a célula devido à sua elevada reactividade. De facto, a deficiência de *aldH* mitocondrial aumenta a vulnerabilidade a stress oxidativo (Ohsawa *et al.* 2003). Assim, a repressão da *adh* em *S. aureus* representa uma vantagem para a célula pois evita a acumulação de aldeídos. Ao contrário, a indução da descarboxilase indole-3-piruvato que catalisa a reacção indole-3-piruvato a indole-3-acetaldeído (Spaepen *et al.*, 2007) (que surge da conversão do triptofano a indole-3-piruvato) contribui para o aumento de acetaldeído nas células stressadas com extracto, o que poderá explicar a indução da *AldA* e da *akr*, que participam na eliminação de aldeídos e cetonas produzidos durante o stress (Simpson *et al.* 2009).

A formação de aldeídos e cetonas também poderá resultar da peroxidação de lípidos após exposição a compostos oxidantes e metais pesados (Avery, 2001 *apud* Ellis, 2002), ou directamente a partir de fontes exogenas, incluindo fitoalexinas e toxinas (Ellis, 2002), que poderão estar presentes no extracto aquoso de *V. cylindraceum*.

A família das *akr* para além de poderem metabolizar aldeídos e cetonas, acções importantes na resposta aos stresses osmótico, electrofilico e osmótico (Jin e Penning, 2006), são, também, potenciais alvos da acção de drogas (Jez *et al.*, 1997).

A glutamina sintetase (*glnA*) é uma enzima que desempenha um papel essencial no metabolismo do azoto, catalisando a condensação de glutamato e amónia para formar a glutamina (Häberle *et al.*, 2005). A glutamina, além de ser usada para construir as proteínas, fornece átomos de azoto para a síntese de outros aminoácidos como a glicina, alanina, histidina e triptofano. Sabe-se que a acumulação no meio intracelular de aminoácidos como a prolina, a betaina e a glicina, que funcionam como solutos compatíveis, protegem o *S. aureus* durante o stress osmótico (Ourkomaili e Booth, 1992; Amin *et al.*, 1995). De facto, observou-se que as células de *S. aureus* em contacto com o extracto de *V. cylindraceum* apresentavam-se plasmolisadas o que poderá ser efectivamente o resultado do stress osmótico.

Por outro lado sabe-se que a glutamina está envolvida no mecanismo de resistência de *S. aureus* a metilina, pois quando esta foi adicionada ao meio de crescimento de

células de *S. aureus* sensíveis, estas por sua vez recuperavam a resistência ao antibiótico (Gustafson *et al.* 1993). Neste sentido, o aumento da expressão de *glnA* poderá estar associada a mecanismos de resistência de *S. aureus* a substâncias tóxicas, como as que se encontram presentes no extracto de *V. cylindraceum*.

Outras enzimas importantes na síntese de aminoácidos também foram induzidas, como seja a *fmt* que catalisa a reacção na qual se forma tetrahydrofolato, que por sua vez está associado à síntese de 5,10-metilenetetrahydrofolato. A *folD* catalisa a oxidação de 5,10-metilenetetrahydrofolato a 5,10-metilenetetrahydrofolato e a hidrólise do último a 10-formiltetrahydrofolato, qualquer um deles importante na síntese de metionina, serina, timidilato e de purinas (MacKenzie, 1984). A enzima *cysRS* está relacionada com a síntese de cisteína. Ambos os aminoácidos cisteína e metionina são precursores na síntese de glutatona, a qual representa o principal tampão redox no citoplasma das bactérias (William *et al.* 1997). A glutatona ao manter o potencial redox baixo protege as proteínas ricas em grupos tiol do stress oxidativo. Aliás, um dos efeitos tóxicos do acetaldeído resulta da reacção do grupo aldeído com os grupos tiol das proteínas (Jones, 1989). Outra indicação de que a síntese de glutatona poderá estar a ser induzida nas células stressadas é o facto da enzima cisteína dessulfurase (*csd*), responsável pela síntese de L-alanina a partir de cisteína, ter sido reprimida, libertando assim este precursor para a síntese de glutatona.

A indução de várias enzimas que estão envolvidas na síntese de aminoácidos pode estar associada a mecanismos que aumentam a tolerância a acidez, por produção de compostos alcalinos, nomeadamente a amónia. Pela desaminação da arginina liberta-se no meio intracelular  $\text{NH}_3$ , que se combina com um protão no citoplasma formando amónia, e conseqüentemente aumentando o pH intracelular (Cunin *et al.* 1986). De facto, verificou-se que o pH do extracto de *V. cylindraceum* apresentava pH ácido (2.92), o que levou à diminuição no pH do meio de crescimento (5.49). Bore *et al.* (2007), após aplicação de stress ácido com HCl (pH 4.5) em células de *S. aureus*, também verificou o aumento da actividade da urease juntamente com a formação de protões pela NADH desidrogenase.

A repressão da *arcC*, uma carbamate quinase, que produz carbamoil fosfato a partir de amónia, pode ser um sinal de que a célula optou por utilizar a amónia na síntese de açúcares aminados, como sugere a indução da enzima piridoxal biosíntese liase (*pdxs*), a

qual está envolvida na produção de fosfato piridoxal, por incorporação de amónia no anel de piridina, o qual poderá ser utilizado na síntese de açúcares aaminados. É interessante verificar que a glucoseamina-6-fosfato desaminase (*nagB*), responsável pela síntese de fructose a partir de glucoseamina foi induzida em células de *S. aureus* sujeitas a *V. cylindraceum*.

Hoje sabe-se que em *Bacillus subtilis* e noutras bactérias gram-positivas com baixo teor de GC a repressão catabólica (RC) envolve a proteína fosfotransportadora HPr e um regulador de transcrição, CCPA (Titgemeywer e Hillen, 2002). A HPr desempenha um papel na CR como um corepressor do CCPA, um regulador de transcrição, quando fosforilada em Ser-46 (Deutscher *et al.* 1995). Esta proteína fosfotransportadora HPr (*ptsH*) estava ausente nas células de *S. aureus* sujeitas a stress, sugerindo que a glucose deixa de exercer repressão catabólica nestas condições, o que pode representar uma desvantagem para a célula, por se tornar energeticamente menos eficiente, ou pode significar uma estratégia de sobrevivência da célula, permitindo utilizar outros açúcares como a fructose, que pode estar a ser sintetizada a partir de açúcares aaminados.

A 1,4-Dihidroxi-2-naftoil-CoA sintetase (*menB*) que converte o-succinilbenzoil-CoA a ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoato (DHNA), desapareceu em células de *S. aureus* durante o stress com *V. cylindraceum*. O DHNA é necessário à biosíntese de menaquinona um componente da cadeia transportadora de electrões (cte). Este facto pode ter como consequência uma diminuição de síntese de ATP por fosforilação oxidativa e por outro, ser um indicador de mal funcionamento da cte, e, conseqüentemente, um aumento de espécies reactivas de oxigénio e conseqüentemente de stress oxidativo.

## 6. Conclusão

Aqui se demonstra que o extracto aquoso de *V. cylindraceum* possui actividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*, determinada pela diminuição da taxa de crescimento.

Podemos concluir que o extracto de *V. cylindraceum* alterou o padrão de proteínas das células tanto de *S. aureus* como de *L. monocytogenes*, tendo-se verificado uma diminuição na intensidade da maioria das bandas em ambos os microrganismos stressados com extracto, e mesmo o desaparecimento de algumas bandas quando crescidos na presença de extracto de *V. cylindraceum*.

Através da análise proteómica, apresentamos evidências de uma resposta activa ao stress provocado pelo extracto de *V. cylindraceum* por parte das células de *S. aureus* ao nível das proteínas citoplasmáticas, tendo-se verificado a síntese *de novo* de 111 proteínas e o desaparecimento 59 *spots*.

Apesar de mais estudos serem necessários para compreender por completo os mecanismos de resposta do *S. aureus* à acção do extracto aquoso de *V. cylindraceum*, no conjunto, os resultados obtidos mostraram que a regulação do metabolismo do azoto e a indução de enzimas responsáveis pela degradação de aldeídos e outros compostos tóxicos estão envolvidas na resposta observada.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram claramente que extracto de *V. cylindraceum* constitui uma alternativa interessante como biopesticida, muito em particular de espécies agrícolas comestíveis, devido à sua actividade antimicrobiana em relação a microrganismos de origem alimentar, pois para além de contribuir para uma maior segurança alimentar dos produtos pós-colheita, tem a vantagem de ser um produto natural comestível.

## 7. Bibliografia

Adams, M.R., e Moss, M.O. (2008). Food Microbiology. Third edition. The Royal Society of Chemistry. Reino Unido.

Akroum, S., Satta, D., e Lalaoui, K. (2009). Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Algerian Plants. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 31, No. 2, pp. 289-295.

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., e Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, No. 48, pp. 487-491.

Amin, U.S., Lash, T.D., e Wilkinson, B.J. (1995). Proline betaine is a highly effective osmoprotectant for *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, Vol. 163, No. 2, pp. 138-142.

Anderson, N.G., e Anderson, N.L. (1996). Twenty years of two-dimensional electrophoresis: Past, present, and future – Review. *Electrophoresis*, No. 17, pp. 443-453.

Anjos e Silva, S.D., Antunes, L.E.C., Anthonisen, D.G, Lemões, J.S. e Gonçalves, E.D. (2008). Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. *Revista Brasileira Fruticultura*, Vol. 30, No. 1, pp. 180-184.

Apostolodis, E., Kwon, Y.-I., e Shetty, K. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, No. 128, pp. 317-324.

Arsène, F., Tomoyasu, T., Bukau, B. (2000). Review: The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* No. 55, pp. 3–9.

Avery, S.V. (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv. Appl. Microbiol.*No. 49, pp. 111-142.

Bandow, J.E., Brötz, H., Leichert, L.I.O., Labischinski, H., e Hecker, M. (2003). Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 47, No. 3, pp. 948-955.

- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 3, pp. 1-20.
- Berkelman, T., e Stensted, T. (1998). 2-D electrophoresis - Principles and methods. Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia.
- Berkelman, T. (2008). Removal of interfering substances in samples prepared for Two-Dimensional (2-D) Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 424, pp. 51-62(<http://www.springerlink.com/content/q42556hv3589868g/#section=89127&page=1>).
- Binh, L.T.N. (2008). Studying on the protein stress response in *Staphylococcus aureus*. Inaugural dissertation in fulfillment of the academic grade doctor *rerum naturalium* (Dr. rer. nat.) at the Faculty of Mathematics and Natural Sciences of Ernst Moritz Arndt University Greifswald.
- Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, Ø., Rode T. M., e Holck, A. (2007). Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology*, No. 153, pp. 2289–2303.
- Bower, C.K., e Daeschel, M.A. (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, No. 50, pp. 33–44.
- Buchanan, R., Lindquist, R., Ross, T., Smith, M., Todd, E., e Whiting, R. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods – Technical Report. Microbiological Risk Assessment Series 5. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Bremer, E., e Krämer, R. (2000). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, in *Bacterial Stress Responses*, G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp.99–116.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutienė, I., Stackevicienė, E., Nikolajevs, L., e Janulis, V. (2009). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, Vol. 66, No. 4, pp. 399-408.
- Carson, F.L. (1997). Histotechnology – A self-instructional text. 2ª Edição. American Society of Clinical Pathologists Press. Chicago.

- Castillo-Sánchez, L.E., Jiménez-Osornio, J.J. e Delgado-Herrera, M.A. (2010). Secondary metabolites of the annonaceae, solanaceae and meliaceae families used as biological control of insects. Review. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, No. 12, pp. 445-462.
- Chaman, S., Syed, N. A.-I-H., Danish, Z., e Khan, F.Z. (2011). Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial effects of sea buckthorn berries. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol. 24, No. 3, pp. 345-351.
- Chowdhury, R., Sahu, G.K., e Das, J. (1996). Stress response in pathogenic bacteria - Review. *J. Biosci.*, Vol. 21, No. 2, pp 149-160.
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Dussault, D., Sylvain, J.-F., e Lacroix, M. (2011). Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control*, No. 22, pp. 1413-1418.
- Clements, M.O., Watson, S.P., e Foster, S.J. (1999). Characterization of the Major Superoxide Dismutase of *Staphylococcus aureus* and Its Role in Starvation Survival, Stress Resistance, and Pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, Vol. 181, No. 13, pp. 3898–3903.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12, No. 4, pp. 564-582.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A., e Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.*, No. 50, pp. 314-352.
- Cushnie, T.P.T., e Lamb, A.J. (2005). Review: Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, No. 26, pp. 343–356.
- Davis, M.J., Coote, P.J., e O'Byrne, C.P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*, No. 142, pp. 2975-2982.
- Deutscher, J., Kuster, E., Bergstedt, U., Charrier, V., e Hillen, W. (1995). Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15: 1049–1053.

- Doughari, J.H., Human, I.S., Bennade, S., and Ndakidemi, P.A. (2009). Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 3, No. 11, pp. 839-848.
- Dubey, N.K., Srivastava, B., e Kumar, S. (2008). Current status of plant products as botanical pesticides storage pest management. *Journal of Biopesticides*, Vol. 1, No. 2, pp. 182-186.
- Duché, O., Trémolet, F., Namane, A., e Labadie, J. (2002). A proteomic analysis of the salt stress response of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, No. 215, pp. 183-188.
- Ellis, E.M. (2002). MiniReview – Microbial aldo-keto reductases. *FEMS Microbiology Letters*, No. 216, pp. 123-131.
- Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., e Ochocka, J.R. (2003). Antibacterial and antifungal activity of Juniper berry oil and its selected components. *Phytotherapy Research*, No. 17, pp. 227-231.
- Folio, P., Chavant, P., Chafsey, I., Belkorchia, A., Chambon, C., e Hébraud, M. (2004). Two-dimensional electrophoresis database of *Listeria monocytogenes* EGDe proteome and proteomic analysis of mid-log and stationary growth phase cells. *Proteomics*, No. 4, pp. 3187-3201.
- Freeman-Cook, L., e Freeman-Cook, K. (2006). *Deadly Diseases and Epidemics – Staphylococcus aureus* infections. World Health Organization. Chelsea House Publishers.
- Gahan, C.G., O'Driscoll, B., e Hill, C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 9, pp. 3128-3132.
- George, S.M., Lund, B.M. e Brocklehurst, T.F. (1988) The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* No. 6, pp. 153-156.
- Giesbrecht, P., Kersten, T., Maidhof, H., e Wecke, J. (1998). Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, No. 4, pp:1371-1414.

Görg, A. (2007). Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis – A Laboratory Manual. Technical University of Munich.

Graves, P. R., e Haystead, T.A. J. (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 39–63.

Gromova, L., e Celis, J.E. (2006). Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook. 3rd Edition. v.4 Eds: Celis, J.E., Carter N., Hunter T., Simons K., Small J.V. and Shotton D. 2006. Elsevier. Academic Press.

Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F., e Chasteen, N. D. (2007). Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions*, pp. 4951–4961.

Gupta, S., a Dikshit, A.K. (2010). Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides* Vol. 3 (1 Special Issue), pp. 186-188.

Gustafson, J., Strassle, A., Hachler, H., Kayser, F. H., e Berger-Bachi, B. (1994). The femC Locus of *Staphylococcus aureus* Required for Methicillin Resistance Includes the Glutamine Synthetase Operon. *Journal of Bacteriology*, Vol. 176, No. 5, pp. 1460-1467.

Häberle, J., Görg, B., Rutsch, F., Schmidt, E., Toutain, A., Benoist, J-F., Gelot, A., Suc, A-L., Höhne, W., Schliess, F., Häussinger, D., e Koch, H.G. (2005). Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *The New England Journal of Medicine*, No. 353, pp. 1926-1933.

Hamon, M., Bierne, H., e Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews – Microbiology*. Nature Publishing Group.

Hayes, S. A., e Dice, J. F. (1996). Roles of Molecular Chaperones in Protein Degradation. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 132, No. 3, pp. 255-258.

Hecker, M., e Völker, U. (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the  $\sigma^B$  regulon. *Molecular Microbiology*, Vol. 29, No. 5, pp. 1129-1136.

Hecker, M., Engelmann, S., e Cordwell, S.J. (2003). Review: Proteomics of *Staphylococcus aureus* – current state and future challenges. *Journal of Chromatography B*, No. 787, pp. 179-195.

- Helander, I.M., Alakomi, H.L, Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., e von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, No. 9, pp. 3590-3595.
- Hengge-Aronis, R. (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.*, No., 2, pp. 48–152.
- Herbert, K.C., e Foster, S.J. (2001). Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components. *Microbiology*, No. 147, pp. 2275–2284.
- Hill, C., Cotter, P.D., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal* 12, 273–283.
- Hui, J., Choy, J., Suwandarantne, S.P., Shervill, J., Gan, B.S., Howard, J.C., e Reid, G. (2004). Antimicrobial activity of *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) produced proanthocyanidin (PAC) on the growth and adhesion properties of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci. Nutr.*, Vol. 9, pp. 29-33.
- Hurst, A. (1984). Revival of vegetative bacteria after sublethal heating. pp. 77-103. IN M.H.E. Andrew and A.D. Russell (ed). The revival of injured microbes. Academic Press. London.
- Johnson, B.J., Lin, B., Rubin, R.A., e Malanoski, A.P. (2009). Media acidification by *Escherichia coli* in the presence of cranberry juice. *BMC Research Notes*, 2:226.
- Jez, J.M., Bennet, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M., e Penning, T.M. (1997). Review article – Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemistry Journal*, No. 326, pp. 625-636.
- Jin, Y., e Penning, T.M. (2006). Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxification. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 47, pp. 263-292.
- Jones, R.P. (1989). Biological principles of the effects of ethanol: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 10:130–152.
- Kandror, O., Busconi L., Sherman, M., e Goldberg, A.L. (1994). Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 38, pp. 23575-23582.

- Kashket, E.R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 233-244.
- Kim, B.H., e Gadd, G.M. (2008). Bacterial physiology and metabolism. Cambridge university Press. UK.
- Kivanc, M., Akgul, A., e Dogan, A. (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Int. J. Food Microbiol.* No. 13, pp. 81–86.
- Kohler, C., Wolff, S., Albrecht, D., Fuchs, S., Becher, D., Büttner, K., Engelmann, S., e Hecker, M. (2005). Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* in growing and non-growing cells: A physiological approach. *International Journal of Medical Microbiology*, No. 295, pp. 547-565.
- Kregel, K.C. (2001). Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, No. 92, pp. 2177–2186.
- Lacombe, A., Wu, V.C.H., Tyler, S., e Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 139, Issues 1-2, pp. 102-107.
- Laloknam, S., Bualuang, A., Boonburapong, B., Rai, V., Takabe, T., e Incharoensakdi, A. (2010). Salt stress induced glycine-betaine accumulation with amino and fatty acid changes in cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *As. J. Food Ag-Ind.*, 3(01), 25-34.
- Leimgruber, R.M. (2005). Extraction and solubilisation of proteins for proteomic studies. IN: Walker, J.M. (2005). The proteomics protocols handbook. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., e Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment With Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 8, p.4519-4529.
- Levin, D.A., e York, B.M. (1978). The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochem. Syst. Ecol.* Vol. 6, pp. 61-76.

- Lin, Y.T., Labbe, R.G., e Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fish and Meat Systems by Use of Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 9, p. 5672-5678.
- Liu, Y., Black, M.A., Caron, L., Camesano, T.A. (2005). Role of Cranberry Juice on Molecular-Scale Surface Characteristics and Adhesion Behavior of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 20, No. 10, pp. 1-9.
- Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Inves.* No. 111, pp. 1265-1273.
- Lushchak, V. I. (2001). Oxidative Stress and Mechanisms of Protection Against It in Bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 66, No. 5, 2001, pp. 476-489. Translated from *Biokhimiya*, Vol. 66, No. 5, pp. 592-609.
- MacKenzie, R.E. (1984) in *Folates and Pterins: Chemistry and Biochemistry of Folates* (Blakley, R., Benkovic, S., eds) Vol. 1, pp. 255–306, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Magariños, H.L.E., Sahr, C., Selaive, S.D.C., Costa, M.E., Figuerda, F.E., e Pizarro, O.A. (2008). *In vitro* inhibitory effect of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) juice on pathogenic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 44, No. 3, pp: 300-304.
- Maillard, J.-Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 16S–27S.
- Maramorosch, K. (1991). *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors*. CRC Press. Florida.
- McIntyre, L., Hudson, J.A., Billington, C. e Withers, H. (2007). Biocontrol of foodborne bacteria: past, present and future strategies. *Food New Zealand*.
- McMahon, C.M.M., Byrne, C.M., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., e Hegarty, T. (2000). The effect of culture growth phase on induction of the heat shock response in *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, No. 89, pp. 198-206.
- Medeiros, A., Mota, J., e Jaronski, S. (2009). Assessment of Azores *Metarhizium anisopliae* for control of japanese beetle. (Poster). USDA, Agricultural Research service, Secretaria Regional da Agricultura e Florestas, Governo dos Açores.

- Meganathan, R., e Bentley, R. (1979). Menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>) biosynthesis: conversion of o-succinylbenzoic acid to 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid by *Mycobacterium phlei* enzymes. *Journal of Bacteriology*, Vol. 140, No. 1, pp. 92-98.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., and Gibbs, P.A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, No. 21, pp. 213-216.
- Miller, A.J., Bayles, D.O., e Ehlen, B.S. (2000). Cold shock induction of thermal sensitivity in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* No. 66, pp. 4345-4350.
- Miller, I., Crawford, J., e Gianazza, E. (2006). Protein stains for proteomic applications: Which? When? Why? – Review. *Proteomics*, No. 6. Wiley – InterScience. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. JG&A, Weinheim.
- Molan, A.L., Lila, M.A., e Mawson, J. (2008). Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to *in vitro* or *in vivo* antioxidant capacity. *Food Chemistry* No. 107, pp. 1039–1044.
- Monteoliva, L., e Albar, J.P. (2004). Differential proteomics: An overview of gel and nongel based approaches. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, Vol. 3, No. 3, pp. 220-239.
- Maruyama, A., Kumagai, Y., Morikawa, K., Taguchi, K., Hayashi, H., e Ohta, T. (2003). Oxidative-stress-inducible qorA encodes an NADPH-dependent quinone oxidoreductase catalysing a one-electron reduction in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, No. 149, pp. 389–398.
- Nagaraj, S., Lei, Z., Watson, B., Sumner, L., Gallardo, K., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Robert, F., Thiery, O., Valot, B., Mathesius, U., e Oelkers, K. (2007). Proteomics of *Medicago truncatula*. *Medicago truncatula Handbook*.
- Nivsarkar, M., Cherian, B., e Padh, H. (2001). Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. *Current Science*, Vol. 81, No. 6, pp. 667-672.
- Nohynek, L.J., Alakomi, H-L., Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K-M., e Puupponen-Pimiä, R.H. (2006). Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. *Nutrition and Cancer*, Vol. 54, No. 1, pp. 18–32.

- O'Farrel, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 250, No. 10, pp. 4007-4021.
- Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda C, Kamino K, Ohta S. (2003). Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *Neurochem.*, Vol. 84, No. 5, pp. 1110-7.
- Oukomaili, B., e Booth, I.R. (1992). Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for two transport systems and for their possible roles in osmoregulation. *Journal of General Microbiology*, No. 138, pp. 2515-2518.
- Peiris W.I.P. (2005). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Master's thesis. Section of Food-Associated pathogens, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Phan-Thanh, L., e Mahouin, F. (1999). A proteomic approach to study the acid response in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis*, No. 22, pp. 2214-2224.
- Phan-Thanh, L., e Montagne, A. (1998). Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, No. 44, pp. 183–191.
- Pimenta, R.S, Silva, F.L., Silva, F.L., Silva, J.F.M., Morais, P.B., Braga, D.T., Rosa, C.A., e Corrêa Jr., A. (2007). Biological Control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the Predacious Yeast *Saccharomycopsis schoenii* on Oranges. *Brazilian Journal of Microbiology*, No. 39, pp. 85-90.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., e Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Chem.* 272:15661–15667.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meler, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., e Oksman-Caldentey, K.-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, No. 90, pp. 494-507.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H-M., e Oksman-Caldentey, K.-M. (2005). Bioactive berry compounds – novel tools agaisnt human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, No. 67, pp. 8-18.
- Rates, S.M.K. (2001). Plants as source of drugs. Review. *Toxicon*, No. 39, pp. 603-613.

- Rahbar, M. e Diba, K. (2010). Short Communication – *In vitro* activity of cranberry extract against etiological agents of urinary tract infections. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 4, No. 5, pp 286-288.
- Rauha, J-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., e Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effect of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, No. 56, pp. 3-12.
- Rehcgigl, J.E. e Rehcgigl, A.N. (2000). Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. CRC Press LLC. Estados Unidos América.
- Reddy, P. M., Ho, Y-P., e Ravinder, V. (2009). Review on Identification of Proteins of Microorganisms by Two-dimensional gel electrophoresis-Mass spectrometry (2-DE-MS). *International Journal of PharmTech Research*, Vol.1, No.3, pp. 764-772.
- Rhodes, P.L. (2004). Antimicrobial factors from grapes. Tese de doutoramento. Universidade de Auckland. Nova Zelândia.
- Reid, G., Hsiehl, J., Potter, P., Mighton, J., Lam, D., Warren, D., e Stephenson, J. (2001). Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients. *Spinal Cord*, No. 39, pp. 26 - 30.
- Rios, J.L., and Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. Review. *Journal of Ethnopharmacology*, No. 100, pp. 80-84.
- Roccaro, A.S., Blanco, A.R., Giuliano, F., Rusciano, D., e Enea, V. (2004). Epigallocatechin-Gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 48, No. 6, pp. 1968-1973.
- Roller, S. (1999). Physiology of food spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, No. 50, pp. 151-153.
- Russell, A.D., Furr, J.R., e Maillard, J-Y. (1997). Microbial susceptibility and resistance to biocides. *ASM News*, Vol. 63, No. 9, pp. 481-487.
- Russell, A.D., e Day, M.J., 1996. Antibiotic and biocide resistance in bacteria. *Microbios*, No. 85, pp. 45–65.

- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., e Jabbar, A. (2010). Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug Candidates. *Nat. Prod. Rep.*, No. 27, pp. 238–254.
- Saklani-Jusforgues, H., Fontan, E., Goossens, P.L. (2000). Effect of acid-adaptation on *Listeria monocytogenes* survival and translocation in murine intragastric infection model. *FEMS Microbiology Letters*, No. 193, pp. 155-159.
- Sanz, R., Marín I., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Orden, J. A., Cid, D., Diez, R.M., Silhadi, K. S., Amils, R. e Fuente, R. de la. (2000). Catalase deficiency in *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* is associated with natural loss-of-function mutations within the structural gene. *Microbiology*, No. 146, pp. 465–475.
- Scherl, A., François, P., Bento, M., Deshusses, J.M., Charbonnier, Y., Converset, V., Huyghe, A., Walter, N., Hoogland, C., Appel, R.D., Sanchez, J.C., Zimmermann-Ivol, C.G., Corthals, G.L., Hochstrasser, D.F., e Schrenzel, J. (2005). Correlation of proteomic and transcriptomic profiles of *Staphylococcus aureus* during the post-exponential phase of growth. *Journal of Microbiological Methods*, No. 60, pp. 247-257.
- Sianglum, W., Srimanote, P., Wonglumsom, W., Kittiniyom, K., Voravuthikunchai, S. P. (2011). Proteome Analyses of Cellular Proteins in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Treated with Rhodomyrton, a Novel Antibiotic Candidate. *PLoS ONE*, Volume 6, Issue 2, e16628.
- Shupien, K. (2006). Evaluation of chemical composition of fresh and frozen blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, Vol. 5, No. 1, pp. 19-25.
- Sjörgren, E. (2000). *Plants and Flowers of the Azores*. Secretaria Regional do Ambiente, Direcção Regional da Cultura, Açores.
- Smirnova, G.V., e Oktyabrsky, O.N. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 70, No. 11, pp. 1199-1211.
- Snyder, W.E., Garrett, M. Clevenger, G.M. e Eigenbrode, S.D. (2004). Intraguild predation and successful invasion by introduced ladybird beetles. *Oecologia*, No. 140, pp. 559–565.

- Song, E.J., Kim, Y.S., Chung, J.Y., Kim, E., Chae, S-K., e Lee, K-J. (2000). Oxidative modification of nucleoside diphosphate kinase and its identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Abstract. *Biochemistry*, Vol. 39, No. 33, pp. 10090-10097.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., e Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Rev*, No. 31, pp. 425-448.
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*, No. 30, pp. 3268 – 3295.
- Tissot, J.-D., e Schneider, P. (2000). Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. II / *ELECTROPHORESIS/ Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, pp. 1364-1371. Copyright 2000 Academic Press.
- Titgemeywer, F., e Hillen, W. (2002). Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Leewenhoek* 82:52–71.
- Trémolet, F., Duché, O., Namane, A., Martinie, B., e Labadie, J.C. (2002). Comparison of protein patterns of *Listeria manocyctogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. *FEMS Microbiology Letters*, No. 210, pp. 25-31.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., e Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 1561–1568.
- US Highbush Blueberry Council (2005). Composition of blueberries. [www.blueberry.org](http://www.blueberry.org).
- Valderas, M.W., e Hart, M.E. (2001). Identification and Characterization of a Second Superoxide Dismutase Gene (*sodM*) from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 183, No. 11. pp. 3399–3407.
- Van Immerseel, F., Russel, J.B., Flythe, M.D., Gantois, L., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. e Ducatelle, R. (2006). The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, Vol. 35, No. 03, pp. 182-188.
- Vattem, D.A., Ghaedian, R., e Shetty, K. (2005). Enhancing health benefits of berries through phenolics antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac J Clin Nutr.*, Vol. 14, No. 2, pp. 120-130.

- Vihinen, M. (2001). Bioinformatics in proteomics - Review. *Biomolecular Engineering*, No. 18, pp. 241-248.
- Vilhelmsson, O., e Miller, K.J. (2002). Synthesis of pyruvate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* is stimulated by osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 5, pp. 2353-2358.
- Volk, W.A., Gebhardt, B.M., Hammarskjold, M.L., e Kadner, R.J., (1996). Antibiotic action and resistance: bacterial cell surfaces; and mechanisms of antibiotic action. *In: Essentials of Medical Microbiology*, 5th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 253–265, pp. 266–284.
- Yousef, A.E., e Courtney, P.D. (2003). Basics of stress adaptation and implications in new-generations foods. *In: Yousef, A. E., e Juneja, V.K. (2003). Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. CRC Press. EUA.
- Weber, H., Engelmann, S., Becher, D., e Hecker, M. (2004). Oxidative stress triggers thiol oxidation in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, Vol. 52, No. 1, pp. 133–140.
- Wei, Y., Lin, M., Oliver, D.J., e Schnable, P.S. (2009). The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the PDH bypass of Arabidopsis. *Biochemistry*, Vol. 10, No. 7.
- Wesche, A., Gurtler, J.B., Marks, B.P., e Ryser, E.T. (2009). Review Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, No. 5, pp. 1121-1138.
- Westermeier, R., e Marouga, R. (2005). Protein detection methods in proteomics research. *Bioscience Reports*, Vol. 25, No. 1/2.
- Wink, M. (2010). Biochemistry of plant secondary metabolism – second edition. *Annual Plant Reviews*, Vol. 40. Willey-Blackwell.
- Wojcik, J., e Schachter, V. (2000). Proteomics databases and software on the web. *Briefings in Bioinformatics*, Vol. 1, Issue 3, pp. 250-259.
- Wu, V.C-H., Qiu, X., Bushway, A., e Harper, L. (2008). Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT - Food Science and Technology* No. 41, pp. 1834-1841.

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo I

Quadro 1: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos *spots* comuns a ambos os tratamentos, “controlo” e “stress”.

Controlo ( <i>spot</i> )	% volume	Stress ( <i>spot</i> )	% volume	pI (pH)	MW (KDa)
1	0,207401	8	0,129191	5,02874	116
2	0,0993755	10	0,0982096	5,02559	112
3	0,180954	9	0,2045	5,09765	110
4	0,21298	12	0,14628	5,00231	102
5	0,0385306	31	0,0071368	3,97944	100
9	2,58812	16	2,31823	5,02203	97
10	0,0051043	14	0,0026328	5,10286	98
17	0,221201	29	0,214485	5,03713	89
18	0,186916	27	0,0064413	5,0428	89
21	0,0929387	49	0,0112102	4,01611	85
22	0,650417	33	0,690572	5,01846	82
24	1,08442	36	1,05241	5,04406	79
26	1,22277	63	0,746986	4,01	77
31	1,13544	46	1,03222	4,96944	78
34	0,721827	43	0,202314	5,03545	76
40	0,0245503	44	0,0137603	5,20571	73
41	0,553117	64	0,171945	4,82889	73
47	0,135727	59	0,317795	5,02434	72
49	0,104028	58	0,300358	5,02853	71
53	0,415338	51	0,0112599	5,05601	71
54	0,341987	61	0,164196	5,03587	71
56	0,88619	57	0,0647114	5,0449	71
60	1,00694	76	0,72508	4,78	68
67	1,71976	79	1,32028	5,01657	66
71	0,108861	92	0,0075177	5,00776	66
72	0,0428896	80	0,0898972	5,03168	66
81	0,087473	85	0,0564155	5,05497	65
83	0,043138	86	0,0021858	5,06235	64
86	0,101792	102	0,11702	5,00902	64
87	0,0235113	127	0,0129986	4,01611	63
88	1,13062	104	0,706356	5,04175	62
89	0,274954	106	0,235498	5,03587	63
90	0,502275	98	0,311022	5,05392	62
92	0,626065	119	0,488482	5,00189	62
99	0,310837	131	0,0414299	4,7713	62

Quadro 1: Continuação.

<b>Controlo (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>Stress (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
101	0,0163744	140	0,0194896	4,00389	62
103	0,010841	112	0,0037257	5,02434	62
104	0,203968	96	0,0204665	5,21143	62
106	0,75756	124	0,618464	5,03042	61
107	0,11252	125	0,0916689	5,03524	61
109	0,679886	142	0,158619	4,48056	61
116	0,0616128	134	0,0302362	5,00818	60
117	0,501259	94	0,408788	5,45857	60
118	0,324167	136	0,164411	5,00336	60
119	1,24351	148	1,25382	5,00021	58
120	0,291441	130	0,259	5,04993	59
122	0,136912	110	0,0405026	5,10429	59
124	0,0064142	135	0,0156645	5,0214	59
126	0,102244	133	0,0801606	5,0535	58
127	0,0356848	132	0,0392441	5,05685	58
135	0,388265	201	0,362703	4,02833	54
140	1,06721	171	0,933344	5,05182	53
143	0,140616	138	2	5,26429	54
146	2,25357	167	2,57219	5,03231	52
147	2,42817	194	2,36071	4,78611	53
149	5,71307	176	5,44089	5,01888	51
153	0,161755	163	0,0151181	5,05811	53
155	0,747769	183	0,86003	5,00587	52
165	0,0425056	168	0,0435659	5,10429	52
175	0,105812	137	0,0692319	5,54429	50
179	0,0306709	173	0,0847143	5,11639	50
180	0,0145224	177	0,137023	5,10429	50
189	0,169909	219	0,0897316	5,03692	49
190	0,258489	211	0,134953	5,04301	48
192	0,349689	195	0,329684	5,0514	48
196	0,183777	547	0,162744	5,11745	48
197	0,255824	188	0,130836	5,17429	47
203	0,469436	230	0,483613	5,05895	46
204	0,551624	212	0,24737	5,31429	46
206	0,449042	548	0,509592	5,25286	46
207	0,489198	245	0,456371	5,04007	45
215	0,177001	247	0,229239	5,04804	44
217	1,23926	259	0,894731	5,03441	44
221	0,031484	252	0,157871	5,05706	44
222	4,28121	253	3,93911	5,11781	45
224	0,466952	243	0,403999	5,22857	43
229	0,559303	274	0,562616	5,00441	43

Quadro 1: Continuação.

<b>Controlo (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>Stress (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
230	0,644861	249	0,463769	5,19125	43
235	0,0292706	238	0,0760951	5,44857	42
238	3,2332	323	3,49259	5,03524	40
242	0,0452836	291	0,409243	5,01741	40
249	0,0803812	294	0,165835	5,17286	39
250	0,947633	337	1,16457	5,02161	38
254	0,0453514	289	0,0918508	5,33	38
256	1,70915	296	2,22776	5,30143	36
257	0,114395	317	0,108294	5,1	37
258	0,247377	313	0,307578	5,20857	37
265	1,13018	374	1,55887	5,00545	36
266	0,573345	349	0,648505	5,03189	37
270	0,706413	375	0,454801	4,98167	36
279	0,107461	332	0,234753	5,26	36
281	0,328684	286	0,527315	5,50571	35
282	1,48474	367	0,242966	5,04594	36
289	1,3029	363	1,00427	5,06	34
291	2,13577	331	2,32136	5,11	35
293	0,112294	384	0,0498748	5,00692	34
297	0,0740573	389	0,0564155	5,00042	34
301	0,198638	354	0,235349	5,3	34
303	0,517139	380	0,413822	5,1	33
304	0,0659718	364	0,126111	5,33571	33
305	0,108613	326	0,0483514	5,5	33
306	1,14646	385	1,52181	5,02622	33
313	0,0140707	379	0,0172873	5,26429	33
314	0,0563504	382	0,122601	5,1725	33
316	0,0697209	401	0,0958748	5,00084	33
321	2,32279	402	2,56067	5,02748	32
322	0,0233532	393	0,0496926	5,22857	32
323	0,0094181	381	0,0116904	5,49857	32
326	3,02858	412	3,95412	5,05706	32
327	0,172304	417	0,155056	5,03357	32
328	0,201077	420	0,18453	5,04573	32
337	0,0304224	550	0,0941807	5,26143	32
339	0,0471808	424	0,0547265	5,02203	31
340	0,647522	541	0,614707	5,02601	31
342	0,0638713	418	0,0706228	5,57	31
343	0,0282768	440	0,0078157	4,41333	31
345	0,0245728	540	0,0855205	5,02601	30
346	0,0816686	539	0,161364	5,02769	30
348	0,0143869	432	0,096471	5,23857	30

Quadro 1: Continuação.

<b>Controlo (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>Stress (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
351	2,6615	441	3,10923	5,01657	29
356	0,143304	430	0,233776	5,50143	29
360	0,0309419	452	0,118428	5,02538	29
361	0,0962813	446	0,154327	5,05224	29
363	0,312355	461	0,293553	5,00545	28
364	0,51944	454	0,511066	5,03189	28
366	0,218784	448	0,165173	5,35571	28
369	0,663973	468	0,900945	5,01888	27
372	0,593132	467	0,791171	5,02727	27
373	0,0077919	458	0,0310972	5,05245	27
374	1,36121	466	1,02489	5,0107	28
376	0,359197	485	0,169644	4,77217	27
377	0,0198073	464	0,0676092	5,05727	27
378	0,634422	492	0,4907	4,76783	26
379	0,0797262	489	0,0961232	5,00441	26
381	0,0029135	472	0,132735	5,10571	26
382	0,420155	473	0,452649	5,32	25
383	0,0682981	498	0,0745804	4,89	26
384	0,224047	476	0,969356	5,08588	25
385	1,32577	480	1,67364	5,04972	25
386	0,270843	503	0,10018	4,58444	25
388	0,735943	499	1,40726	5,02455	25
392	0,0490328	482	0,21013	5,26857	25
393	0,132757	490	0,240565	5,05455	24
394	0,349621	493	0,430245	5,22857	24
396	0,0284575	496	0,0653572	5,10143	24
398	0,0056915	504	0,0212448	5,0449	23
399	0,53866	501	0,748006	5,05056	23
400	0,406378	509	0,106621	4,56611	22
402	0,582002	508	0,521748	5,00315	21
403	0,201823	505	0,322895	5,48429	21
404	0,0954231	510	0,196072	5,01406	21
407	1,84729	512	2,59887	5,01364	20
408	0,0433413	521	0,0851614	4,86556	18
410	2,79988	524	3,47383	4,85944	16
415	0,697842	532	0,0369756	4,03444	14
417	0,079139	533	0,061499	3,94889	14
418	0,127088	530	0,0456358	5,03168	14
425	0,511309	65	0,395273	5	72
426	0,426075	537	0,603733	5,0107	28
430	0,569693	544	0,641328	5,03168	49
431	0,753257	162	0,320162	5,04427	53

Quadro 1: Continuação.

<b>Controlo (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>Stress (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
432	0,549637	546	0,621542	5,02371	40
433	0,10759	303	0,0988885	5,04909	41
434	1,20012	436	0,843639	5,0493	30
435	0,313706	362	0,280458	5,17042	34
436	0,136197	261	0,132726	5,11745	42

Quadro 2: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos *spots* presentes apenas no tratamento “controlo”.

<b>Controlo (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
6	0,0531433	5,54714	100
16	0,0171423	5,10286	89
20	0,0757738	3,83278	88
37	0,743577	5,18708	74
38	0,151932	5,11461	74
45	0,0205881	5,01825	72
62	0,452499	5,04636	69
73	0,0091922	5,03608	66
75	0,069992	3,79611	65
78	1,02405	5,0451	65
84	0,0278703	3,87556	64
85	0,048039	4,03444	64
91	0,0238501	4,02833	63
97	0,0581572	5,19571	62
98	0,0298804	5,59286	62
111	0,0070918	5,29143	61
112	1,1424	5,04783	61
121	0,003162	5,23	59
123	0,100293	5,90143	58
125	0,207717	5,37286	58
129	0,0310097	3,80833	57
130	0,0169842	4,76957	57
132	0,036114	4,84111	57
136	0,0226531	5,46	55
139	0,338577	5,03734	54
141	0,0240308	5,46857	54
142	0,0367238	5,05769	54
166	0,0221562	5,46857	52
171	0,0579088	5,47429	51
176	0,117579	4,01611	50

Quadro 2: Continuação.

<b>Controlo (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
178	0,131632	5,04427	51
184	0,0901833	5,48	49
188	0,0063917	5,59	49
194	0,183777	5,11426	48
198	0,255824	4,02222	47
201	0,281639	5,47	47
202	0,0039073	5,02748	47
226	0,469436	4,01611	44
237	0,559303	4,01	41
247	3,2332	5,20571	40
253	0,0803812	5,0407	38
267	0,0453514	5,1139	36
268	0,23543	5,37143	36
271	0,706413	5,45	36
286	0,107461	5,21429	35
290	1,3029	5,05077	34
298	0,196876	5,0472	34
317	0,0438156	5,38857	33
341	0,0661299	4,29111	31
344	0,007137	5,26429	30
380	0,0240534	5,72143	26
391	0,0196267	5,23429	25
395	0,230131	4,26667	24
413	0,263636	4,76957	15
416	0,0542951	4,48056	14
419	0,173613	4,18111	13
420	0,0908156	4,30333	13
421	0,188542	4,36444	13
422	0,123248	4,23	13

Quadro 3: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos *spots* presentes apenas no tratamento “stress”.

<b>Stress (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
11	0,0696293	5,02259	112
20	0,283018	4,09486	95
21	0,0448906	4,59143	95
23	0,012684	4,50343	95
24	0,140635	4,40914	95
28	0,0141742	5,555	95

Quadro 3: Continuação.

Stress ( <i>spot</i> )	% volume	pI (pH)	MW (KDa)
32	0,0055306	6,83	88
34	0,0146379	5,11746	84
41	0,0132635	5,11844	83
42	0,0083456	4,05714	81
45	0,0452384	5,04709	81
47	0,0393931	5,01443	80
48	0,0165256	5,05639	80
50	0,0290274	5,01709	80
52	0,0213773	5,01044	80
53	0,0275206	5,01861	80
56	0,0041562	5,03892	78
60	0,132602	5,03076	74
62	0,112301	5,0488	74
68	0,0271397	4,39029	72
69	0,0259144	4,44057	72
70	0,024126	5,03019	72
71	0,0130483	4,59771	72
72	0,038234	5,05335	71
73	0,0405688	5,04861	71
74	0,634715	5,03759	68
75	0,365881	5,04329	69
81	0,0556538	5,01063	67
82	0,345961	5,03285	64
83	0,278153	5,05089	67
87	0,0583032	4,05714	64
88	0,142339	5,02829	65
89	0,311923	5,04405	64
97	0,0140252	4,05714	60
100	0,0091238	5,08095	59
101	0,0708215	5,395	59
103	0,0076998	5,01747	59
111	0,0091073	5,11844	57
115	0,742124	5,05203	56
123	0,172093	5,9	57
128	0,0028315	5,04386	55
139	0,0333327	5	53
141	0,0125515	5,01728	53
144	0,440051	5,03171	52
146	0,0928138	6,225	52
147	0,0054975	6,01	52
151	0,0143067	5,01728	52
152	0,0139424	5,01443	51

Quadro 3: Continuação.

Stress ( <i>spot</i> )	% volume	pI (pH)	MW (KDa)
155	0,125697	5,05981	51
156	0,0644763	5,08667	51
157	0,0214435	5,11746	51
164	0,0528222	5,11325	50
165	0,0177012	5,11779	50
170	0,124256	5,04158	49
174	0,069679	5,17304	49
180	0,106704	5,05089	48
196	0,0510008	5,05886	47
218	0,0529713	6,7	47
244	0,0611016	5,02734	45
250	0,0755573	5,0019	44
251	0,0473579	5,02772	44
255	0,035121	5,05297	43
258	0,0356343	5,705	43
267	0,0076832	5,01899	42
280	0,0262455	5,04443	41
316	0,0206487	4,18914	38
319	0,0833068	4,05714	38
322	0,0539317	4,13257	38
334	0,0683709	5,0412	37
335	0,439484	5,01044	36
338	0,051895	4,05714	36
344	0,97847	5,05013	35
348	0,258779	5,04177	35
370	0,0226192	5,03513	34
372	0,0592801	4,05086	34
373	0,0204665	5,37	34
378	0,330212	5,04918	34
390	0,0224867	5,05639	33
399	0,016211	5,01367	32
419	0,005779	6,875	32
423	0,0225861	5,06762	31
425	0,0041231	5,375	31
426	0,039211	5,04576	31
428	0,0566804	3,80571	31
429	0,0750771	5,11649	31
431	0,008743	5,11357	30
433	0,153483	5,00171	30
434	0,0988885	5,05146	30
437	0,119737	5,11487	30
442	0,014257	5,04652	29

Quadro 3: Continuação.

<b>Stress (spot)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
450	0,0477387	4,05714	29
453	0,0663176	5,73	28
457	0,0077826	5,02639	28
459	0,0049676	5,06762	28
463	0,0538489	5,1	27
474	0,115878	5,05791	27
475	0,0111274	6,335	27
477	0,0034939	5,01937	26
483	0,614261	5,04443	26
484	0,270243	5,37	26
488	0,0601955	5,0281	26
497	0,0088092	6,655	25
502	0,0017552	6,695	24
506	0,0043549	7,03	23
518	0,0110447	6,6	19
520	0,0105479	5,03608	18
528	0,0037423	7,445	16
531	0,0052657	7,35	14
534	0,0171879	5,05658	14
535	0,0844494	4,54743	14
551	0,179627	5,895	58

## 8.2. Anexo II

Quadro 4: Identificação, percentagem de volume, pI e peso molecular dos *spots* cuja a sua percentagem de volume é igual ou superior a 2.

<b>Controlo (<i>spot</i>)</b>	<b>% volume</b>	<b>Stress (<i>spot</i>)</b>	<b>% volume</b>	<b>pI (pH)</b>	<b>MW (KDa)</b>
9	2,58812	16	2,31823	5,02203	97
146	2,25357	167	2,57219	5,03231	52
147	2,42817	194	2,36071	4,78611	53
149	5,71307	176	5,44089	5,01888	51
143	0,140616	138	2	5,26429	54
222	4,28121	253	3,93911	5,11781	45
238	3,2332	323	3,49259	5,03524	40
256	1,70915	296	2,22776	5,30143	36
291	2,13577	331	2,32136	5,11	35
321	2,32279	402	2,56067	5,02748	32
326	3,02858	412	3,95412	5,05706	32
351	2,6615	441	3,10923	5,01657	29
407	1,84729	512	2,59887	5,01364	20
410	2,79988	524	3,47383	4,85944	16
247	3,2332	-	-	5,20571	40

### 8.3. Anexo III

Quadro 5: Identificação, pI, peso molecular e número de acesso na database NCBI dos *spots* identificados por comparação com o perfil proteico de *S. aureus* estabelecido por Scherl *et al.* (2005) e publicado na database *SWISS 2DPAGE*.

Nº <i>spot</i>	Controlo ( <i>spot</i> )	Stress ( <i>spot</i> )	pI (pH)	MW (kDa)	Número de acesso (NCBI)
1	47	59	5,02434	72	P99110
2	60	76	4,78	68	P99083
3	119	148	5,00021	58	Q99W05
4	124	135	5,0214	59	Q7A808
5	143	138	5,26429	54	Q99W73
6	155	183	5,00587	52	Q7A825
7	204	212	5,31429	46	P99177
8	207	245	5,04007	45	P99068
9	257	317	5,1	37	P60298
10	271	-	5,45	36	Q7A742
11	289	363	5,06	34	P99116
12	290	-	5,05077	34	P99116
13	291	331	5,11	35	P99171
14	301	354	5,3	34	P99127
15	303	380	5,1	33	Q7A627
16	326	412	5,05706	32	P60798
17	344	-	5,26429	30	Q7A6A9
18	348	432	5,23857	30	Q7A5H1
19	356	430	5,50143	29	P99125
20	382	473	5,32	25	P99162
21	422	-	4,23	13	P99143
22	436	261	5,11745	42	P99134
23	-	151	5,01728	52	Q7A825
24	-	156	5,08667	51	P99095
25	-	373	5,37	34	Q7A697