UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Bacillus cereus* produtor de substâncias semelhantes a
bacteriocinas (BLIS): isolamento, caracterização preliminar e
aplicação de extrato semi-purificado contendo BLIS para inibição
de *Listeria monocytogenes* em polpa de fruta**

Juliana Abigail Leite

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Bacillus cereus* produtor de substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS): isolamento, caracterização preliminar e aplicação de extrato semi-purificado contendo BLIS para inibição de *Listeria monocytogenes* em polpa de fruta**

Juliana Abigail Leite

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

***Bacillus cereus* produtor de substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS): isolamento, caracterização preliminar e aplicação de extrato semi-purificado contendo BLIS para inibição de *Listeria monocytogenes* em polpa de fruta**

Dissertação de Mestrado apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Juliana Abigail Leite

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 27/09/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Leite, Juliana Abigail

Bacillus cereus produtor de substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS): isolamento, caracterização preliminar e aplicação de extrato semi-purificado contendo BLIS para inibição de *Listeria monocytogenes* em polpa de fruta. Ribeirão Preto, 2012. 101 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: De Martinis, Elaine Cristina Pereira

1. Substância semelhantes a bacteriocinas (BLIS) 2. Isolamento de *Bacillus cereus* produtor de BLIS 3. Polpa de fruta 4. *Listeria monocytogenes*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Juliana Abigail Leite

Título do trabalho: *Bacillus cereus* produtor de substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS): isolamento, caracterização preliminar e aplicação de extrato semi-purificado contendo BLIS para inibição de *Listeria monocytogenes* em polpa de fruta

Dissertação de Mestrado apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as oportunidades que colocou em meu caminho para que pudesse sonhar, realizar, perder, compartilhar, lutar e aprender em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Aparecida Jandira e Abelardo por toda dedicação, amor e palavras de apoio e incentivo durante todos os anos de minha vida.

Ao Vinicius, meu esposo, por ter investido nos meus sonhos como se fossem seus, e acima de tudo ao amor e ao respeito de todos esse anos.

A minha querida avó Jandira que sempre pediu por mim em suas orações diárias para que conseguisse concluir mais essa etapa de minha vida.

A minha irmã Andriza que mesmo de longe acompanhou com atenção todo esse caminho.

Aos queridos amigos do laboratório de microbiologia de alimentos, Vanessa, Aline, Fabrício, Fernanda, Lizziane e Eliane. Agradeço-lhes por todo companheirismo, amizade, conselhos e acima de tudo, pela colaboração inestimável na elaboração e conclusão desse trabalho.

Às amigas Tereza e Maria Aparecida pelo carinho e pelas palavras de incentivo na elaboração desse trabalho.

À Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, pelos ensinamentos constantes e pela confiança depositada em mim.

Ao Dr. Leon Rabinovitch curador da Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCG) e à Msc. Jeane Quintanilha Chaves do Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro,

Brasil) pela colaboração e disponibilidade em ajudarem na identificação das linhagens bacterianas.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) pela disponibilização de suas instalações para realização da identificação das linhagens bacterianas.

Ao Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira, à Dra. Cláudia Regina Fernandes de Souza e ao técnico Msc. Marcelo Luís Lombardi Martinez do Laboratório de Processos Farmacêuticos da FCFRP-USP pela agradável convivência e ajuda durante a preparação das amostras. E ao aluno Msc. Diego Francisco Cortés Rojas pela gentileza de ter feito a correção do resumo em língua espanhola.

Ao Laboratório de Tecnologia Enzimática da FCFRP - USP, em especial ao Prof. Hamilton Cabral e à Msc. Nathalia Gonsales da Rosa pela valiosa colaboração e disponibilidade em ajudarem tanto na extração da BLIS em resina SP-Sepharose “Fast Flow” como na eletroforese para estimar a massa molecular da BLIS.

À todos os funcionários do Serviço de Pós-graduação da FCFRP-USP pela colaboração durante esse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pela contribuição na elaboração e execução desse trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pela disponibilização de suas instalações para execução desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de estudos no início do mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc.147575/2010-9) pela concessão de bolsa de estudos.

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

Fernando Pessoa

RESUMO

LEITE, J. A. ***Bacillus cereus* produtor de substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS): isolamento, caracterização preliminar e aplicação de extrato semi-purificado contendo BLIS para inibição de *Listeria monocytogenes* em polpa de fruta.** 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores têm aumentado a demanda por frutas frescas e polpas de frutas. Com isso, a busca por novos compostos com atividade antimicrobiana é de grande interesse, já que a aplicação de aditivos químicos convencionais em alimentos tem sido reavaliada devido à potencial toxicidade de alguns desses compostos. As bacteriocinas ou BLIS, produzidas por diferentes gêneros bacterianos, têm despertado grande interesse industrial para aplicação em alimentos em processos de bioconservação. No presente trabalho, foram obtidos 3 isolados bacterianos (A, B e C) a partir de polpa de abacaxi, produtores de substância antagonista frente a diferentes linhagens de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus* sp. A natureza proteica das substâncias antagônicas produzidas pelos isolados foi confirmada pela sensibilidade à enzima α - quimotripsina. As linhagens foram identificadas através de provas bioquímicas e moleculares como *Bacillus cereus*, com a colaboração da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). Para estudos mais detalhados da BLIS foi selecionado o isolado C denominado *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640. A melhor condição de incubação para produção da BLIS foi a 30°C/24 horas, em caldo MRS. A BLIS apresentou estabilidade térmica por até 30 minutos a 80°C e em ampla faixa de pH frente a *L. monocytogenes*. A purificação da BLIS foi realizada com resina Amberlite XAD-16 e de troca catiônica SP-Sepharose "Fast Flow", tendo o extrato apresentado um fator de purificação de 4,1 vezes e rendimento de 30%. O extrato obtido foi liofilizado e uma alíquota foi analisada por SDS-PAGE, o que permitiu a estimativa da massa molecular da BLIS de 25 kDa. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 2 mg/mL foi determinada frente ao indicador *L. monocytogenes* e esta concentração de extrato foi aplicada em sistema modelo contendo polpa de abacaxi. A BLIS teve ação bactericida inibindo completamente *L. monocytogenes* por 24h/37°C. Neste sentido, a aplicação da BLIS na área de alimentos e outras áreas farmacêuticas poderá ser explorada em outros trabalhos.

Palavras-chave: substância semelhante a bacteriocinas (BLIS), *Bacillus cereus*, polpa de fruta, *Listeria monocytogenes*

ABSTRACT

LEITE, J. A. ***Bacillus cereus* producing bacteriocin-like substances (BLIS): isolation, preliminary characterization and application of semi-purified extract containing BLIS for inhibiting *Listeria monocytogenes* in fruit pulp.** 2012. 101 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Changes in habits of consumers, with preference for healthy foods, have increased the demand for fruits and fruit pulps. Thus, there is great interest in searching new compounds with antimicrobial activity, since the application of conventional additives in foods is of concern due to the toxicity of some of these compounds. The bacteriocins or BLIS, produced by different bacteria genera, have increased the interest for its industrial application in food technology in processes of biopreservation. In this study, three isolates were obtained (A, B and C) from pineapple pulp, which produce antagonistic substances with activity against *Listeria monocytogenes* and *Bacillus* sp. The proteinaceous nature of the antagonistic substance produced by the isolates was confirmed by susceptibility to the enzyme α - chymotrypsin. The strains were identified by biochemical and molecular tests as *Bacillus cereus*, in collaboration with Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil). Isolate C of *Bacillus cereus* was named LFB-FIOCRUZ 1640. The best condition of incubation for the BLIS production was 30°C for 24 hours in MRS broth. The BLIS was thermostable (up to 30 minutes at 80°C) and it was partially stable in the range of pH 2 to 9. The purification of the BLIS was performed with Amberlite XAD-16 and cation-exchange SP-Sepharose "Fast Flow" resins. The extract presented a purification factor of 4.1 times and 30% of yield. The extract was lyophilized and analyzed by SDS-PAGE. The molecular mass of the BLIS was estimated as 25 kDa. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of 2 mg/mL was determined with the indicator *L. monocytogenes*, and this concentration of extract was applied in a model system containing pineapple pulp. The BLIS had bactericidal action which completely inhibited *L. monocytogenes* for 24h/37°C. The BLIS of *B. cereus* 1640 presents potential for application as an antimicrobial in food and other pharmaceutical areas.

Key-words: bacteriocin-like substance (BLIS), *Bacillus cereus*, fruit pulp, *Listeria monocytogenes*

RESUMEN

LEITE, J. A. ***Bacillus cereus* productoras de bacteriocina sustancias similares (BLIS): aislamiento, caracterización preliminar y la aplicación de semi-extracto purificado BLIS que contienen, por inhibición de *Listeria monocytogenes* en la pulpa de la fruta.** 2012. 101 f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

En la actualidad, los cambios en los hábitos alimenticios de los consumidores han incrementado el consumo de frutas y pulpas de frutas. Así, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana es de gran interés, ya que la aplicación de aditivos químicos convencionales en los alimentos ha sido reevaluada debido a la toxicidad potencial de algunos de estos compuestos. Las bacteriocinas y/o BLIS producido por diferentes géneros bacterianos ha despertado gran interés para aplicación industrial de tecnología de alimentos en los procesos de bioconservação. En el presente estudio, se obtuvieron tres cepas de bacterias (A, B y C), a partir de pulpa de piña, la productores de sustancia antagonista frente a diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus* sp. La naturaleza proteica de la sustancia antagonista producida por las cepas fue confirmada por la sensibilidad a la enzima α - quimotripsina. Las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y moleculares como *B. cereus*, en colaboración con la Fundación Oswaldo Cruz (Río de Janeiro, Brasil). Para estudios más detallados de los BLIS fue seleccionado el aislado C, llamado *B. cereus* LF-FIOCRUZ 1640. Las condiciones óptimas de incubación para la producción de BLIS fueron de 30°C durante 24 horas en caldo MRS. La BLIS mostró una estabilidad térmica de hasta 30 minutos a 80°C en frente un amplio rango de pH. La purificación de la BLIS se realizó en resina Amberlite XAD-16 y de intercambio catiónico SP-Sepharose "Fast Flow", teniendo el extracto presenta factor tuvo un de purificación de 4,1 veces y 30% de rendimiento. El extracto obtenido fue liofilizó y una alícuota fue analizada por SDS-PAGE lo que permitio estimar la masa molecular de la BLIS de 25 kDa. La Concentración Bactericida Mínima (MBC) de 2mg/ml fue determinada en contra com indicador *L. monocytogenes*, y esta concentración de extracto fue aplicada en el sistema modelo que contenia pulpa de piña. La BLIS tuvo acción bactericida por la inhibición por completo de *L. monocytogenes* a 24h/37°C. La aplicación de la BLIS en el área de alimentos y otras áreas farmacêuticas poderá ser evaluada en otros estudios.

Palabras clave: sustancias similares a bacteriocinas (BLIS), *Bacillus cereus*, pulpa de fruta, la *Listeria monocytogenes*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da técnica empregada para o isolamento de bactérias produtoras de BLIS, a partir de polpas de frutas. AP (Água peptonada), ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharpe).....14
- Figura 2.** Representação esquemática do ensaio “spot-on-the-lawn”. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar TSA-YE (soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura), ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico).....16
- Figura 3.** Representação esquemática do ensaio para determinação da natureza proteica da substância antagônica, produzida pelo isolado obtido a partir de polpa de fruta, frente ao indicador *B. cereus*. O halo em forma de meia lua (2) mostrado na última placa (leitura dos resultados) indica que houve degradação do inibidor pela ação da protease e ausência de inibição naquela região. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar TSA-YE (soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura), ágar BHI semi-sólido (caldo Infuso Cérebro Coração acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico).....19
- Figura 4.** Representação esquemática do ensaio para avaliação da presença de bacteriófagos líticos, utilizando *L. monocytogenes* como micro-organismo indicador. Caldo BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI semi-sólido (caldo Infuso Cérebro Coração acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico).....21
- Figura 5.** Representação esquemática do ensaio de diluição crítica para a quantificação da atividade antimicrobiana da BLIS produzida pelo isolado C obtido a partir de polpa de abacaxi. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico).....24

- Figura 6.** Representação esquemática do ensaio de estabilidade térmica da BLIS produzida pela linhagem C isolada da polpa de abacaxi. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico).....27
- Figura 7.** Representação esquemática do teste microdiluição em caldo em microplaca de poliestireno (Costar) de 96 poços utilizado para a determinação da CBM da BLIS, produzida pelo isolado C (pó liófilo) frente ao micro-organismo indicador *Listeria monocytogenes*.....34
- Figura 8.** Fotografia da placa do ensaio para determinação da natureza do inibidor produzido pelo isolado C. O halo em forma de meia-lua indica degradação do inibidor pela α - quimotripsina, com crescimento do indicador *B. cereus*. H₂O (água), Protease (protease de *Streptomyces griseus* tipo XIV), α (α - quimotripsina).....38
- Figura 9.** Fotografias do gel de poliacrilamida após eletroforese utilizada para estimar a massa molecular da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 (pó liófilo). O gel A foi revelado por coloração com prata, sendo aplicados 20 μ L de amostra nas canaletas 1 e 2 e na canaleta 3 foi aplicado o marcador de massa molecular. O gel B foi revelado com *B. cereus* pelo ensaio de inibição em ágar, sendo aplicados 20 μ L de amostra nas canaletas 4 e 5 e na canaleta 6 foi aplicado o marcador de massa molecular (a seta indica a região de inibição do indicador)49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas para avaliação do espectro de atividade inibitória de isolados com atividade antibacteriana obtidos a partir de polpas de frutas.....	17
Tabela 2. Condições utilizadas para determinação da atividade antilisteriana da BLIS produzida pelo isolado C em modelo contendo polpa de abacaxi...	35
Tabela 3. Resultados do teste “spot-on-the-lawn” realizado com o isolado C.....	37
Tabela 4. Características fenotípicas dos isolados A, B e C de polpa de abacaxi.....	39
Tabela 5. Produção da BLIS em diferentes caldos de cultura e determinação da atividade antimicrobiana frente ao indicador <i>L. monocytogenes</i>	41
Tabela 6. Atividade da BLIS produzida por <i>B. cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1640 em caldo MRS em diferentes temperaturas de incubação por 24 horas, determinado pelo ensaio de diluição crítica frente ao indicador <i>L. monocytogenes</i>	41
Tabela 7. Estabilidade térmica da BLIS produzida por <i>B. cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1640 em caldo MRS em diferentes temperaturas.....	42
Tabela 8. Quantidade de proteínas totais (mg/mL), atividade total da BLIS (UA), atividade específica da BLIS (UA/mg), fator de purificação e rendimento (%) durante as etapas de purificação por extração em resinas XAD-16 e SP-Sepharose da BLIS produzida por <i>B. cereus</i> LFB-FIOCRUZ 164, utilizando <i>B. cereus</i> como indicador.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLIS	Substância semelhante a bacteriocina
BAL	Bactérias láticas
UFC	Unidade formadora de colônia
UA	Unidade arbitrária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
FIOCRUZ	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
MRS	De Man, Rogosa, Sharpe
AP	Água peptonada
TSAYE	Ágar soja Trypticase com 0,6% de extrato de levedura
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
SLC	Sobrenadante livre de células
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>).
AB-6	Solução estoque de Acrilamida e bis-acrilamida
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
q.s.p	Quantidade suficiente para

TSB-YE	<i>Tryptone Soya Broth - Yeast extract</i>
HCl	Ácido clorídrico
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

mM	Milimolar
M	molar (mol/L)
NaCl	Cloreto de sódio
β	Beta
mg/mL	Miligramma por mililitro
UA/mg	Unidade arbitrária por miligramma
UA/mL	Unidade arbitrária por mililitro
mg/mL	Miligramma por mililitro
α	Alfa
μ L	Micro litro
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
g	Grama
>	Maior
k	kilo
Da	Dalton
%	Porcentagem
% (v/v)	Porcentagem volume por volume
-	Menos
°C	Graus Celsius
% p/v	Porcentagem peso por volume
nm	Nanômetro
V	Volts
mm	Milímetro

g	Força da gravidade
μm	Micrometro
mM	Milimolar
mL/min	Mililitro por minuto
h	Horas
mL	Mililitro

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Resumen.....	iii
Lista de figuras	IV
Lista de tabelas	VI
Lista de abreviaturas e siglas.....	Viii
Lista de símbolos.....	X
1. Introdução.....	1
1.1 Polpas de frutas.....	1
1.2 Bacteriocinas e substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocinas (BLIS).....	2
1.3 Bacteriocinas e BLIS de <i>Bacillus sp.</i>	3
1.3.1 Classificação de bacteriocinas e BLIS.....	5
1.4 <i>Bacillus cereus</i>	6
1.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	7
1.6 Considerações gerais sobre a aplicação de bacteriocinas e BLIS na bioconservação de alimentos.....	8

1.7	Produção e purificação de bacteriocinas e BLIS.....	10
2.	Objetivos.....	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
3.	Materiais e Métodos.....	13
3.1	Isolamento de linhagens bacterianas produtoras de BLIS a partir de polpas de frutas congeladas.....	13
3.2	Teste de antagonismo em ágar.....	15
3.2.1	Seleção de isolados com atividade inibitória frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.2.2	Avaliação do espectro de atividade inibitória dos isolados com atividade antilisteriana comprovada.....	16
3.3	Avaliação da natureza proteica do inibidor.....	18
3.4	Exclusão da Inibição por bacteriófagos líticos.....	20
3.5	Identificação fenotípica e molecular.....	21
3.6	Quantificação da atividade inibitória da BLIS pela técnica de diluição crítica.....	22

3.7	Determinação das condições ideais de cultivo para a produção da BLIS pelo isolado C, obtido a partir de polpa de abacaxi.....	25
3.7.1	Temperatura de incubação.....	25
3.7.2	Meios de cultura.....	25
3.8	Caracterização preliminar e purificação parcial da BLIS produzida pelo isolado C.....	26
3.8.1	Estabilidade da BLIS em diferentes temperaturas.....	26
3.8.2	Estabilidade da BLIS em diferentes condições de pH.....	28
3.8.3	Purificação da BLIS produzida pelo isolado C empregando a técnica de extração em resina XAD-16	28
3.8.4	Purificação da BLIS produzida pelo isolado C empregando a técnica de troca catiônica em resina SP-Sepharose “Fast Flow”	29
3.8.5	Quantificação de proteínas totais e determinação da atividade específica da BLIS	30
3.8.6	Quantificação da atividade antimicrobiana e verificação da atividade hemolítica da BLIS semi-purificada.....	31
3.8.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	31
3.8.8	Revelação do gel de poliacrilamida por coloração com prata.....	32
3.8.9	Revelação do gel de poliacrilamida com o micro-organismo indicador <i>Bacillus cereus</i>	33

3.9 Avaliação do potencial antilisteriano da BLIS produzida pelo isolado C.....	33
3.9.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	33
3.9.2 Aplicação da BLIS em polpa de fruta para inibição de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
4. Resultados.....	36
4.1 Isolamento e caracterização de linhagens produtoras de BLIS a partir de polpas de frutas.....	36
4.2 Avaliação do espectro de atividade inibitória dos isolados com comprovada atividade antilisteriana.....	36
4.3 Avaliação da natureza proteica do inibidor produzido pelo isolado C.....	38
4.4 Exclusão da inibição por bacteriófagos líticos.....	38
4.5 Identificação fenotípica	39
4.6 Quantificação da atividade da BLIS pela técnica de diluição crítica.....	40
4.7 Determinação das condições ideais de cultivo para a produção da BLIS por <i>Bacillus cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1640.....	40
4.7.1 Meio de cultura.....	40
4.7.2 Temperatura de incubação.....	41
4.8 Purificação de BLIS produzida por <i>B. cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1640	42

4.8.1 Avaliação da estabilidade térmica da BLIS produzida por <i>B. cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1640.....	42
4.8.2 Estabilidade da BLIS em diferentes pHs.....	43
4.8.3 Purificação e caracterização da atividade antimicrobiana da BLIS produzida por <i>B. cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1640 utilizando resinas XAD-16 e SP-Sepharose	43
4.8.4 Quantificação da atividade antimicrobiana da BLIS parcialmente purificada	43
4.8.5 Quantificação de proteínas totais e determinação da atividade específica da BLIS.....	43
4.8.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	44
4.9 Avaliação do potencial bioconservador de extrato semi-purificado da BLIS produzida por <i>B. cereus</i> LFB-FIOCRUZ 1640 frente ao indicador <i>L. monocytogenes</i>	45
4.9.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	45
4.9.2 Aplicação da BLIS em polpa de fruta para inibição de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
5. Discussão.....	47
6. Conclusões.....	55
7. Referências.....	56
ANEXO 1.....	75
ANEXO 2.....	76

1. Introdução

A busca por novos compostos com atividade antimicrobiana é de grande interesse, tendo em vista o número crescente de relatos de resistência bacteriana a antibióticos. Além disso, a descoberta de novos compostos antimicrobianos de origem natural é importante para a garantia da inocuidade de alimentos, devido à crescente demanda por alimentos saudáveis, frescos e sem aditivos químicos convencionais (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995; CLEVELAND et al., 2001; COTTER; HILL; ROSS, 2005; DEEGAN et al., 2006; TURKOGLU, 2007; MOLINOS et al., 2008; SETTANNI; CORSETTI, 2008).

Neste sentido, uma linha de estudo que pode contribuir para obtenção de novos compostos antimicrobianos frente a micro-organismos patogênicos e deteriorantes é a seleção de linhagens bacterianas com atividade antagonista, a partir de fontes não convencionais, incluindo frutas e polpas de frutas.

1.1 Polpas de frutas

Polpas de frutas tropicais são produtos em expansão no mercado, uma vez que conservam muitas propriedades nutricionais dessas frutas e são importantes fontes alimentares (FERNANDES, 2007).

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) determina que polpa de fruta é o produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido de frutos polposos, através de processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais, provenientes da parte comestível do fruto (BRASIL, 2000).

A polpa de fruta congelada é um produto em expansão no comércio, com ampla aceitação para elaboração de sucos, formulação de iogurtes, doces, geléias, biscoitos, bolos, sorvetes, refrescos e alimentos infantis. Já os sucos de frutas são utilizados como ingredientes para outros alimentos como refrigerantes, leite de soja e bebidas probióticas. As polpas são processadas em épocas de safra e conservadas para serem consumidas, em substituição à fruta *in natura*, de acordo com a demanda do mercado consumidor (MATTA et al., 2005; BUENO et al., 2002; TRIBST; SANTANA; MASSAGUER, 2009).

Para garantir a conservação de polpas e sucos de frutas e aumentar a vida-de-prateleira, são utilizados processos industriais como pasteurização, desidratação, tratamento de alta pressão, congelamento e refrigeração (AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007).

A pasteurização é um dos processos tecnológicos utilizados para eliminar ou reduzir a presença de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos e o tratamento térmico geralmente empregado, é o aquecimento por 30 minutos a 63°C ou por 15 segundos a 72°C, seguido de resfriamento rápido a 4,5°C (McAULET et al., 2012).

Segundo Mattietto, Matta (2011) a pasteurização é bastante utilizada no processamento de polpas de frutas e combinada com o armazenamento sob congelamento, permite a comercialização deste produto de maneira segura. Contudo, devido à grande diversidade de frutas nativas do Brasil, com características específicas, em muitos casos, os parâmetros tecnológicos para o processamento adequado ainda precisam ser estabelecidos.

Para garantia da inocuidade de alimentos, atualmente, há interesse também em procedimentos de bioconservação, que consistem na utilização de micro-organismos e/ou seus metabólitos para aumentar a segurança microbiológica e a vida-de-prateleira (STILES; HASTINGS, 1991). Os principais metabólitos bacterianos com potencial para utilização como bioconservadores são os peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas e as substâncias semelhantes a bacteriocinas (BLIS, "bacteriocin like inhibitory substances").

1.2 Bacteriocinas e substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocinas (BLIS)

Os micro-organismos apresentam vários mecanismos de defesa, como a produção de endotoxinas, exotoxinas, agentes líticos, ácidos orgânicos, antibióticos, secreção de peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) e substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocinas (BLIS) (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976; ALLISON; KLAENHAMMER, 1998; OSCÁRIZ; LASA; PISABARRO, 1999; CLEVELAND et al., 2001).

As bacteriocinas compõem um grupo heterogêneo de peptídeos ou proteínas que são sintetizadas no ribossomo, possuem entre 30 e 60 aminoácidos, variam quanto à atividade, mecanismo de ação, massa molecular, propriedades bioquímicas e origem genética, sendo produzidas por diversos gêneros bacterianos (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976; KLAENHAMMER, 1988, KLAENHAMMER, 1993; ABEE; KROCKEL; HILL, 1995; CLEVELAND et al., 2001; GÁLVEZ et al., 2008). A síntese de antibióticos convencionais os diferencia das bacteriocinas, uma vez que os antibióticos não são de síntese ribossômica (NISSEN-MEYER; NES, 1997).

Já as substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocinas (BLIS), são definidas como peptídeos ou proteínas antimicrobianas com aminoácidos incomuns, possuindo diferentes estruturas químicas (SETTANNI; CORSETTI, 2008). As BLIS atuam como substâncias antagônicas, com potencial bactericida ou bacteriostático, contra bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas, e são inócuas para as bactérias produtoras (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976; ALLISON; KLAENHAMMER, 1998; OSCÁRIZ; LASA; PISABARRO, 1999; CLEVELAND et al., 2001).

Grande parte das bacteriocinas e BLIS possuem estrutura catiônica e anfifílica, com características físico-químicas diversas em relação à massa molecular, presença de aminoácidos específicos e ponto isoelétrico (JACK; TAGG; RAY, 1995; PAPAGIANNI, 2003; SAAVEDRA; CASTELLANO; SESMA, 2004). Estas proteínas antimicrobianas podem sofrer modificações pós-traducionais e podem ser liberadas para o ambiente externo ou permanecerem ligadas à parede celular do micro-organismo produtor (JACK; TAGG; RAY, 1995).

As bacteriocinas mais estudadas são aquelas produzidas por bactérias lácticas (BAL), um grupo filogeneticamente diversificado de bactérias Gram-positivas (bastonetes ou cocos), catalase negativas, desprovidas de citocromos, facultativamente anaeróbias, produtoras de ácidos orgânicos e não formadoras de esporos (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007; AXELSSON, 1993). Entretanto, nos últimos anos, têm se destacado pesquisas sobre o uso potencial de bacteriocinas e BLIS produzidas por algumas espécies de *Bacillus* (ABRIOUEL et al., 2011).

1.3 Bacteriocinas e BLIS de *Bacillus* sp.

Apesar de ser reconhecido que bactérias do gênero *Bacillus* podem causar deterioração e toxinfecções alimentares, acredita-se que os metabólitos de algumas linhagens poderão ser aplicados na bioconservação de alimentos (ABRIOUEL et al., 2011).

A produção de bacteriocinas ou BLIS já foi descrita em muitas espécies do gênero *Bacillus*, incluindo *B. subtilis* (HAMMAMI et al., 2009), *B. coagulans* (HYRONIMUS; LE MARREC; URDACI, 1998), *B. cereus* (OSCÁRIZ; LASA; PISABARRO, 1999), *B. thuringiensis* (CHERIF et al., 2003) e *B. licheniformis* (CLADERA-OLIVEIRA; CARON; BRANDELLI, 2004). Além disso, *Bacillus* sp. pode produzir outros compostos relacionados a mecanismos de defesa, sobrevivência, esporulação, peptídeos antimicrobianos, antibióticos e lipopeptídeos (ABRIOUEL et al., 2011).

Os metabólitos biologicamente ativos produzidos por espécies de *Bacillus* também têm atraído o interesse de indústrias farmacêuticas devido à grande diversidade estrutural, produção e estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, além de apresentarem amplo espectro de atividade antimicrobiana (SANSINENEA; ORTIZ, 2011; ABRIOUEL, 2011; ANSARI et al., 2012).

Bacteriocinas e BLIS de *Bacillus* são promissoras para a terapêutica antibacteriana e bioconservação de alimentos, considerando-se que não desencadeiam reações alérgicas, são ativas em baixas concentrações, são facilmente metabolizadas, além de não selecionarem micro-organismos resistentes e serem ativas frente a patógenos e deteriorantes, tais como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* spp. (CLEVELAND et al., 2001; RILEY; WERTZ, 2002a; RILEY; WERTZ, 2002b, ABRIOUEL et al., 2011; LOHANS; VEDERAS, 2012).

Neste sentido, Bizani et al. (2008) estudaram a aplicação da bacteriocina cereína 8A, produzida por *B. cereus*, para inibição de *L. monocytogenes*, que é um importante patógeno transmitido principalmente por via de alimentos. Os autores adicionaram 160 UA/mL da cereína 8A a amostras de leite UHT (*ultra high temperature*) artificialmente contaminadas com 10⁴ UFC de *L. monocytogenes* por mL. Foi observado que houve um decréscimo de 3 log na população de *L. monocytogenes*, em um período de 14 dias a 4°C, com diferença significativa em

relação ao controle não adicionado de BLIS. Bizani et al. (2008) também avaliaram a ação de cereína 8A em queijo Minas frescal e relataram que ocorreu retardamento da fase exponencial de crescimento de *L. monocytogenes* na presença da bacteriocina, embora no final de 6 dias de experimentos, as populações do patógeno tenham sido semelhantes ao controle sem BLIS. Contudo, quando cereína 8A foi utilizada para controlar a contaminação superficial por *L. monocytogenes* em queijo artificialmente contaminado (10^2 UFC/g) armazenado por 30 dias a 4°C, houve maior inibição do patógeno nas amostras tratadas com cereína, em comparação com o controle sem a bacteriocina, evidenciando o potencial de utilização desses compostos para a garantia da inocuidade de alimentos.

Os estudos de BLIS de *Bacillus* sp. ainda são escassos na literatura, mas permitem concluir que a prospecção de bactérias deste gênero com atividade antagonista pode contribuir para a descoberta de novas classes de compostos antimicrobianos (ABRIOUEL et al., 2011).

1.3.1 Classificação de bacteriocinas e BLIS

As bacteriocinas mais estudadas são aquelas produzidas por bactérias lácticas (BAL) e podem ser divididas nas classes I, II e III, de acordo com Klaenhammer (1993) com modificações de Cotter; Hill e Ross (2005) e Drider et al. (2006). A **classe I** compreende os lantibióticos, que são pequenos peptídeos termoestáveis (19 a 38 resíduos de aminoácidos) que sofrem modificações pós-traducionais. Na **classe II**, estão as bacteriocinas termoestáveis com massa molecular menor que 10 kDa e que não apresentam aminoácidos modificados. A classe II pode ser dividida adicionalmente em quatro subclasses:

- II a** - peptídeos com ação bactericida por mecanismo de permeabilização da membrana citoplasmática;
- II b** - bacteriocinas compostas por dois peptídeos formadores de poros na membrana citoplasmática;
- II c** - bacteriocinas com extremidades N e C terminais ligadas covalentemente;
- II d** - bacteriocinas que não se enquadram nos demais subgrupos.

A **classe III** compreende as bacteriolisinas, que são compostos termolábeis, com grande massa molecular (> 30kDa) e complexas quanto à atividade e estrutura proteica.

As bacteriocinas de *Bacillus* podem apresentar algumas características semelhantes às bacteriocinas de BAL, mas já foi proposto um sistema independente de classificação destes antimicrobianos (ABRIOUEL et al., 2011).

As proteínas antimicrobianas produzidas por *Bacillus* sp. são classificadas primeiramente de acordo com o mecanismo de biossíntese: ribossômicas, ou seja, as bacteriocinas e as não ribossômicas, como por exemplo as polimixinas e as iturinas (JACK; TAGG; RAY, 1995; NISSEN-MEYER; NES, 1997; STORM; ROSENTHAL; SWANSON, 1977; LEE; KIM, 2011).

Segundo Abriouel et al. (2011), as bacteriocinas de *Bacillus* sp. podem ser classificadas/organizadas nas classes I, II e III. A **classe I** inclui peptídeos antimicrobianos com modificações pós-traducionais, sendo subdividida nas **subclasses I.1** (peptídeo único, lantibiótico alongado), **I.2** (outros peptídeos únicos lantibióticos), **I.3** (peptídeos duplos, lantibióticos) e **I.4** (peptídeos com outros tipos de modificações pós-traducionais). As bacteriocinas da **classe II** são peptídeos termoestáveis, menores que 10 kDa, e que não sofreram modificações pós-traducionais. É ainda subdividida em quatro: **subclasse II.1** que inclui peptídeos semelhantes à pediocina de BAL, incluindo coagulina produzido por *B. coagulans*, e bacteriocinas produzidas por *B. circulans*, *B. polymyxa* e *Paenibacillus*; **subclasse II.2** que inclui peptídeos semelhantes à turicina produzida por linhagens de *B. thuringiensis*, e cereína produzida por linhagens de *B. cereus*; **subclasse II.3** inclui outros peptídeos lineares, tais como as cereínas 7A e 7B. Finalmente, a **classe III** inclui proteínas de elevada massa molecular e com atividade de fosfolipase, tais como as bacteriocinas produzidas por *B. megaterium*. Há, ainda, outros compostos antimicrobianos de natureza proteica sem completa caracterização físico-química e genética e que por isso, são classificados como BLIS (ABRIOUEL, 2011).

1.4 *Bacillus cereus*

B. cereus é uma bactéria Gram-positiva amplamente distribuída pelo ambiente e que pode ser isolada do solo e de plantas. Alimentos podem ser facilmente

contaminados com *B. cereus* a partir do meio ambiente (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008).

A resistência térmica dos esporos de *B. cereus* e a natureza não-fastidiosa desse micro-organismo facilitam sua multiplicação e sobrevivência em diferentes sistemas alimentares (SHINAGAWA, 1990). Além disso, há relatos da ocorrência de linhagens de *B. cereus* psicrotolerantes, que multiplicam-se em temperaturas de 4 a 6°C (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008).

B. cereus pode produzir diferentes enzimas e toxinas, sendo reconhecido como agente causal das síndromes emética e diarreica relacionadas ao consumo de alimentos contaminados, sendo raras as linhagens que produzem as toxinas que causam ambos os sintomas (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008; FINLAY; LOGAN; SUTHERLAND, 2002; SHINAGAWA, 1990; GRANUM; LUND, 1997; SHIN et al., 2011).

A síndrome emética é causada pela toxina cereulida, com massa molecular de 1,2 kDa. Esta proteína não é antigênica, é termoestável e sua produção ocorre durante a fase estacionária de crescimento. Já a síndrome diarreica envolve a produção de pelo menos cinco diferentes enterotoxinas por *B. cereus*, sendo que em toxinfecções alimentares há provavelmente o envolvimento de três delas: hemolisina BL, enterotoxina não hemolítica (Nhe) e citotoxina K (BHUNIA, 2008; MONTVILLE; MATTHEWS, 2008).

As enterotoxinas de *B. cereus* melhor caracterizadas estão relacionadas com a esporulação bacteriana, apresentam entre 38 e 43 kDa, são termolábeis, antigênicas e produzidas por via não ribossômica (BHUNIA, 2008, EHLING-SCHULZ et al., 2006; STENFORS ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008).

1.5 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, patogênica para o homem e sua transmissão ocorre principalmente por meio de alimentos. É a bactéria causadora da listeriose, uma infecção relativamente rara mas com alta taxa de letalidade (20 a 25%) e que atinge principalmente grupos de risco, que compreendem grávidas, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos (pessoas com câncer, que receberam transplante de órgãos, em terapia

imunossupressora e portadores do HIV). A infecção por *L. monocytogenes* pode se manifestar por septicemia, meningite e meningoencefalite em adultos de grupos de risco. Além disso, em grávidas, pode causar sintomas semelhantes a gripe, mas com ocorrência de aborto ou nascimento prematuro. Mais recentemente, tem sido relatada também, a ocorrência de gastroenterite febril causada por *Listeria monocytogenes* em pessoas que, aparentemente, não apresentavam condição predisponente para listeriose invasiva (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008).

L. monocytogenes é psicrotrófica e sua presença já foi relatada em diversos alimentos, incluindo sucos e polpas de frutas com baixa acidez (BUENO et al., 2002; PENTEADO; LEITÃO, 2004; KOSEKI; ISOBE, 2005; TAVARES FILHO, 2007; MOLINOS et al., 2008; RÂPEANU et al., 2008; CAGGIA et al., 2009; CHAN; WIEDMANN, 2009).

1.6 Considerações gerais sobre a aplicação de bacteriocinas e BLIS na bioconservação de alimentos

A incorporação de bacteriocinas ou BLIS em alimentos pode ser feita por meio da adição do composto purificado ou semi-purificado ou também pela adição direta da bactéria produtora no próprio alimento (O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002). No caso do gênero *Bacillus*, em que algumas espécies podem ter associação negativa com alimentos, os metabólitos purificados ou semi-purificados têm potencial para aplicação na bioconservação de alimentos, excluída a presença de compostos associados às toxinfecções alimentares (ABRIOUEL et al., 2011).

No caso da aplicação de extratos semi-purificados ou bacteriocinas purificadas, a eficácia de bioconservação dependerá da cinética de inativação térmica da BLIS e das propriedades físico-químicas dos alimentos, sendo necessários testes nos sistemas alimentares em que se pretende utilizá-las, para garantir o sucesso nos processos de bioconservação pelas indústrias de alimentos (ALLENDE et al., 2007; LAPPE et al., 2009).

Bacteriocinas e BLIS podem apresentar efeitos aditivos ou sinérgicos ao serem aplicadas em combinação com conservadores químicos clássicos, compostos fenólicos e outros agentes antimicrobianos que podem ser aplicados em

preparações concentradas e liofilizadas ou na forma de culturas adjuntas ou de proteção (GÁLVEZ et al., 2007).

As bacteriocinas e BLIS, geralmente, são mais eficazes e apresentam maior atividade antimicrobiana contra micro-organismos estreitamente relacionados à espécie produtora (SAAVEDRA; CASTELLANO; SESMA, 2004; DEEGAN et al., 2006; ANSARI et al., 2012).

Outro fator importante a ser considerado para aplicação de bacteriocinas é que a eficácia destes compostos dependerá da carga microbiana contaminante do alimento e, por isso, a concentração de bioconservador deverá ser elevada para inibir um maior número de células alvo (GÁLVEZ et al., 2007).

Para Gálvez et al. (2007) e Taylor et al. (2008) a obtenção de resultados satisfatórios ou não na bioconservação em sistemas alimentares complexos dependerá de interações com outros constituintes (por exemplo, gorduras e proteínas), precipitação, inativação, ou distribuição desigual de moléculas de bacteriocina ou BLIS na matriz alimentícia.

A atividade antimicrobiana desses bioconservadores também poderá ser alterada por enzimas proteolíticas presentes em alimentos, sendo que a inativação dessas enzimas impedirá a degradação das bacteriocinas. Neste sentido, é promissor o emprego combinado de bioconservadores e processos de pasteurização, desidratação, tratamento de alta pressão, congelamento e refrigeração para a garantia da inocuidade e extensão da vida de prateleira de alimentos (MUTUS et al., 2006; AWUAH; RAMASWAMY; ECONOMIDES, 2007; TRIBST; SANTANA; MASSAGUER, 2009). O uso de bacteriocinas termoestáveis em conjunto com o processamento térmico de alimentos pode ser vantajoso para o aumento da segurança microbiológica (THOMAS; WIMPENNY, 1996; CLEVELAND et al., 2001; GRANDE et al., 2005).

Atualmente, a bacteriocina nisina é regulamentada como aditivo alimentar para uso comercial em mais de 48 países. Essa bacteriocina é produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo comercializada como o produto Nisaplin (CLEVELAND et al., 2001; COTTER; HILL; ROSS, 2005; DELVES-BROUGHTON, 2005; DEEGAN et al., 2006). Há estudos sobre a aplicação dessa bacteriocina em diferentes alimentos como, por exemplo, queijos, cerveja, vinho, alimentos com baixo pH e produtos lácteos pasteurizados (DELVES-BROUGHTON

et al., 1996). No Brasil, a nisina pode ser utilizada como conservador em queijos pasteurizados, no limite máximo de 12,5 mg/kg (BRASIL, 1996). A aplicação bem sucedida da nisina é um modelo que tem estimulado pesquisas com bacteriocinas e BLIS, uma vez que outros bioconservadores poderão ser descobertos e adequados para utilização em diversos tipos de alimentos (DEEGAN et al., 2006). Há também uma preparação contendo a bacteriocina pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici*, comercializada com o nome de ALTA TM 2341 (GOMES et al., 2010).

1.7 Produção e purificação de bacteriocinas e BLIS

As bacteriocinas são produzidas e liberadas pelas bactérias produtoras nos meios de cultura e, para purificação, após cultivo em caldo. Geralmente, são realizadas etapas de precipitação, centrifugação, filtração e posterior separação das moléculas baseada em tamanho, propriedades biológicas e natureza físico-química (CINTAS et al., 2001; MUTUS et al., 2006).

Ao iniciar o processo de purificação de bacteriocinas, é importante a determinação das condições ideais para sua produção, estudando diferentes meios de cultivo, temperaturas e tempos de incubação, a fim de favorecer a multiplicação bacteriana, a atividade bacteriocinogênica e assim, obter melhores rendimentos (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976; CAROLISSEN-MACKAY; ARENDSE; HASTINGS, 1997; SAAVEDRA; CASTELLANO; SESMA, 2004).

O controle de pH também é importante, pois interfere nas propriedades físico-químicas e antimicrobianas de bacteriocinas: pH próximo da neutralidade, geralmente, promove adsorção à superfície celular, enquanto que em pH ácido ocorre dessorção (YANG; JOHNSON; RAY, 1992; ELEGADO; KIM; KWON, 1997; CABO et al., 1999). Com base neste princípio, Yang, Johnson e Ray (1992) propuseram a extração de bacteriocinas por meio da adsorção/dessorção às células produtoras.

Há muitos trabalhos de purificação de bacteriocinas com o emprego da precipitação por sulfato de amônio, mas esta técnica tem a desvantagem da co-precipitação de outras proteínas do meio de cultivo, é demorada e apresenta baixo rendimento. Além disso, o precipitado apresenta grande teor salino, sendo

necessária a dessalinização por diálise, em um processo laborioso (UTENG et al., 2002; CHEIGH et al., 2004; WANG; LIU; CUI, 2007).

Muitas pesquisas têm demonstrado que técnicas cromatográficas são vantajosas para a separação de bacteriocinas do meio de cultivo, utilizando diferentes mecanismos: interação hidrofóbica com resina Amberlite XAD-16 (CINTAS et al., 2001), troca catiônica (SEBEL et al., 2007), filtração em gel (TEIXEIRA et al., 2009; HAMMAMI et al., 2009) e cromatografia líquida em fase reversa (CHEHIMI et al., 2007).

Diante do exposto, fica evidenciado que é de interesse científico, o isolamento de bactérias produtoras de BLIS a partir de alimentos. Cabe destacar que linhagens autóctones apresentam vantagem competitiva em relação a linhagens de outras origens, por estarem melhores adaptadas às condições do sistema alimentar, com menor possibilidade de ocorrer alterações das propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos em que serão utilizadas (GÁLVEZ et al., 2010). Além disso, as bacteriocinas ou BLIS semi-purificadas obtidas a partir de linhagens autóctones também podem apresentar melhor estabilidade nos alimentos de origem, devido às suas características físico-químicas.

Desse modo, o isolamento de linhagens bacterianas produtoras de bacteriocinas e BLIS, bem como a purificação de peptídeos antimicrobianos são desafios atuais, que podem contribuir para o aumento da segurança microbiológica de alimentos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi estudar novas linhagens de bactérias produtoras de BLIS com potencial para aplicação na bioconservação de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar bactérias produtoras de BLIS, a partir de amostras comerciais de polpas de frutas.
- Selecionar um isolado e determinar as condições ideais de cultivo e produção de BLIS.
- Realizar a caracterização preliminar da BLIS, relativa ao espectro de atividade inibitória, estabilidade térmica e estabilidade em diferentes pHs.
- Obter extrato semi-purificado de BLIS para estimar sua massa molecular e para avaliar o potencial de aplicação do extrato semi-purificado de BLIS em bioconservação, por meio do estudo da inibição de *Listeria monocytogenes* no alimento de origem da linhagem produtora.

3. Materiais e Métodos

3.1 Isolamento de linhagens bacterianas produtoras de BLIS a partir de polpas de frutas congeladas

Para o isolamento de bactérias produtoras de BLIS foram analisadas 120 amostras comerciais de polpas congeladas e pasteurizadas, de diferentes frutas: abacaxi (*Ananas comosus*), tamarindo (*Tamarindus indica*), cajá (*Spondias mombin*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), maracujá (*Passiflora edulis*), açaí (*Euterpe oleracea*), acerola (*Malpighia glabra*) com laranja (*Citrus Sinensis*), morango (*Fragaria vesca*), goiaba (*Psidium guajava*), graviola (*Annona muricata*) e abacaxi (*Ananas Sativus*) com hortelã (*Mentha* sp.). Foi utilizado o método descrito por Lewus, Kaiser e Montville (1991) com modificações. Para isso, uma porção de 25 g de amostra foi adicionada de 225 mL de solução de peptona bacteriológica (0,1% p/v - Oxoid) e homogeneizada por dois minutos em “Bag Mixer” (Interscience).

Foram realizadas diluições decimais seriadas e 0,1 mL de cada diluição foi semeado em triplicata na superfície de ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharpe – Oxoid). As placas foram incubadas a 25° C por até 72 horas em anaerobiose (Anaerogen) a fim de minimizar a produção de peróxido de hidrogênio. Foram selecionadas placas com colônias isoladas e cada colônia foi repicada para 3 mL de caldo MRS e incubada a 25° C/24 h, para testes posteriores de antagonismo em ágar. A figura 1 ilustra o procedimento utilizado para o isolamento das linhagens de interesse neste trabalho.

Figura 1. Representação esquemática da técnica empregada para o isolamento de bactérias produtoras de BLIS, a partir de polpas de frutas. AP (Água peptonada), ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharpe).

3.2 Teste de antagonismo em ágar

3.2.1 Seleção de isolados com atividade inibitória frente a *Listeria monocytogenes*

A atividade antagonista dos isolados foi determinada por teste em ágar, empregando a técnica “spot-on-the-lawn”, conforme descrito por Lewus, Kaiser e Montville (1991) com modificações de De Martinis et al. (2001). Para isso, a cultura previamente armazenada sob congelamento foi reativada pela inoculação de 100 µL do caldo descongelado em 3 mL de caldo MRS (Oxoid) e incubada a 25°C por 24h. Deste caldo, uma alíquota de 2 µL foi inoculada em um ponto central de placa contendo ágar TSA-YE (soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura - Oxoid) e foi realizada incubação sob anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) por 24h a 25° C. A placa recebeu uma sobrecamada de 8 mL de ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8 % de ágar bacteriológico, Oxoid) inoculado com 10^5 - 10^6 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* (bactéria indicadora). A cultura foi re-incubada por 24 h a 37° C e foi verificado se ocorria inibição, evidenciada pela presença de halo sem crescimento ao redor do ponto de inoculação do suposto micro-organismo antagonista, como ilustrado na figura 2.

As linhagens com atividade inibitória foram selecionadas e armazenadas a -80°C em caldo MRS com 20% (v/v) de glicerol (Synth) para testes posteriores.

Figura 2. Representação esquemática do ensaio “spot-on-the-lawn”. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar TSA-YE (soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura), ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico)

3.2.2 Avaliação do espectro de atividade inibitória dos isolados com atividade antilisteriana comprovada

As linhagens bacterianas utilizadas como indicadores para avaliação do espectro de atividade inibitória dos isolados obtidos de polpas de frutas estão descritas na tabela 1, bem como a origem e as respectivas condições de cultivo. As linhagens foram mantidas em meios adequados, com 20% (v/v) de glicerol (Synth) a -80° C, sendo reativadas nos respectivos meios de cultura quando necessário.

A atividade antagonista dos isolados foi determinada pelo teste “spot-on-the-lawn”, conforme Lewus, Kaiser e Montville (1991), ilustrado na figura 2.

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas para avaliação do espectro de atividade inibitória de isolados com atividade antibacteriana obtidos a partir de polpas de frutas

Micro-organismos	Meio de cultura	Temperatura de incubação
<i>Bacillus cereus</i> ⁽¹⁾	BHI ⁽⁹⁾	30°C
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC ⁽²⁾ 33679 ⁽⁵⁾	BHI	30°C
<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6462 ⁽⁵⁾	BHI	30°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 ⁽²⁾	BHI	37°C
<i>Enterococcus durans</i> INCQS 00552 ⁽⁵⁾	MRS ⁽¹⁰⁾	37°C
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521 ⁽³⁾	MRS	25°C
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> A9b- ⁽⁷⁾	BHI	25°C
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ⁽⁵⁾	BHI	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 ⁽⁴⁾	BHI	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> IAL ⁽⁴⁾ 633	BHI	37°C
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17082 ⁽⁴⁾	BHI	37°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 ⁽⁴⁾	BHI	37°C
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDC ⁽⁶⁾ 1535 ⁽⁴⁾	BHI	37°C
<i>Escherichia coli</i> CDC 02A.2B ⁽⁴⁾	BHI	25°C
<i>Proteus mirabilis</i> CDC 305 ⁽⁴⁾	BHI	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14502 ⁽⁸⁾	BHI	37°C
<i>Salmonella cholerasuis</i> ATCC 13076 ⁽⁵⁾	BHI	30°C

(1) Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

(2) *American Type Culture Collection*, Manassas, EUA.

(3) Linhagem proveniente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

(4) Linhagem proveniente do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

(5) Linhagem proveniente do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

(6) *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, EUA.

(7) *Danish Institute for Fisheries Research, Department of Seafood Research*, Lingby, Dinamarca.

(8) Linhagem proveniente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, cedida pela Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca.

(9) Caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Oxoid).

(10) Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe - Oxoid)

3.3 Avaliação da natureza proteica do inibidor

A natureza proteica das substâncias antagonistas produzidas pelos isolados obtidos a partir de polpas de frutas foi testada pelo método descrito por Lewus, Kaiser e Montville (1991) modificado por De Martinis e Franco (1998).

Cada cultura bacteriana com atividade antagonista foi reativada em caldo MRS e incubada a 25° C por 24 h. Em seguida, 2 µL da cultura foram inoculados em um ponto central de uma placa de ágar TSA-YE (Oxoid) e incubada anaerobiamente a 25° C por 24 horas. Em seguida, foram feitos furos no ágar com 2 mm de diâmetro adjacentes à cultura bacteriana e foram depositados em diferentes poços: 20 µL de solução 20 mg/mL de protease de *Streptomyces griseus* tipo XIV (Sigma-Aldrich), 20 µL de solução 20 mg/mL de α -quimotripsina (Sigma-Aldrich) e 20 µL de água purificada esterilizada.

A placa preparada foi mantida a 5° C por 2 horas para permitir a difusão das soluções no ágar e foi colocada uma sobrecamada de 8 mL de ágar BHI semi-sólido contendo 10^5 - 10^6 UFC/mL de cada um dos micro-organismos indicadores *B. cereus* ou *L. monocytogenes*. A incubação foi realizada por 24 h a 30° C para *B. cereus* e a 37° C para *L. monocytogenes*. A figura 3 ilustra o procedimento utilizado para esta determinação da atividade antagônica do indicador *B. cereus*.

Figura 3. Representação esquemática do ensaio para determinação da natureza proteica da substância antagonista, produzida pelo isolado obtido a partir de polpa de fruta, frente ao indicador *B. cereus*. O halo em forma de meia lua (2) mostrado na última placa (leitura dos resultados) indica que houve degradação do inibidor pela ação da protease e ausência de inibição naquela região. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar TSA-YE (soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura), ágar BHI semi-sólido (caldo Infuso Cérebro Coração acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico).

3.4 Exclusão da Inibição por bacteriófagos líticos

As culturas identificadas e com capacidade comprovada para produzir peptídeos antimicrobianos, foram avaliadas também para exclusão da atividade inibitória devido à presença de bacteriófagos líticos, de acordo com Lewus; Kaiser; Montville (1991). Para isso, foi cortada uma porção de ágar da zona de inibição da placa do ensaio “spot-on-the-lawn”, sendo o ágar triturado com auxílio de um bastão de vidro, em tubo de ensaio, contendo 3 mL de caldo BHI (Oxoid) e mantido repouso à temperatura ambiente por 1 hora. Foi retirada uma alíquota de 300 µL da suspensão preparada a partir do ágar triturado e adicionada a 100 µL de cultura de *Listeria monocytogenes*, previamente obtida em caldo BHI (10^8 UFC/mL). A suspensão e cultura bacteriana foram combinadas com 4 mL de ágar BHI semi-sólido (fundido e resfriado a 45° C), que foram depositados sobre uma placa de ágar BHI, com incubação por 24 horas a 30° C. A formação de placas de lise seria indicativa da presença de bacteriófagos líticos. A figura 4 ilustra o procedimento utilizado para esta determinação.

Figura 4. Representação esquemática do ensaio para avaliação da presença de bacteriófagos líticos, utilizando *L. monocytogenes* como micro-organismo indicador. Caldo BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI semi-sólido (caldo Infuso Cérebro Coração acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico).

3.5 Identificação fenotípica e molecular

As bactérias isoladas que apresentaram atividade inibitória foram pré-identificadas de acordo com Schillinger e Lücke (1987) e, para isso foram realizadas inicialmente as provas de catalase e coloração de Gram, com observação microscópica das características morfo-tintoriais. De acordo com as provas preliminares realizadas, foi dado procedimento à identificação bioquímica de acordo com Claus e Berkeley (1986) e com Shinagawa (1990). Foram realizadas provas para avaliar a atividade hemolítica do tipo β em ágar sangue de carneiro, produção

de lecitinase em ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina, reação de Vermelho de Metila/Voges-Proskauer, motilidade, utilização de citrato como única fonte de carbono e redução de nitrato.

A confirmação da identificação das linhagens foi realizada gentilmente pelo Dr. Leon Rabinovitch curador da Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCG) e pela Msc. Jeane Quintanilha Chaves do Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Foram realizadas provas citomorfológicas, bioquímicas e fisiológicas, incluindo o sistema API 50 CHB (BioMérieux®). Além disso, foi realizada, pela FIOCRUZ, a análise do perfil toxigênico das linhagens isoladas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em formato multiplex-PCR, com a pesquisa dos genes das enterotoxinas *entFM*, *bceT*, *ces* e as do complexo *hbl* e *nhe* de acordo com Yang et al. (2005).

Os isolados identificados foram cultivados em caldo MRS (24 h / 30° C), acrescidos de 20% de glicerol e armazenados a -80° C.

Para estudos posteriores, foi selecionado apenas um isolado, obtido a partir de polpa de abacaxi, denominado isolado C.

3.6 Quantificação da atividade inibitória da BLIS pela técnica de diluição crítica

A quantificação da atividade inibitória do isolado C foi realizada por meio de ensaio de antagonismo em ágar, baseado na técnica de diluição crítica, descrita por Mayr-Harting, Hedges e Berkeley (1972). Para isso, a bactéria foi cultivada em caldo MRS por 24 h a 30° C. A cultura foi centrifugada a 14000xg por 10 minutos a 4°C (Sorvall Legend Mach 1.6R, Sorvall) e o sobrenadante obtido foi filtrado em membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro (GVWP, Millipore) com baixa capacidade de ligação de proteínas. Esse sobrenadante foi aquecido em banho-maria a 70° C por 30 minutos, para inativação enzimática, sendo essa preparação obtida designada a seguir como SLC (sobrenadante livre de células).

Uma alíquota de 100 µL do SLC foi diluída em solução tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 nas proporções: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256. Separadamente, foram preparadas placas de ágar BHI, que foram recobertas com

uma sobrecamada de 8 mL de BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% p/v de ágar bacteriológico, Oxoid) inoculado com 10^5 - 10^6 UFC/mL do indicador *L. monocytogenes*. Sobre a placa preparada, foram depositados 50 µL do SLC sem diluição e 50 µL de cada uma das diluições do SLC, em pontos conforme ilustrado na figura 5. Para isso, o volume total (50 µL) de SLC ou de cada diluição foi aplicado no mesmo ponto por 5 vezes, em alíquotas de 10 µL, na superfície do ágar, com intervalo de 10 minutos entre as aplicações. As placas foram mantidas por 2 h a 5°C para permitir a absorção das amostras pelo ágar e, em seguida, foi realizada a incubação por 24 h a 37° C.

As placas foram observadas quanto à presença de halos de inibição de crescimento do micro-organismo indicador *L. monocytogenes* e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL), calculada como a recíproca da última diluição em que havia halo de inibição, corrigida para 1 mL.

Figura 5. Representação esquemática do ensaio de diluição crítica para a quantificação da atividade antimicrobiana da BLIS produzida pelo isolado C obtido a partir de polpa de abacaxi. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar bacteriológico)

3.7 Determinação das condições ideais de cultivo para produção da BLIS pelo isolado C, obtido a partir de polpa de abacaxi

3.7.1 Temperatura de incubação

Foi realizado o cultivo do isolado C em caldo MRS nas temperaturas de 25, 30, 37, 45 e 50° C utilizando um inóculo de 1% (v/v) de cultura previamente reativada no mesmo caldo, a 30° C por 24h. A cultura obtida em cada temperatura foi submetida a teste de diluição crítica para quantificação da atividade inibitória utilizando *L. monocytogenes* como micro-organismo indicador (conforme item 3.6).

3.7.2 Meios de cultura

Para avaliar qual era o melhor meio para multiplicação e produção da BLIS pelo isolado C, foram testados os seguintes caldos: MRS (Oxoid), BHI (Oxoid), Nutriente (Oxoid), TSB-YE (Oxoid), Mueller–Hinton (Himedia) e CAA. Este último caldo foi formulado de acordo com Hastings et al. (1991) e continha casaminoácidos (Difco) - 15 g/L; extrato de levedura (Oxoid) 5 g/L; fosfato dissódico (Synth) 5 g/L; glicose (Oxoid) 2 g/L; cloreto de sódio (Synth) 5 g/L; citrato de sódio (Synth) 5 g/L; sulfato de magnésio (Merck) 0,1 g/L e sulfato de manganês (Merck) 0,05 g/L, pH 7,4.

Para este ensaio, o isolado C foi reativado em caldo MRS por 24 h / 30° C e foi inoculado a 1% (v/v) em cada um dos caldos de cultura testados e foi realizada incubação 24 h / 30° C. A atividade inibitória em cada um dos caldos foi avaliada por meio do ensaio de diluição crítica, utilizando *L. monocytogenes* como micro-organismo indicador (item 3.6).

3.8 Caracterização preliminar e purificação parcial da BLIS produzida pelo isolado C

3.8.1 Estabilidade da BLIS em diferentes temperaturas

O isolado C foi reativado a partir do estoque congelado inoculado a 1% (v/v) em caldo MRS e incubado por 24 h / 30° C. A cultura de caldo foi centrifugada a 14000xg por 10 minutos a 4° C (Sorvall Legend Mach 1.6R, Sorvall) e esterilizada em membrana com baixa capacidade de ligação de proteínas com poros de 0,22 µm de diâmetro (GVWP, Millipore), obtendo-se um sobrenadante livre de células (SLC).

Esse SLC foi exposto a diferentes temperaturas (50° C, 60° C, 70° C, 80° C, 90° C) durante 15 e 30 minutos, e à temperatura de 121° C durante 15 minutos. Após resfriadas, as amostras foram testadas quanto à atividade antimicrobiana pelo ensaio de diluição crítica (como descrito no item 3.6) e comparadas com uma alíquota do SLC (controle).

Figura 6. Representação esquemática do ensaio de estabilidade térmica da BLIS produzida pela linhagem C isolada da polpa de abacaxi. Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), ágar BHI (Infuso Cérebro Coração), ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de $0,8\%$ de ágar bacteriológico)

3.8.2 Estabilidade da BLIS em diferentes condições de pH

Os experimentos para determinar a estabilidade da BLIS em diferentes pHs foram realizados de acordo com Bizani e Brandelli (2002), com modificações. O isolado C foi inoculado a 1% (v/v) em caldo MRS e incubado por 24 h / 30° C. Essa cultura foi centrifugada a 14000xg por 10 minutos a 4° C (Sorvall Legend Mach 1.6R, Sorvall) e o sobrenadante foi esterilizado em membrana com baixa capacidade de ligação de proteínas com poros de 0,22 µm de diâmetro (GVWP, Millipore). Esse sobrenadante foi aquecido em banho-maria a 70° C por 30 minutos obtendo-se o SLC.

Alíquotas de 5 mL de SLC foram transferidas para tubos de ensaio e o pH foi ajustado para 2, 4, 6, 8 ou 10, com solução de NaOH 4 M ou HCl 4 M com auxílio de potenciômetro (Quimis). O pH de uma alíquota do SLC foi medido e utilizado como controle para comparação da atividade antimicrobiana. Em seguida, as amostras foram mantidas por 24 h / 10° C e após 24 horas a atividade da BLIS foi determinada pelo ensaio de diluição crítica (item 3.6).

3.8.3 Purificação da BLIS produzida pela isolado C empregando a técnica de extração em resina XAD-16

O isolado C foi reativado em caldo MRS e incubado por 24 h / 30° C. Uma alíquota de 6 mL da cultura reativada foram inoculados em 600 mL de caldo MRS formulado sem Tween 80% e incubados por 24 h / 30° C.

O caldo MRS sem Tween 80% foi formulado com peptona bacteriológica (Oxoid) 10 g/L, extrato de carne (Oxoid) 8 g/L, extrato de levedura (Oxoid) 4 g/L, dextrose (Oxoid) 20 g/L, fosfato dipotássico (Merck) 2 g/L, acetato de sódio 3 H₂O (Merck) 5 g/L, citrato triamoniaco (Acros) 2 g/L, sulfato de magnésio (Merck) 0,2 g/L, e sulfato de manganês (Merck) 0,05 g/L.

Ao final do período de incubação, a cultura foi centrifugada a 14000xg por 10 minutos a 4° C (Sorvall Legend Mach 1.6R, Sorvall). O sobrenadante foi filtrado em membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro (GVWP, Millipore) e aquecido em banho-maria a 70° C por 30 minutos para inativar enzimas proteolíticas, obtendo a

preparação denominada SLC. A fim de purificar a BLIS produzida pelo isolado C foi utilizada a técnica descrita por Sebei et al. (2007) e Martin-Visscher et al. (2008).

Para isso, foi preparada uma coluna de vidro (2,5 x 50 cm, Bio-rad Laboratories) preenchida com 40 g de resina Ambelite XAD-16 (Sigma-Aldrich) previamente condicionada em álcool isopropílico (J. T. Baker) e lavada com 4 litros de água purificada. O SLC obtido foi aplicado nessa coluna com um fluxo de 8 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com 300 mL de água, com um fluxo de 12 mL/min, sendo coletada uma fração de 300 mL. Uma alíquota de 200 µL desta fração foi utilizada para determinação da atividade por ensaio de diluição crítica (item 3.6) com *B. cereus* como micro-organismo indicador. Em seguida, foram passados pela coluna 300 mL de solução aquosa de etanol (Synth) a 20% (v/v), com fluxo de 12 mL/min e foi coletada uma fração de 300 mL. O solvente orgânico presente na fração foi removido em evaporador rotativo (Fisatom), até volume final de 60 mL. Deste extrato concentrado, uma alíquota de 200 µL foi utilizada para determinação da atividade inibitória por ensaio de diluição crítica (item 3.6) com *B. cereus* como micro-organismo indicador. A BLIS produzida pelo isolado C foi eluída com 300 mL de solução aquosa de álcool isopropílico a 70% (v/v), pH 3,0 (acidificado com solução aquosa de HCl 4 M), sob um fluxo de 12 mL/min. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotativo (Fisatom) até volume final de 60 mL e o pH desse extrato concentrado foi ajustado para 6,0 (com solução aquosa de NaOH 4 M). Uma alíquota de 200 µL do extrato obtido foi utilizada para determinação da atividade inibitória por ensaio de diluição crítica (item 3.6) com *B. cereus* como micro-organismo indicador e o volume restante foi armazenado a -80°C.

3.8.4 Purificação da BLIS produzida pelo isolado C empregando a técnica de troca catiônica em resina SP-Sepharose “Fast Flow”

A fração eluída da resina XAD-16, após descongelada em banho-maria a 40°C, foi aplicada em uma resina de troca catiônica SP-Sepharose “Fast Flow” empacotada em coluna C10 (GE Healthcare) (10 cm x 10 mm) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio monobásico 30 mM pH 5,7, de acordo com Oscáriz et al. (2006). Foram aplicados na coluna 60 mL de amostra (extrato obtido com resina XAD-16) e foi ajustado o fluxo para 0,5 mL/min, com auxílio de bomba

peristáltica (GE Healthcare). Foi coletada uma fração de 90 mL correspondente ao material não ligado à matriz da resina.

Foi realizada eluição com o mesmo tampão e mais uma fração de cerca de 40 mL foi coletada e descartada. Para a eluição do material ligado à resina, foi utilizado um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl em tampão fosfato de sódio monobásico 30 mM pH 5,7. As frações foram eluídas em um volume total de 40 mL a uma vazão de 1 mL/minuto e foram coletadas 40 frações de 1 mL com auxílio de um coletor automático (Bio Rad). Para garantir a remoção de todo o material da resina, foi realizada, posteriormente, uma eluição com 5 mL de NaCl 2M, sendo coletadas frações de 1 mL.

A atividade inibitória de cada fração coletada foi testada por ensaio de diluição crítica (item 3.6) frente ao micro-organismo indicador *B. cereus*.

A fração que apresentou atividade antimicrobiana foi dialisada contra água por 72 h/4°C em membrana com limite de exclusão de 1 kDa (Spectra/Por Biotech Cellulose Ester Dialysis Membrane, Spectrum), com três trocas de água. Após essa etapa, a amostra foi concentrada por liofilização (Liotop L202, Liobrás) e o pó liófilo foi estocado a -80°C.

3.8.5 Quantificação de proteínas totais e determinação da atividade específica da BLIS

A quantificação de proteínas totais, produzida pelo isolado C, foi realizada após extração em resinas XAD-16 e SP-Sepharose utilizando o método de Bradford (1976). Para determinação da atividade específica da BLIS (Unidades Arbitrárias/mg ou UA/mg) foi considerada a razão entre a atividade total da BLIS (UA) determinada pelo ensaio de diluição crítica (item 3.6), e a quantidade de proteínas (em miligramas) determinada pelo método de Bradford (1976). As determinações foram feitas para o sobrenadante inicial do caldo MRS e para os extratos obtidos com as resinas XAD-16 e SP-Sepharose (itens 3.8.3 e 3.8.4). O fator de purificação foi calculado em função da atividade específica da BLIS (UA/mg) enquanto que o rendimento foi calculado em função da atividade total da BLIS (UA).

3.8.6 Quantificação da atividade antimicrobiana e verificação da atividade hemolítica da BLIS semi-purificada

O pó liófilo foi suspenso em água purificada esterilizada para obter uma concentração de 100 mg/mL.

A suspensão foi utilizada para determinar a atividade antimicrobiana frente ao indicador *B. cereus*, por meio do ensaio de diluição crítica (item 3.6).

De acordo com Bizani et al. (2008), é importante uma avaliação preliminar da inocuidade de BLIS obtidas de novos isolados. Para isso, 10 µL da suspensão preparada da BLIS do isolado C foi depositada em placa de ágar sangue de carneiro (Oxoid) e mantida por 24h/37°C. O controle positivo para a atividade hemolítica foi preparado com *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, previamente cultivado em caldo BHI incubado por 24h/37°C. Para isso, foram depositados 10 µL dessa cultura na placa de ágar sangue de carneiro por 24h/37°C.

3.8.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para estimar a massa molecular da BLIS produzida pelo isolado C, purificada por extração nas resinas XAD-16 e SP-Sepharose (itens 3.8.3 e 3.8.4) foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando para a separação eletroforética a solução tampão tris-tricina, conforme descrito por Schagger (2006).

O gel de poliacrilamida foi preparado utilizando solução estoque de acrilamida e bis-acrilamida (Bio-agency), denominada AB-6 e formulada com 46,5 g de acrilamida, 3 g de bis-acrilamida com quantidade solúvel para (q.s.p) 100 mL de água e obteve-se, de acordo com Westermeier (2005), resultado de 49,5% T (porcentagem total de monômeros na solução) e 6% C (porcentagem de *crosslinker* na massa total de monômeros). O gel de poliacrilamida preparado em três diferentes concentrações de AB-6 foram: gel superior de empilhamento (5%), gel intermediário espaçador (10%) e gel inferior de separação (16%) como descrito no anexo 2.

Esse gel foi montado colocando-se o gel de separação, que ocupou aproximadamente 70% do tamanho total do gel. Após sua polimerização, foi adicionado o gel espaçador com 1cm de altura e ao final da polimerização do gel

espaçador, foi adicionado o gel de empilhamento, juntamente com o molde de poços para aplicação da amostra.

Foi realizada uma pré-corrida de 15 minutos a 30V, antes da aplicação da amostra no gel. A partir do pó líófilo da BLIS do isolado C (item 3.8.4), foi preparada uma suspensão a 100 mg/mL em tampão de amostra (anexo 2), aquecido em banho-maria a 90° C por 10 minutos e aplicada no gel de poliacrilamida 20 µL dessa amostra. No mesmo gel, também foi aplicado, o marcador pré-corado de baixa massa molecular, utilizado como padrão de massa molecular (3,5 - 38 kDa, Ultra Low Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE).

Foi utilizada para a eletroforese o sistema (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-rad Laboratories) com as soluções tampões do ânodo e do cátodo descritos no anexo 2.

O gel foi submetido a uma pré-corrida de 20 minutos a 30 V, para que as proteínas presentes na amostra entrassem no gel de empilhamento. Para a separação das proteínas, o gel foi submetido a uma corrida de 6 horas a uma voltagem constante de 90 V. Para avaliar a atividade antimicrobiana da BLIS presente no extrato, a amostra e o marcador de massa molecular foram aplicados em duplicata no mesmo gel de eletroforese, sendo uma parte revelada por coloração com prata e outra parte revelada com o micro-organismo indicador *Bacillus cereus*, conforme descrito a seguir (item 3.8.8).

3.8.8 Revelação do gel de poliacrilamida por coloração com prata

Para determinar o perfil eletroforético das proteínas no pó líófilo, parte do gel de poliacrilamida foi revelado por coloração de prata (anexo 2) e fotografado em fotodocumentador (Mini Bis UV, DNA Bio-Imagings Systems).

A massa molecular do composto ativo foi estimada em comparação com o padrão pré-corado de baixa massa molecular (3,5 - 38 kDa, Ultra Low Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE).

3.8.9 Revelação do gel de poliacrilamida com o micro-organismo indicador *Bacillus cereus*

Metade do gel de poliacrilamida (item 3.8.7) foi fixado com uma solução aquosa de etanol (Synth) a 40% (v/v) e ácido acético (Synth) a 10% (v/v), por 30 minutos. O gel de poliacrilamida foi lavado em água corrente por 2 horas sob imersão. Logo após, foi colocado sobre uma placa de Petri contendo ágar BHI. Em seguida, foi adicionada uma sobrecamada de ágar BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar, p/v) inoculado a 1% (v/v) com uma cultura de *B. cereus*. Essa placa foi mantida a 4° C por 13 horas, para permitir a difusão das proteínas antimicrobianas pelo ágar e em seguida, foi incubada a 30° C por 8 h/12 h.

Foi verificado se havia halo de inibição de crescimento do micro-organismo indicador e a massa molecular do composto ativo foi estimada em comparação com o padrão pré-corado de baixa massa molecular (3,5 - 38 kDa, Ultra Low Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE). Para isso, foi construída uma curva analítica com os pesos moleculares dos padrões (log) *versus* R_f (distância migrada/comprimento do gel), gerando uma reta, cuja equação foi utilizada para calcular a massa molecular da BLIS.

3.9 Avaliação do potencial antilisteriano da BLIS produzida pelo isolado C

3.9.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A atividade da BLIS no pó liófilo foi quantificada em sextuplicata com duplicatas independentes, utilizando o ensaio de microdiluição em caldo em microplaca de poliestireno (Costar) de 96 poços (CLSI, 2003; NISSEN-MEYER et al., 1992). *L. monocytogenes* foi inoculada em caldo BHI e incubada a 37° C por 24 h. A partir da cultura reativada, foram feitas 3 diluições em caldo BHI para obtenção do inóculo ajustado para 10⁵ UFC/mL de *L. monocytogenes*.

Conforme esquematizado na figura 6, linha A, nas colunas 1 a 3 foram aplicados 200 µL de caldo BHI (controle negativo). Para o controle positivo foram aplicados 180 µL de caldo BHI acrescidos de 20 µL da cultura de *L. monocytogenes* ajustada na 1ª coluna, linhas C a H. A partir da linha C, 2ª a 7ª colunas foram

aplicadas as respectivas concentrações do pó liófilo contendo BLIS nas concentrações de 4,0 mg/mL; 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL. As culturas nas microplacas foram incubadas por 24 h/37° C.

Para determinação da CBM, de cada poço foram retirados 10 µL e semeados em superfície de placas de Petri contendo ágar BHI (Oxoid) com incubação a 37°C por 24h. A CBM foi calculada como a menor concentração da BLIS que apresentou efeito bactericida frente a *L. monocytogenes*.

Figura 7. Representação esquemática do teste microdiluição em caldo BHI (Infuso Cérebro Coração) em microplaca de poliestireno (Costar) de 96 poços utilizado para a determinação da CBM da BLIS, produzida pelo isolado C (pó liófilo) frente ao micro-organismo indicador *Listeria monocytogenes*.

3.9.2 Aplicação da BLIS em polpa de fruta para inibição de *Listeria monocytogenes*

Com base nos estudos da Concentração Bactericida Mínima (CBM), foi escolhida a concentração de BLIS do isolado C (pó liófilo) para realizar experimentos em polpa de abacaxi. Os experimentos foram feitos em triplicatas independentes,

com a bactéria alvo *L. monocytogenes*, que foi previamente inoculada em caldo BHI e incubada a 37°C por 24 h. A partir da cultura reativada de *L. monocytogenes*, foi preparado o inóculo ajustado para 10⁶ UFC/mL. A tabela 8 descreve as condições utilizadas. Para o controle negativo, foram combinados 7 mL de polpa de abacaxi previamente esterilizada e 3 mL de caldo BHI. Para o controle positivo, foram combinados em 7 mL de polpa de abacaxi previamente esterilizada, 100 µL da cultura 10⁶ UFC/mL de *L. monocytogenes* e 3 mL de caldo BHI. Para a preparação da amostra contendo a BLIS, foram utilizados 7 mL de polpa de abacaxi previamente esterilizada, 100 µL da cultura 10⁶ UFC/mL de *L. monocytogenes* e 20 mg da BLIS (pó líofilo) diluída em 3 mL de caldo BHI. Essas preparações foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, alíquotas de 100 µL de cada tubo foram semeadas em superfície de placas de ágar BHI e ágar PALCAM (seletivo para detecção de *L. monocytogenes*). Foi feita a incubação por 24 horas a 37°C e observado se havia ou não crescimento de *L. monocytogenes* nas placas inoculadas.

Tabela 2. Condições utilizadas para determinação da atividade antilisteriana da BLIS produzida pelo isolado C em modelo contendo polpa de abacaxi

Condição	Componentes			
	Polpa de fruta	Caldo BHI	<i>L.</i>	BLIS
	(7mL)	(3 mL)	<i>monocytogenes</i> (1)	(20 mg) (2)
1	X	X	X	
2	X	X		
3	X	X	X	X

(1) Inóculo de 10⁶ de *L. monocytogenes* por mililitro, proveniente de caldo BHI (Infuso Cérebro Coração) incubado a 37°C por 24 h. População final de 10⁴ UFC/mL no alimento modelo.

(2) Preparação contendo BLIS (Substância Semelhante a Bacteriocina) obtida a partir do isolado C (pó líofilo).

4. Resultados

4.1 Isolamento e caracterização de linhagens produtoras de BLIS a partir de polpas de frutas

Foram obtidos três isolados com atividade inibitória frente a *L. monocytogenes*, a partir da polpa de abacaxi, com atividade confirmada pelo teste de antagonismo em ágar (“Spot-on-the-lawn”). Esses isolados foram denominados como A, B e C.

4.2 Avaliação do espectro de atividade inibitória dos isolados com comprovada atividade antilisteriana

A tabela 9 apresenta os resultados do ensaio para determinação do espectro de atividade antibacteriana dos isolados da polpa de abacaxi, utilizando o ensaio “spot-on-the-lawn”. Foi verificada inibição apenas de bactérias Gram-positivas, com maior inibição de bactérias dos gêneros *Listeria* e *Bacillus*.

Tabela 3. Resultados do teste “spot-on-the-lawn” realizado com os isolados A, B e C

Micro-organismo	Média dos halos de inibição em diâmetro (mm)
<i>Bacillus cereus</i> ⁽¹⁾	24
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC ⁽²⁾ 33679 ⁽⁵⁾	10
<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6462 ⁽⁵⁾	22
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 ⁽²⁾	5
<i>Enterococcus durans</i> INCQS 00552 ⁽⁵⁾	10
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521 ⁽³⁾	Zero
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> A9b- ⁽⁷⁾	5
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ⁽⁵⁾	22
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 ⁽⁴⁾	20
<i>Listeria monocytogenes</i> IAL ⁽⁴⁾ 633	20
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17082 ⁽⁴⁾	Zero
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031 ⁽⁴⁾	Zero
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDC ⁽⁶⁾ 1535 ⁽⁴⁾	Zero
<i>Escherichia coli</i> CDC 02A.2B ⁽⁴⁾	Zero
<i>Proteus mirabilis</i> CDC 305 ⁽⁴⁾	Zero
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14502 ⁽⁴⁾	Zero
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 13076 ⁽⁴⁾	Zero

(1)Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

(2)*American Type Culture Collection, Manassas, EUA.*

(3)Linhagem proveniente da *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP*

(4)Linhagem proveniente do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

(5)Linhagem proveniente do *Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.*

(6) *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA.*

(7)*Danish Institute for Fisheries Research, Department of Seafood Research, Lingby, Dinamarca.*

(8) Linhagem proveniente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, cedida pela Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca.

(9) Caldo BHI (*Brain Heart Infusion - Oxoid*).

(10)Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe - Oxoid).

4.3 Avaliação da natureza proteica do inibidor produzido pelo isolado C

A natureza proteica da substância antagônica produzida pelo isolado C foi comprovada pela destruição do inibidor por ação de enzima proteolítica. Na figura 8 pode ser observada ausência de halo de inibição frente ao indicador *B. cereus* onde foi aplicada α - quimotripsina, enquanto que o halo de inibição permaneceu intacto na presença de protease de *Streptomyces griseus*, semelhante ao controle. O mesmo resultado foi observado frente ao indicador *L. monocytogenes*.

Figura 8. Fotografia da placa do ensaio para determinação da natureza do inibidor produzido pelo isolado C. O halo em forma de meia-lua indica degradação do inibidor pela α - quimotripsina, com crescimento do indicador *B. cereus*. H₂O (água), Protease (protease de *Streptomyces griseus* tipo XIV), α (α - quimotripsina)

4.4 Exclusão da inibição por bacteriófagos líticos

Não foram observadas placas de lise nos ensaios realizados e foi excluída a presença de bacteriófagos líticos para o isolado C, frente a *L. monocytogenes*.

4.5 Identificação fenotípica

Na tabela 10, estão mostrados os resultados de provas fenotípicas utilizadas para identificação dos isolados A, B e C obtidos a partir da polpa de abacaxi. Os resultados obtidos para os três isolados foram idênticos, sendo essas linhagens pré-identificadas como *Bacillus cereus*.

Tabela 10. Características fenotípicas dos isolados A, B e C de polpa de abacaxi

Provas fenotípicas	Resultados
Coloração de Gram	Positivo
Morfologia	Bacilo
Produção de catalase	Positivo
Fermentação da glicose	Positivo
Formação de gás pelo metabolismo de glicose	Ausência
Fermentação de arabinose	Negativo
Hidrólise de amido	Positivo
β -hemólise	Positivo
Produção de lecitinase	Positivo
Voges-Proskauer (VP)	Positivo
Vermelho de Metila	Positivo
Motilidade	Positivo
Citrato	Positivo
Redução do nitrato	Positivo

A identificação dos isolados A, B e C, foi confirmada pelo Laboratório de Fisiologia Bacteriana da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Os três isolados A, B e C apresentaram os mesmos perfis de identificação. As cepas de *B. cereus* foram liofilizadas, catalogadas e depositadas na Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGB) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) e registradas como (isolado A) *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1638, (isolado B) *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1639 e (isolado C) *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640.

O perfil toxigênico das linhagens de *B. cereus* determinado por PCR confirmou a presença dos genes das enterotoxinas *entFM*, *bceT*, *ces* e do complexo *hbl* e *nhe* (anexo 1).

Considerando-se que os três isolados A, B e C eram provenientes da mesma amostra e que os resultados dos testes fenotípicos e moleculares de identificação foram idênticos, foi selecionado apenas o isolado C (*Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640), para a realização de experimentos posteriores.

4.6 Quantificação da atividade da BLIS pela técnica de diluição crítica

A atividade inibitória da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 quantificada no Sobrenadante Livre de Células (SLC) pelo ensaio de diluição crítica foi de 80 UA/mL, frente a *L. monocytogenes*.

4.7 Determinação das condições ideais de cultivo para a produção da BLIS por *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640

4.7.1 Meio de cultura

Na tabela 5, estão apresentados os resultados referentes à produção da BLIS por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 em diferentes meios de cultura incubados a 30° C por 24 horas. A maior produção da BLIS foi observada em caldo MRS (80 UA/mL). Em caldo BHI, essa atividade foi de apenas 50% daquela obtida em caldo MRS, enquanto que nos demais meios de cultura testados, não foi observada produção da BLIS.

Tabela 5. Produção da BLIS em diferentes caldos de cultura e determinação da atividade antimicrobiana frente ao indicador *L. monocytogenes*

Caldo de cultura	Atividade de BLIS (UA/mL) ⁽²⁾
MRS	80
BHI	40
Nutriente	Ausente
Mueller-Hinton	Ausente
TSB-YE	Ausente
CAA ⁽¹⁾	Ausente

⁽¹⁾ Caldo CAA, formulado de acordo com Hastings et al. (1991)

⁽²⁾ Determinada pelo ensaio de diluição crítica e expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL).

4.7.2 Temperatura de incubação

Na tabela 6, estão mostrados os resultados dos ensaios de produção de BLIS em diferentes temperaturas. A maior produção foi obtida quando a linhagem de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 foi incubada a 30° C.

Tabela 6. Atividade da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 em caldo MRS em diferentes temperaturas de incubação por 24 horas, determinado pelo ensaio de diluição crítica frente ao indicador *L. monocytogenes*.

Temperatura de incubação (°C)	Atividade de BLIS (UA/mL) ⁽¹⁾
25	20
30	80
37	Ausente
45	Ausente
50	Ausente

⁽¹⁾ Determinada pelo ensaio de diluição crítica e expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL).

4.8 Purificação de BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640

4.8.1 Avaliação da estabilidade térmica da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640

Os resultados dos ensaios de estabilidade térmica da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 frente ao indicador *L. monocytogenes* estão apresentados na tabela 7. A BLIS permaneceu estável entre 60 a 80° C por até 30 minutos, mas a 90° C foi perdida 50% da atividade e a 121° C por 15 minutos houve perda total de atividade antimicrobiana.

Tabela 7. Estabilidade térmica da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 em caldo MRS

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Atividade BLIS (UA/mL) (1)
Controle sem aquecimento	-	80
60	15	80
	30	80
70	15	80
	30	80
80	15	80
	30	80
90	15	40
	30	40
121	15	Zero

(1) Determinada pelo ensaio de diluição crítica e expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL), utilizando *L. monocytogenes* como indicador.

4.8.2 Estabilidade da BLIS em diferentes pHs

O SLC de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 utilizado como controle neste ensaio apresentava pH de 5,7 e atividade de 80 UA/mL frente a *L. monocytogenes*. Os resultados para os outros pHs foram: pH 2 (40 UA/mL); pH 4 (40 UA/mL); pH 5 (80 UA/mL); pH 6 (80 UA/mL); pH 7 (40 UA/mL); pH 8 (20 UA/mL); pH 9 (20 UA/mL) e pH 10, ausência de halo de inibição.

4.8.3 Purificação e caracterização da atividade antimicrobiana da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 utilizando resinas XAD-16 e SP-Sepharose

A atividade antimicrobiana de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, cultivado em 600 mL de caldo MRS a 30° C por 24 horas, foi determinada pelo ensaio de diluição crítica (item 3.6), frente ao indicador *B. cereus*. Ao final do período de incubação, o sobrenadante livre de células (SLC) apresentava 80 UA/mL.

Após purificação em resina XAD-16, também foi obtida uma atividade da BLIS de 80 UA/mL e após a extração em resina de troca catiônica SP-Sepharose, a atividade da BLIS era de 160 UA/mL (tabela 8).

4.8.4 Quantificação da atividade antimicrobiana da BLIS parcialmente purificada

A atividade antimicrobiana de uma suspensão de 100 mg/mL do pó líofilo obtido a partir de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, foi quantificada frente ao indicador *B. cereus*, pelo ensaio de diluição crítica, resultando em 160 UA/mL. Além disso, foi observado que a suspensão não apresentou atividade hemolítica.

4.8.5 Quantificação de proteínas totais e determinação da atividade específica da BLIS

A purificação da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 pela técnica de extração em resina XAD-16 seguida por extração em resina de troca catiônica SP-Sepharose apresentou um rendimento de 30% e fator de purificação de 4,1 vezes (tabela 8).

Tabela 8. Quantidade de proteínas totais (mg/mL), atividade total da BLIS (UA), atividade específica da BLIS (UA/mg), fator de purificação e rendimento (%) durante as etapas de purificação por extração em resinas XAD-16 e SP-Sepharose da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 164, utilizando *B. cereus* como indicador

Etapas de purificação	Volume total (mL) ⁽¹⁾	Proteínas totais (mg/mL) ⁽²⁾	Atividade total de BLIS (UA) ⁽⁴⁾	Atividade específica de BLIS (UA/mg) ⁽⁵⁾	Fator de purificação ⁽⁶⁾	Rendimento (%) ⁽⁷⁾
Sobrenadante da cultura	600 mL	ND ³	48000	ND ³	ND ³	100
XAD-16	60 mL	0,00914	4800	8752,73	ND ³	10
SP-Sepharose	90 mL	0,00449	14400	35634,74	4,1 vezes	30

⁽¹⁾ Volume total de amostra inicial de Sobrenadante da cultura Livre de Células (SLC) e volumes dos extratos obtidos após cada etapa de purificação.

⁽²⁾ Valores determinados pelo método de Bradford, com leitura no comprimento de onda 595nm.

⁽³⁾ Valores não determinados (ND)

⁽⁴⁾ Determinada pelo ensaio de diluição crítica, considerando o volume total de amostra e expressa em Unidades Arbitrárias.

⁽⁵⁾ Determinada pela razão entre a atividade total da BLIS e a quantidade de proteínas totais, expressa em Unidades Arbitrárias por miligrama.

⁽⁶⁾ Determinada em função da atividade específica da BLIS em cada etapa de purificação.

⁽⁷⁾ Rendimento em porcentagem determinado pela razão entre a atividade total da BLIS da amostra e a atividade total de BLIS no sobrenadante da cultura.

4.8.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O perfil eletroforético da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 presente no pó liófilo está representado na figura 9. A massa molecular foi estimada em 25 kDa por comparação da região do gel com atividade inibitória com os marcadores de massa molecular, sendo construída uma curva analítica com os pesos moleculares dos padrões (log) versus R_f (distância migrada/comprimento do

gel), gerando uma reta, cuja equação foi utilizada para calcular a massa molecular da BLIS (ZWAAN, 1967).

Figura 9. Fotografias do gel de poliacrilamida após eletroforese utilizada para estimar a massa molecular da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 (pó liófilo). O gel A foi revelado por coloração com prata, sendo aplicados 20 µL de amostra nas canaletas 1 e 2; na canaleta 3 foi aplicado o marcador de massa molecular. O gel B foi revelado com *B. cereus* pelo ensaio de inibição em ágar, sendo aplicados 20 µL de amostra nas canaletas 4 e 5 e na canaleta 6 foi aplicado o marcador de massa molecular (a seta indica a região de inibição do indicador).

4.9 Avaliação do potencial bioconservador de extrato semi-purificado da BLIS produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 frente ao indicador *L. monocytogenes*

4.9.1 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A menor concentração do pó liófilo que apresentou atividade bactericida frente a *L. monocytogenes* foi 2,0 mg/mL, apresentando uma concentração de proteínas de proteínas totais de 1,92 µg/mL.

4.9.2 Aplicação da BLIS em polpa de fruta para inibição de *Listeria monocytogenes*

A CBM da BLIS foi utilizada para definir a quantidade do pó liófilo a ser aplicada no sistema alimentar modelo de polpa de abacaxi, e foram utilizados 20 mg/10 mL. Na presença de BLIS foi observada completa inibição do crescimento de *L. monocytogenes* após 24 h/37° C, conforme resultados obtidos em placas de ágar BHI e ágar PALCAM (< 10 UFC/mL). A população de *L. monocytogenes* foi de 10⁴ UFC/mL no controle sem BLIS de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640.

5. Discussão

O objetivo inicial deste trabalho foi o isolamento de bactérias lácticas (BAL) a partir de frutas e/ou polpas de frutas tropicais. É descrito na literatura, que a ocorrência de BAL em frutas é pequena (ICMSF, 2011), mas apesar disso, por se tratar de uma matriz pouco explorada como fonte de BAL bacteriocinogênicas, pode oferecer uma fonte alternativa para obtenção de bactérias produtoras de novos peptídeos antimicrobianos. Estes peptídeos apresentam maior estabilidade neste tipo de matriz, em comparação com peptídeos obtidos de outras fontes, visando à aplicação no mesmo alimento (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002; GÁLVEZ et al., 2007). No Brasil, é permitido o uso de aditivos químicos em polpa de frutas destinadas à industrialização de outras bebidas e não destinadas ao consumo direto, conforme legislação específica (BRASIL, 2000).

As polpas de frutas comerciais devem ser obtidas por processos tecnológicos adequados, (BRASIL, 2000). Neste trabalho, as amostras de polpas de frutas comerciais disponíveis eram todas pasteurizadas.

Deste modo, nas amostras analisadas, poderiam estar presentes linhagens de bactérias termodúricas, ou seja, que podem sobreviver a temperaturas relativamente altas, mas não necessariamente, crescem nestas temperaturas. Alguns micro-organismos não formadores de esporos que podem sobreviver a temperaturas de pasteurização são pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Dentre os micro-organismos esporulados provenientes da matéria-prima, no alimento analisado seria provável a presença de *Bacillus* sp. e outros gêneros relacionados (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; McAULAY et al., 2012).

Além disso, BAL poderiam eventualmente estar presentes nas polpas pasteurizadas comerciais como contaminantes pós-processamento, visto que a presença de micro-organismos sensíveis à pasteurização já foi relatada nesse tipo de produto (SANTOS; COELHO; CARREIRO, 2008).

A prospecção de novos conservadores para sucos de frutas e produtos derivados contendo suco ou polpa, como por exemplo, refrigerantes, é de grande interesse, pois nos últimos anos, há um grande debate sobre a inocuidade de conservadores da classe dos benzoatos para uso em bebidas carbonatadas, visto que há suspeitas sobre a carcinogenicidade destes compostos e derivados (TSAY et

al.; 2007). Deste modo, bacteriocinas e BLIS poderiam oferecer uma alternativa para substituir ou reduzir o uso de benzoatos nestes produtos.

A conservação de refrigerantes depende, primariamente, da formulação (fatores intrínsecos) combinada com boa sanitização de equipamentos e boas práticas de fabricação. Um sistema de múltiplas barreiras controlando todos esses fatores deve resultar em produtos microbiologicamente estáveis. Mais recentemente, além de combinações de ácidos benzóicos e sórbico, há interesse em outros conservadores como barreiras adicionais ao crescimento microbiano em refrigerantes (DI GIACOMO; GALLAGHER, 2001).

De Carvalho, Vanetti e Mantovani (2007), avaliaram a utilização da bacteriocina bovicina HC5 produzida por *Streptococcus bovis*, para inibir a produção de gás pela bactéria deteriorante *Clostridium tyrobutyricum* inoculada em polpa de manga em diferentes condições de pH (4,0 a 7,0) e aquecimento a 121°C por 15 minutos. Os autores relataram que a bovicina HC5 foi estável no produto e apresentou maior atividade bactericida em pH mais ácido. De Carvalho, Vanetti e Mantovani (2008), complementaram o estudo com a bovicina HC5 em condições ácidas em polpa de manga, verificando a inibição da bactéria deteriorante, termoacidófila e esporogênica *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Além disso, uma BAL produtora de bacteriocina foi isolada, recentemente, por Geraldi et al. (2012), a partir de uma amostra de carambola *in natura* (*Averrhoa carambola*), utilizando o ágar MRS, seletivo para BAL, sendo identificada como *Leuconostoc paramesenteroides*.

No presente trabalho, também foi utilizado o ágar MRS para selecionar BAL, a partir de polpas de frutas comerciais, e todas as colônias obtidas na etapa de isolamento foram avaliadas quanto à atividade antagônica frente a *L. monocytogenes*, ao invés de colocar sobrecamada na placa de isolamento, conforme preconizado por Lewus, Kaiser e Montville (1991). Este procedimento foi adotado porque cresceram poucas colônias no ágar MRS, em comparação com amostras de outros produtos alimentícios (DE MARTINIS et al., 2001). Deste modo, foram obtidos três isolados com atividade antilisteriana, denominados A, B e C.

Os isolados A, B e C foram submetidos à identificação preliminar para BAL, que consistiu nas provas de catalase e Gram, de acordo com Schillinger e Lücke (1987). Foi constatado que os isolados eram catalase positivos, e portanto, ao contrário do que poderia se supor pelo meio de isolamento empregado, não eram BAL. Essas

linhagens foram classificadas, preliminarmente, como *Bacillus* sp. e, posteriormente, identificadas como *Bacillus cereus* através de provas fenotípicas e moleculares, sendo que os três isolados apresentaram resultados idênticos em todas as provas realizadas. Deste modo, para experimentos subsequentes, foi selecionado o isolado C, denominado *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640.

Na literatura recente, é evidente o interesse por bacteriocinas ou BLIS de *Bacillus* sp., para aplicação em alimentos, devido à alta estabilidade destes compostos em amplas faixas de pH e temperatura, além da possibilidade da descoberta de novos protótipos de drogas antimicrobianas, para uso em alimentos e também, na área de novos medicamentos (ABRIOUEL et al., 2011; BIZANI et al., 2008).

Bizani e Brandelli (2002) relataram o isolamento de *B. cereus* 8A produtor de bacteriocina, a partir de solo, e aquela linhagem foi posteriormente testada para sua atividade antilisteriana em alimentos, como leite e queijo (BIZANI et al., 2008).

Destaca-se também o interesse na aplicação de *Bacillus* como probióticos, conforme revisão publicada por Sanders; Morelli e Tompkins (2003). Esporos de cepa comercial de *B. cereus* (CenBiot) foram testados como probióticos para controlar diarreia em suínos em fase de amamentação, como alternativa a terapêutica com antibióticos (ZANI et al., 1998). Além disso, a linhagem não toxigênica de *B. cereus* ssp. var. *toyoi* foi aplicada como um potencial probiótico na dieta de porcos, obtendo resultados satisfatórios (LODEMANN et al., 2008).

O espectro da atividade inibitória de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 produtor da BLIS foi avaliado no presente trabalho por antagonismo em ágar e os resultados da Tabela 9 revelaram que houve inibição de todas as linhagens de *Bacillus* sp. e *Listeria* sp. testadas, bem como *Staphylococcus aureus* e algumas BAL, enquanto que as bactérias Gram negativas não foram inibidas. Resultados semelhantes foram obtidos por Sebei et al. (2007) ao avaliarem o espectro da atividade da cereína MRX1 produzida por *B. cereus*. Utilizando o ensaio “spot-on-the-lawn”, os autores relataram a inibição de diversas linhagens de *Bacillus* e *Listeria innocua*, mas as bactérias Gram negativas não foram inibidas. Segundo Stevens et al. (1991), a membrana externa das bactérias Gram-negativas atua como uma barreira de permeabilidade, impedindo a ação da maioria das bacteriocinas na membrana celular.

A natureza proteica da substância antagônica produzida pela linhagem de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 foi avaliada utilizando *Bacillus cereus* como micro-organismo indicador, por meio do teste “spot-on-the-lawn” modificado e foi demonstrada a destruição do inibidor pela ação da enzima proteolítica α -quimotripsina, enquanto que a atividade antimicrobiana permaneceu inalterada na presença de protease de *S. griseus*. Deste modo, foi considerado que a substância inibitória produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 era uma BLIS. Sebei et al. (2007) estudaram a sensibilidade da substância inibitória, produzida por *Bacillus cereus* MRX1, frente a diferentes enzimas proteolíticas e, diferentemente do presente trabalho, relataram que houve perda da atividade pela ação de todas as proteases testadas (proteinase K, actinase E e α -quimotripsina).

Neste trabalho, foi observada maior produção de BLIS pela linhagem de *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 em caldo MRS a 30°C (tabela 11). No mesmo caldo, a 37°C houve crescimento da bactéria, sem produção de BLIS, enquanto que não houve crescimento a 40°C. É bem reconhecido que a temperatura de incubação pode interferir, não apenas no crescimento microbiano, mas também na produção de BLIS. Sebei et al. (2007) relataram que a linhagem bacteriocinogênica de *B. cereus* não produzia bacteriocina quando incubada em temperaturas superiores a 37°C. Hammami et al. (2009) ao testarem a influência da temperatura na produção de bacteriocina Bac 14 por *Bacillus subtilis* 14B determinaram que a maior atividade foi obtida a 30°C, e não houve produção de bacteriocina acima de 37°C.

A influência do meio de cultura na produção de bacteriocina foi estudada por Naclerio et al. (1993), com a linhagem de *B. cereus* GN105 produtor de cereína e a maior atividade antimicrobiana foi obtida em caldo BHI suplementado com 0,1% de glicose, com incubação a 30°C, enquanto que a 37°C a bacteriocina não foi produzida. Bizani e Brandelli (2004) relataram maior produção de cereína 8A por *B. cereus* em caldo BHI a 30 °C.

Outro aspecto importante na caracterização de novas linhagens produtoras de BLIS é a determinação da estabilidade térmica dos compostos produzidos, conforme afirmaram Carolissen-Mackay, Arendse e Hastings (1997). Neste trabalho, foi estudada a estabilidade da BLIS produzida por *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, presente no sobrenadante livre de células (SLC) obtido a partir da cultura em caldo MRS. Foi observado que até 80°C (Tabela 13) não houve degradação da substância

antimicrobiana, mas houve perda de 50% da atividade antilisteriana a 90°C e perda total após tratamento térmico em autoclave (121° C/15 minutos). A estabilidade térmica de outro peptídeo antimicrobiano, produzido por *Bacillus cereus*, foi estudada por Bizani, Dominguez e Brandelli (2005), que relataram que a cereína 8A manteve sua atividade, quando foi aquecida até 75°C por 30 minutos. Os resultados dos ensaios de estabilidade térmica da cereína produzida por *Bacillus cereus* GN105 também são concordantes com os resultados obtidos no presente trabalho (NACLERIO et al., 1993). Aqueles autores relataram que a cereína foi parcialmente estável por 15 minutos a 75° C, mas foi destruída a 90° C. Contudo, maior termoestabilidade foi relatada para a cereína 7 produzida por *Bacillus cereus* BC7 (OSCÁRIZ; PISABARRO, 2000).

A estabilidade da BLIS, produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, em diferentes condições de pHs também foi estudada neste trabalho, sendo observado que a atividade foi parcialmente mantida na faixa de pH de 2 a 9. Estes resultados são parcialmente concordantes com Bizani, Dominguez e Brandelli (2005) e Hammami et al. (2009), demonstrando o potencial de aplicação de bacteriocinas de *Bacillus* em alimentos em diferentes faixas de pHs.

Com o objetivo de melhor caracterizar o composto responsável pela atividade antimicrobiana de *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, foram realizados ensaios para purificação parcial da BLIS produzida. Considerando que o Tween 80% é um tensoativo hidrofílico que pode interferir na purificação de proteínas (CAROLISSEN-MACKAY; ARENDSE; HASTINGS, 1997), foi inicialmente quantificada a produção da BLIS em caldo MRS sem o tensoativo, em comparação com o caldo MRS comercial. A atividade inibitória da BLIS de *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 no caldo de cultura foi a mesma, independentemente da presença do tensoativo e, desse modo, as culturas preparadas para purificação da BLIS foram realizadas em caldo MRS sem Tween 80%.

A cultura de *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, obtida em caldo MRS sem Tween 80% a 30° C, foi purificada com resina Amberlite XAD-16. Essa resina é composta por copolímeros não iônicos com macroporos sendo, frequentemente, utilizada em separações cromatográficas e para concentração de proteínas (ROSSUM; WEBB, 1978; YANG; PYLE, 1999). O mecanismo de adsorção de moléculas, íons e solventes orgânicos a este tipo de resina não é totalmente

compreendido, mas envolve, provavelmente, interações hidrofóbicas ou hidrofílicas entre o soluto orgânico e os solventes que atuam na eluição desses compostos (DUARTE; DUARTE, 2005). Peptídeos antimicrobianos geralmente possuem até 50 resíduos de aminoácidos e são catiônicos, devido à presença de múltiplos resíduos de lisina e arginina e com uma grande região de resíduos hidrofóbicos (SAAVEDRA; CASTELLANO; SESMA, 2004).

No presente trabalho, o composto ativo eluiu da coluna de XAD-16 com isopropanol 70% e foi obtido rendimento de 10%, ou seja, 60 mL de extrato com atividade de 80 UA/mL, quantificada com *Bacillus cereus* como micro-organismo indicador (Tabela 14). Resinas XAD são amplamente empregadas para concentração de peptídeos antimicrobianos e, geralmente, possibilitam significativa eliminação de contaminantes proteicos, com rendimento variável, mas para obtenção de extratos, com alto grau de pureza, ainda são necessárias várias etapas cromatográficas subsequentes (SAAVEDRA; CASTELLANO; SESMA, 2004).

Considerando-se as características catiônicas e hidrofóbicas das BLIS, diferentes tipos de colunas cromatográficas são recomendadas, sendo que na primeira escolha, geralmente, são utilizadas colunas de troca iônica com eluição dos peptídeos antimicrobianos em gradiente linear de cloreto de sódio (SAAVEDRA; CASTELLANO; SESMA, 2004). No presente trabalho, foi utilizada a resina de troca catiônica SP-Sepharose, equilibrada com solução tampão fosfato de sódio monobásico (30 mM, pH 5,7) e posterior aplicação de gradiente linear de cloreto de sódio de 0 a 1 M em tampão fosfato de sódio monobásico 30 mM pH 5,7 para eluição. Com estes procedimentos, o analito de interesse (BLIS) não foi ligado à matriz da resina e eluiu com a solução tampão fosfato de sódio monobásico. Essa fração, com volume total de 90 mL e atividade de 160 UA/mL, forneceu rendimento de 30%, com fator de purificação de 4,1 e atividade específica da BLIS de 35.634,74 UA/mg (tabela 14). Uma hipótese para explicar este aumento de atividade em relação à etapa anterior, é que tenha ocorrido a desagregação das moléculas da BLIS durante o processo de purificação (STOFFELS; HANS-GEORG; GUDMUNDSDÓTTIR, 1993).

A purificação de BLIS de *Bacillus cereus* também foi realizada com resinas de troca aniônica por outros autores. Bizani, Dominguez e Brandelli (2005) obtiveram um fator de purificação de 54 vezes em relação ao SLC para cereína 8A, utilizando a

precipitação com sulfato de amônio e extração em resina Q-Sepharose. Contudo, Sebei et al. (2007) relataram um rendimento de 5,3% em relação ao SLC, na purificação da cereína MRX1, realizada com resina XAD-16, seguida de troca catiônica em resina SP-Sepharose e atribuíram a perda de proteínas à fraca ligação da bacteriocina na resina de troca catiônica. Oscáriz et al. (2006) utilizaram resinas SP-Sepharose e octil-Sepharose associadas a outras técnicas cromatográficas e obtiveram sucesso para purificar as bacteriocinas não sinérgicas, cereínas 7A e 7B, produzidas por *Bacillus cereus* Bc7.

Neste trabalho, o extrato semi-purificado nas resinas XAD-16 e SP-Sepharose contendo a BLIS, produzida por *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, foi dialisado e liofilizado. O pó líofilo foi utilizado em experimentos para inibição de *L. monocytogenes* em polpa de abacaxi, alimento do qual a linhagem foi inicialmente obtida. Para isso, foi utilizado um sistema modelo preparado com polpa de abacaxi e caldo BHI, na proporção de 7:3, artificialmente inoculado com 10^4 UFC/mL de *L. monocytogenes*. As populações de *L. monocytogenes* foram avaliadas neste alimento modelo, na presença de 2 mg/mL da BLIS (pó líofilo), em comparação com um controle sem BLIS. Essa concentração foi escolhida com base nos ensaios *in vitro*, para determinação da CBM da BLIS de *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, frente à *L. monocytogenes*. Não houve multiplicação de *L. monocytogenes* no alimento modelo mantido a 37°C por 24 h, mas o patógeno sobreviveu, com populações inalteradas, na ausência de BLIS. Entretanto, foi observado que a BLIS foi listericida e as populações de *L. monocytogenes* estavam abaixo do limite de detecção dos métodos empregados para enumeração do patógeno. Estes resultados são promissores para atingir a redução de patógenos em 5 log CFU, conforme preconizado para sucos de frutas (UNITED STATES-FDA, 2001) e, neste sentido, experimentos adicionais deverão ser realizados.

É reconhecido que bacteriocinas ativas *in vitro* podem perder atividade *in situ*, devido à interação com componentes do alimento. Além disso, podem apresentar modo de ação bactericida em meios de cultura e serem apenas bacteriostáticas em alimentos (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002). Os resultados dos experimentos do presente trabalho com polpa de frutas indicam o potencial da BLIS produzida por *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 para bioconservação.

Para melhor caracterizar a substância responsável pela atividade antibacteriana, a massa molecular da BLIS, produzida por *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, foi estimada por SDS-PAGE em 25 kDa, por comparação com marcador de massa molecular.

Bizani, Dominguez e Brandelli (2005) encontraram massa molecular semelhante para a bacteriocina cereína 8A, de 26 kDa. Entretanto, Naclerio et al. (1993) determinaram uma massa molecular de 9 kDa para a cereína produzida por *B. cereus* GN105, também utilizando SDS-PAGE, enquanto Risoen et al. (2004) encontraram uma massa molecular de apenas 4 kDa para a BLIS de *Bacillus cereus* ATCC 10987.

Diante do potencial antimicrobiano da BLIS produzida pela linhagem de *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, demonstrado neste trabalho, estudos posteriores deverão ser realizados para a completa caracterização do peptídeo.

6. Conclusões

Bacillus cereus LFB-FIOCRUZ 1640 produtor de BLIS foi isolado de polpa de abacaxi. O peptídeo antimicrobiano produzido apresentou capacidade de inibir diversas linhagens de bactérias Gram-positivas e teve boa estabilidade térmica e em diferentes pHs.

O meio ideal para o cultivo de *Bacillus cereus* LFB-FIOCRUZ 1640 foi o caldo MRS e a BLIS foi purificada empregando as resinas XAD-16 e SP-Sepharose, permitindo a obtenção de extrato semi-purificado, com atividade inibitória frente a *L. monocytogenes* e *B. cereus*.

O pó líófilo obtido da preparação proveniente da etapa de purificação permitiu a estimativa da massa molecular da BLIS em 25 kDa por SDS-PAGE e foi demonstrado que o extrato semi-purificado apresentou atividade listericida em sistema modelo contendo polpa de abacaxi.

7. Referências

ABEE, T. KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 169-185, 1995.

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M. A. P.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 201-232, 2011.

ALLENDE, A.; MARTÍNEZ, B.; SELMA, V.; GIL, M. I.; SUÁREZ, J. E.; RODRÍGUEZ, A. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes in vitro* and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiology**, v. 24, p. 759-766, 2007.

ALLISON, G. E.; KLAENHAMMER, T. R. Phage resistance mechanism in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 207-226, 1998.

ANSARI, A.; AMAN, A.; SIDDIQUI, N. N.; IQBAL, S.; QADER, S. A . Bacteriocin (BAC-IB17): screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 195-201, 2012.

AWUAH, G. B.; RAMASWAMY, H. S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 584-602, 2007.

AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. 63 p.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer, 2008. 276 p.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 512-519, 2002.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 158-162, 2004.

BIZANI, D.; DOMINGUEZ, A. P. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 269-273, 2005.

BIZANI, D.; MORRISSY, J. A. C.; DOMINGUEZ, A. P. M.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 229-233, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5 mg/kg. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jan. 1996. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_96.htm > Acesso em: 12 jul. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultaconsultarLegislacao.do;jsessionid=dd4039622df34fe853a6aa7f583d046c0d6ed44388db402a5e1f6dd86aa89e38.e3uQb3aPbNeQe3yLaxuLahuTbi0?operacao=visualizar&id=7777> > Acesso em: 16 jul. 2012.

BUENO, S. M. GRACIANO, R. A. S; FERNANDES, E. C. B.; GARCIA-CRUZ, C. H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 121-126, 2002.

CABO, M. L.; MURADO, M. A.; GONZÁLEZ, M. P.; PASTORIZA, L. A method for bacteriocin quantification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 907-914, 1999.

CAGGIA, C.; SCIFÒ, O. G.; RESTUCCIA, C.; RANDAZZO. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. **Food Control** , v. 20, p. 59-66, 2009.

CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 1-16, 1997.

CHAN, Y. C.; WIEDMANN, M. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 237-253, 2009.

CHEHIMI, S.; DELALANDE, F.; SABLÉ, S.; HAJLAOUI, M. R.; VAN DORSSELAER, A.; LIMAM, F.; PONS, A.; M. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 284-290, 2007.

CHEIGH, C. I.; KOOK, M. C.; KIM, S. B.; HONG, Y. H.; PYUN, Y. R. Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A 164 using expanded bed ion exchange chromatography. **Biotechnology letters**, v. 26, p. 1341-1345, 2004.

CHERIF, A. CHEHIMI, S.; LIMEM, F.; HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 990-1000, 2003.

CINTAS, L. M.; HERRAZ, C.; HERNÁNDEZ, P. E.; CASAUS, M. P.; NES, L. F. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 281-305, 2001.

CLADERA-OLIVEIRA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 251-256, 2004.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: WILLIAMS e WILKINS, C. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2. Baltimore: Sneath, P. H. A. 1986. 1105-1141 p.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada**. 6 ed. Documento M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4) v. 23, n. 2, 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>> Acesso em: 29 jul. 2012.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

DE CARVALHO, A. A. T. D.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 45, p. 68-74, 2007.

DE CARVALHO, A. A. T. D.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1685-1691, 2008.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p. 191-208, 2002.

DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sakei* strain. **International Journal Food Microbiology**, v. 42, p. 119-126, 1998.

DE MARTINIS, E. C. P.; PÚBLICO, M. R. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 32-37, 2001.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

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

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

DI GIACOMO, R.; GALLAGHER, P. Soft drinks. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington DC, American Public Health Association, 2001. 676 p.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PRÉVOST. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DUARTE, R. M. B. O.; DUARTE, A. C. Application of Non-Ionic Solid Sorbents (XAD Resins) for the Isolation and Fractionation of Water-Soluble Organic Compounds from Atmospheric Aerosols. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 51, p. 79-93, 2005.

EHLING-SCHULZ, M.; GUINEBRETIERE, M. H.; MONTHAN, A.; BERGE, O.; FRICKER, M.; SVENSSON, B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, p. 232-240, 2006.

ELEGADO, F. B.; KIM, W. J.; KWON, D. Y. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 1-11, 1997.

FERNANDES, A. G. **Alterações das características químicas e físico-químicas do suco de goiaba (*Psidium guajava* L.) durante o processamento**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. **Food Microbiology**, v.19, p. 423-430, 2002.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 142-148, 2010.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 125-152, 2008.

GERALDI, M. V.; CATANOZE, P. C.; SOUZA, V. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Frutas tropicais como fonte de isolamento de bactérias lácticas com potencial bioconservador de alimentos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 20., 2012, São Paulo (submetido).

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Dualistic aspects of Enterococci ssp in foods. In: **current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz: Formatex, 2010, 1620.

GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, N.; BEN OMAR, M.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; VALDIVIA, E.; GÁLVEZ, A. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 289-297, 2005.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223-228, 1997.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, A.; REBAI, A.; NESME, S. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 253-260, 2009.

HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; URDACI, M. C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 42-50, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Food 8**. New York: Springer, 2011. 400 p.

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

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. New York: Springer, 2005. 469 p.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-86, 1993.

KOSEKI, S.; ISOBE, S. Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 217-225, 2005.

LAPPE, R.; CLADERA-OLIVEIRA, F.; DOMINGUEZ, A. P. M.; BRANDELLI, A. Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 223-227, 2009.

LEE, H.; KIM, H. Y. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 229-235, 2011.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.

LODEMANN, U.; LORENZ, B. M.; WEYRAUCH, K. D.; MARTENS, H. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. **Archives of Animal Nutrition**, v. 62, p. 87-106, 2008.

LOHANS, C. T.; VEDERAS, J. C. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

MARTIN-VISSCHER, L. A.; VAN BELKUM, M. J.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; WHITTAL, R. M.; ZHENG, J.; MCMULLEN, L. M.; VEDERAS, J. C. Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium mataromaticum* UAL307. **Applied and Environmental Microbiology Letters**, v. 74, p. 4756-4763, 2008.

MATTA, V. M.; FREIRE JUNIOR, M.; CABRAL, L. M. C.; FURTADO, A. A. L. **Polpa de fruta congelada**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 35 p. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/114308> > Acesso em: 23 jul. 2012.

MATTIETTO, R. A.; MATTA, V. M. Statistical evaluation of camu-camu pulp pasteurization using a composed rotational experimental plan. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 11., 2011, Atenas.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. **Methodos in Microbiology**, v. 7, p. 313-342, 1972.

McAULEY, C. M.; GOBIUS, K. S.; BRITZ, M. L.; CRAVEN, H. M. Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 162-168, 2012.

MOLINOS, A. C.; ABRIOUEL, H.; BEN OMAR, N.; LUCAS, R.; VALDIVIA, E.; GÁLVEZ, A. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 2460-2467, 2008.

MONTVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R. **Food Microbiology an Introduction**. Washington, DC: ASM, 2008. 428 p.

MUTUS, R.; KOCABAGLI, N.; ALP, M.; ACAR, N.; EREN, M.; GEZEN, S. S. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. **Poultry Science**, v. 85, p. 1621-1625, 2006.

NACLERIO, G.; RICCA, E.; SACCO, M.; DE FELICE, M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4313-4316, 1993.

NISSEN-MEYER, J.; HOLO, H.; HAVARSTEIN, L. S.; SLETTEN, K.; NES, I. F. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 17, p. 5686-5692, 1992.

NISSEN-MEYER, J. NES, I. F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Archives of Microbiology**, v. 167, p. 67-77, 1997.

OSCÁRIZ, J. C.; CINTAS, L.; LASA, H. H.; NES, I. F.; PISABARRO, A. G.; Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, p. 108-115, 2006.

OSCÁRIZ, J. C.; LASA, I.; PISABARRO, A. G. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **Journal of applied microbiology**, v. 89, p. 361-369, 2000.

OSCÁRIZ, J. C.; LASA, I.; PISABARRO, A. G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with broad spectrum of activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, p. 337-341, 1999.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, p. 593-604, 2002.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 6, p. 465-499, 2003.

PENTEADO, A. L.; LEITÃO, M. F. F.; Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 89-94, 2004.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 546-553, 2007.

RÂPEANU, G.; PARFENE, G.; HORINCAR, V.; POLCOVNICU, C. IONESCU, L.; BAHRIM, G. Confirmation and identification of *Listeria* species from fresh lettuce. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 13, p. 32-36, 2008.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, p. 357-364, 2002 a.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology and application. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, p. 117-137, 2002 b.

RISOEN, P. A.; RONNING, P.; HEGNA, I. K.; KOLSTO, A. B. Characterization of a broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 964, p. 648-655, 2004.

ROSSUM, P. V.; WEBB, R. G. Isolation of organic water pollutants by XAD resins and carbon. **Journal of Chromatography A**, v. 150, p. 381-392, 1978.

SAAVEDRA, L.; CASTELLANO, P.; SESMA, F. Purification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: SPENCER, J. F.; SPENCER, A. L. R.; **Public Health Microbiology: Methods in Molecular Biology**. New York: Springer, 2004. 336 p.

SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 101-110, 2003.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1523-1538, 2011.

SANTOS, C. A. A.; COELHO, A. F. S.; CARREIRO, S. C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 913-915, 2008.

SCHAGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

SCHILLINGER, U. LÜCKE, F. K. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. **Food Microbiology**, v. 4, p. 199-208, 1987.

SEBEI, S.; ZENDO, T.; BOUDABOUS, A.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K.; Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1621–1631, 2007.

STENFORS ARNESEN, L. P.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 579-606, 2008.

STOFFELS, G.; HANS-GEORG, S.; GUDMUNDSDÓTTIR, A. Carnocin UI49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various gram-positive bacteria including *Listeria* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 20, p. 199-210, 1993.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008.

SHIN, H.; BANDARA, N.; SHIN, E.; RYU, S.; KIM, K. Prevalence of *Bacillus cereus* bacteriophages in fermented foods and characterization of phage JBP901. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 791-797, 2011.

SHINAGAWA, K. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 125-142, 1990.

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

STILES, M.E.; HASTINGS, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends Food Science Technology**, v. 2, p. 247-251, 1991.

STORM, D. R.; ROSENTHAL, K. S.; SWANSON, P. E. Polymyxin and related peptide antibiotics. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, p. 723-763, 1977.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, p. 722-756, 1976.

TAVARES FILHO, L. F. Q. **Conservação da polpa de cajá por métodos combinados**. 2007. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 2007.

TAYLOR, T. M.; BRUCE, B. D.; WEISS, J.; DAVIDSON, P. M. *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition *in vitro* by liposome-encapsulated nisin and ethylene diamine tetra acetic acid. **Journal of Food Safety**, v. 28, p. 183-197, 2008.

TEIXEIRA, M. L. ; CLADERA-OLIVEIRA, F.; DOS SANTOS, J.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a peptide from *Bacillus licheniformis* showing dual antimicrobial and emulsifying activities. **Food Research International**, v. 42, p. 63-68, 2009.

THOMAS, L.V.; WIMPENNY, J. W. T. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2006-2012, 1996.

TSAY, H. J.; WANG, Y. H.; CHEN, W. L.; HUANG, W. Y.; CHEN, Y. H. Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebra fish larvae. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 29, p. 562–569, 2007.

TURKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, p. 4-14, 2007.

TRIBST, A. A. L.; SANTANA, A. S.; MASSAGUER, P. R. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices past, present and future perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 310-339, 2009.

UNITED STATES - FDA. Food and Drug Administration. Federal Register Final Rule - 66 FR 6137: Hazard Analysis and Critical Control Point (HAACP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice, 2001. Disponível em: <<http://>

www.fda.gov/Food/FoodSafety/HazardAnalysisCriticalControlPointsHACCP/JuiceHACCP/ucm073594.htm> Acesso em: 30 jul. 2012.

UTENG, M.; HAUGE, H. H.; BRONDZ, L.; NISSEN-MEYER, J.; FIMLAND, G. Rapid two-step procedure for large scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 952-956, 2002.

WANG, W.; LIU, Q.; CUI, H. Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulphate fractionation. **Electrophoresis**, v. 28, p. 1-3, 2007.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations**. 3 ed. New York: Wiley-VCH, 2005. 349 p.

YANG, R.; JOHNSON, M.; RAY, B. Novel Method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteriat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3355-3359, 1992.

YANG, I. C.; SHIH, D. Y.; HUANG, T. P.; HUANG, Y. P.; WANG, J. Y.; PAN, T. M. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2123-2130, 2005.

YANG, S. A.; PYLE, D. L. The adsorption kinetics of cephalosporin-c on non-ionic polymeric macropore Amberlite XAD-16 resin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 216-220, 1999.

ZWAAN, J. Estimation of molecular weights of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 21, p. 155-168, 1967.

ANEXO 1

Resultados da análise, realizada pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil), para os genes das enterotoxinas e da toxina emética que codificam as proteínas envolvidas nas síndromes diarréica e emética para as linhagens de *Bacillus cereus* isoladas de polpa de abacaxi: *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1638, *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1639 e *B. cereus* LFB-FIOCRUZ 1640, tendo as três linhagens apresentado os mesmos perfis toxigênicos.

Perfis dos genes toxigênicos e das enterotoxinas, das linhagens de *B. cereus* isoladas de polpa de abacaxi, determinados por multiplex-PCR.

Perfis toxigênicos dos genes das enterotoxinas									
Linhagens	<i>hbl</i> A	<i>hbl</i> C	<i>hbl</i> D	<i>nhe</i> A	<i>nhe</i> B	<i>nhe</i> C	<i>entFM</i>	<i>bceT</i>	<i>ces</i>
<i>B. cereus</i> (LFB-FIOCRUZ 1638/1639/1640) ⁽¹⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> NCT 2599 (LFB-FIOCRUZ 406) ⁽²⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	-

⁽¹⁾ Linhagens de *B. cereus*, isolados de polpa de abacaxi, identificadas pela FIOCRUZ.

⁽²⁾ Linhagem de *B. cereus* utilizado como padrão para determinação dos perfis toxigênicos e das enterotoxinas.

ANEXO 2

Composição do gel de poliacrilamida utilizado na técnica de eletroforese (SDS-PAGE) ⁽¹⁾ para análise do extrato semi-purificado da BLIS, produzida pelo isolado C, obtidas por extração nas resinas XAD-16 e SP- Sepharose

Soluções	Gel de empilhamento (5%)	Gel espaçador (10%)	Gel de separação (16%)
AB-6	303µL	1000µL	3333µL
Tampão do gel (3x)	750µL	1666µL	3333µL
Água purificada	1901µL	2283µL	3268µL
TEMED ⁽²⁾ 10%	23µL	25µL	33µL
Persulfato de amônio ⁽³⁾ 5%	23µL	25µL	33µL
Total	3000µL	5000µL	10000µL

⁽¹⁾ Schagger (2006).

⁽²⁾ N, N, N', N'-Tetrametileno-diamino (Sigma-Aldrich).

⁽³⁾ Bioagency.

Composição da solução tampão de amostra utilizada no preparo do gel de poliacrilamida utilizado na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ⁽¹⁾. Essa solução foi utilizada na proporção de uma parte de amostra para uma parte de solução tampão

Solução tampão do gel 3x – pH 8,45

Tris ⁽²⁾	0,1 mol
Tris-HCl ⁽³⁾	0,05 mol
SDS ⁽³⁾	0,15 g
Água q.s.p	50 mL

⁽¹⁾ Schagger (2006).

⁽²⁾ Serva.

⁽³⁾ Bio-agency.

Composição da solução tampão de amostra utilizada no preparo de amostra analisada pela técnica de eletroforese em SDS-PAGE ⁽¹⁾

Solução tampão de amostra 2x – pH 6,5	
Azul de bromofenol	0,125 M em Tris-HCl 0,004%
Glicerol ⁽²⁾	20%
2-mercaptoetanol	10%
SDS	4%

⁽¹⁾ Schagger (2006).

⁽²⁾ Synth

Composição da solução tampão do ânodo, utilizada na separação de proteínas por eletroforese em SDS-PAGE ⁽¹⁾

Solução tampão do gel 10x – pH 8,9	
Tris ⁽²⁾	0,0775 mol
Tris-HCl ⁽³⁾	0,0225 mol
Água purificada q.s.p	100 mL

⁽¹⁾ Schagger (2006).

⁽²⁾ Serva.

⁽³⁾ Bio-agency.

Composição da solução tampão do cátodo utilizada na separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ⁽¹⁾

Solução tampão do gel 10x – pH 8,25	
Tris ⁽²⁾	0,1 mol
Tris-HCl ⁽³⁾	0,1 mol
SDS ⁽³⁾	0,1 g
Água purificada q.s.p	100 mL

⁽¹⁾ Schagger (2006).

⁽²⁾ Serva.

⁽³⁾ Bio-agency.

Técnica para coloração com prata para revelação de gel de poliacrilamida

Etapa	Solução	Volume	Duração
1.Fixação A	Etanol absoluto ⁽²⁾	75 mL	30 minutos
	Solução aquosa de glutaraldeído ⁽³⁾ (25% p/v)	2 mL	
	Acetato de sódio tri-hidratado ⁽¹⁾	6,8 g	
	Água q.s.p	250 mL	
2.Fixação B	Etanol absoluto	100 mL	30 minutos
	Ácido acético glacial ⁽²⁾	25 mL	
	Água q.s.p	250 mL	
3.Lavagem	Água	-	2x30 minutos
4.Sensibilização	Solução aquosa de tiosulfato de sódio ⁽⁴⁾ (5% p/v)	0,25 mL	30 minutos
	Água q.s.p	250 mL	

Etapa	Solução	Volume	Duração
5.Reação com prata	Solução aquosa de nitrato de prata ⁽³⁾ (2,5% p/v) Água q.s.p	25 mL 250 mL	30 minutos
6.Lavagem	Água	-	30 segundos
7.Desenvolvimento	Carbonato de sódio ⁽³⁾ Solução aquosa de formaldeído ⁽³⁾ (37% p/v) Água q.s.p	5 g 240 µL 250 mL	3-5 minutos
8.Solução de parada	EDTA-Na ₂ H ₂ O ⁽⁴⁾ Água q.s.p	3,65 g 250 mL	30 minutos
9.Lavagem	Água q.s.p	-	3x5 minutos

⁽¹⁾ Sigma-Aldrich

⁽²⁾ Synth

⁽³⁾ Sigma-Aldrich

⁽⁴⁾ Merck