UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da ação de ingredientes da matriz alimentar
na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* 2a

Matheus de Souza Barbosa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Bernadette D.G.M. Franco

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da ação de ingredientes da matriz alimentar
na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* 2a

Matheus de Souza Barbosa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Bernadette D.G.M. Franco

São Paulo
2009

Matheus de Souza Barbosa

Avaliação da ação de ingredientes da matriz alimentar
na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* 2a

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof(a). Dr(a). Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
orientadora/presidente

Prof(a). Dr(a). Susana Marta Isay Saad
1º. examinadora

Prof(a). Dr(a). Cynthia Jurkiewicz Kunigk
2º. examinadora

São Paulo, 27 de Fevereiro de 2009.

*A Deus, pelo dom da vida e por todo cuidado,
Aos meus pais, Benedito e Afonsa, pela educação e amor,
Aos meus irmãos Márcio Tadeu e Murilo Constanino, pelo incentivo e carinho,
A minha namorada, Miriam, pelo amor, paciência e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Titular Doutora Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pela amizade, orientação, paciência, dedicação, apoio e oportunidade de aprendizado.

Às Professoras Dottoras Mariza Landgraf e Maria Teresa Destro pelo apoio e convívio e oportunidade de aprendizado.

À Profa. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk, pelo apoio e sugestões para a análise estatística do trabalho.

Às auxiliares de laboratório Kátia Leani e Lucia, pelo convívio agradável e por sempre estar disposta a ajudar.

À Danielle Nader Furtado, Janaína Thais Lopes, Kátia Gianni de Carvalho Lima, Monika Francisca Kruger, e Priscila Pedullo Alvares pela amizade e por toda ajuda prestada na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos: Ana Eucares, Anderson, André, Angela, Cecília, Crystina, Denise, Eb, Flávia, Graciela, Gabriela, Hans, Keila, Lina, Marildes, Paulo, Svetoslav, Tatiana, Verônica, Verena e Vinicius, pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

À Mônica, Cleonice e Edílson da secretaria do departamento, pela amizade e pelos serviços prestados.

À Elaine e Jorge da secretaria de Pós-Graduação, pela amizade, atenção dedicada e serviços prestados.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À professora titular Mestre Priscila Reina Siliano da Silva do Centro Universitário Fundação Santo André pelo incentivo, apoio, conhecimentos transmitidos e amizade no início da minha jornada na área de microbiologia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho de pesquisa.

BARBOSA, M. S. **Avaliação da ação de ingredientes da matriz alimentar na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a**. São Paulo, 2008. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

RESUMO

A aplicação das bacteriocinas de bactérias lácticas como agentes de bioconservação de alimentos é dependente de vários fatores, com destaque para composição química do alimento que pode interferir na eficácia da atividade antimicrobiana. Esse estudo objetivou avaliar a influência de ingredientes da matriz alimentar na multiplicação e produção das bacteriocinas por *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a e na atividade das bacteriocinas produzidas, trabalhando-se com um modelo composto de extrato de carne, extrato de levedura, proteose peptona e amido, adicionado de 4% de NaCl e/ou 0,5% de glicose e mantido em refrigeração (4° C) por até 10 dias. O estudo foi realizado com os seguintes materiais contendo as bacteriocinas: 1. sobrenadante concentrado livre de células obtido a partir da cultura de *L. sakei* 2a em caldo MRS; 2. extrato ácido neutralizado obtido do sedimento da cultura em caldo MRS e 3. extrato ácido neutralizado e semi-purificado por cromatografia líquida. *Listeria monocytogenes* Scott A foi empregada como microrganismo indicador da atividade antimicrobiana e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como controle não produtor de bacteriocinas. Os resultados indicaram que nenhum dos ingredientes do modelo avaliado teve papel importante na multiplicação de *L. sakei* 2a e na bacteriocinogênese. No entanto, 4% de NaCl interferiu negativamente na produção das bacteriocinas, enquanto 0,5% de glicose auxiliou a produção, mesmo na presença de 4% de NaCl. Em relação à atividade das bacteriocinas, verificou-se que nem os ingredientes do modelo, nem 4% de NaCl e nem 0,5% de glicose apresentaram interferência marcante ao longo dos dez dias estudados, independentemente do material contendo as bacteriocinas testado.

Palavras-chave: *Lactobacillus sakei*. Bacteriocinas. Matriz alimentar. *Listeria monocytogenes*.

BARBOSA, M. S. **Evaluation of the action of food ingredients on the antilisterial activity of the bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a.** São Paulo, 2008. [Dissertation (Masters Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

ABSTRACT

The application of bacteriocins produced by lactic acid bacteria as biopreservatives in foods depends of several factors, such as the chemical composition of the food, which can interfere with the antimicrobial activity. This study aimed to evaluate the influence of food ingredients on the growth and production of bacteriocins by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, and on the activity of the bacteriocins produced, by means of a food model prepared with meat extract, yeast extract, proteose-peptone and starch, added of 4% 4% de NaCl and/or glucose, maintained under refrigeration (4° C) for up to 10 days. The study was carried out with the following bacteriocins-containing materials: 1. the concentrated cell-free supernatant from an overnight culture of *L.sakei* 2a in MRS broth; 2. acid extract obtained from the sediment of the overnight culture of *L. sakei* 2a in MRS broth and 3. acid extract submitted to a semi-purification by HPLC. *Listeria monocytogenes* Scott A was used as the antimicrobial activity indicator microorganism and *Lactobacillus sakei* ATCC15521 as the non-bacteriocinogenic negative control. Results indicated that none of the ingredients presented a significant role in the growth of *L.sakei* 2a, and in the production and activity of the bacteriocins. However, 4% of NaCl caused a reduction on the production of bacteriocins, while 0,5% of glucose stimulated their production, even in the presence of 4% of NaCl. The interference of the ingredients of the model, 4% of NaCl and/or 0,5% of glucose on the activity of the bacteriocins was not marked, regardless the materials used in the tests.

Keywords: *Lactobacillus sakei*. Bacteriocins. Food models. *Listeria monocytogenes*.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representação esquemática do procedimento para a padronização das culturas <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A para a utilização como inóculo artificial dos modelos alimentares.	11
Figura 2. Representação esquemática do procedimento para a quantificação das bacteriocinas.	13
Figura 3. Representação esquemática do procedimento para o preparo do sobrenadante com a cultura em caldo MRS	15
Figura 4. Representação esquemática do procedimento para o preparo do sobrenadante concentrado livre de célula em caldo MRS contendo bacteriocinas.	16
Figura 5. Representação esquemática do procedimento para o preparo do extrato ácido neutralizado contendo bacteriocinas.	17
Figura 6. Representação esquemática do procedimento para o preparo do extrato ácido semi-purificado contendo bacteriocinas.	19
Figura 7. Representação esquemática do procedimento para a dosagem de proteína total.	20
Figura 8. Representação esquemática do procedimento para a avaliação da influência dos ingredientes do modelo alimentar na multiplicação e produção das bacteriocinas de <i>L. sakei</i> 2a.	22
Figura 9. Representação esquemática do procedimento para a avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na multiplicação e produção das bacteriocinas por <i>L. sakei</i> 2a em modelo alimentar.	24
Figura 10. Representação esquemática do procedimento para a avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a em modelo alimentar.	28
Figura 11. Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células do caldo MRS, em modelo alimentar.	30

Figura 12.	Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência dos ingredientes do modelo alimentar na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado.	32
Figura 13.	Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado em modelo alimentar.	34
Figura 14.	Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado em modelo alimentar.	36
Figura 15.	Diferenças nas populações de <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.	40
Figura 16.	Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na multiplicação de <i>L. sakei</i> 2a durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.	45
Figura 17.	Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na multiplicação de <i>L. sakei</i> 2a durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.	46
Figura 18.	Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na multiplicação de <i>L. sakei</i> 2a, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 (a), 5 (b), 7 (c) e 10 (d) dias.	47
Figura 19.	Efeito da adição de 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a no modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.	53
Figura 20.	Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 5 dias.	54
Figura 21.	Curva padrão de albumina bovina.	55
Figura 22.	Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 7 dias.	60

- Figura 23.** Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 7 dias. 60
- Figura 24.** Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 (a) e 7 (b) dias. 61
- Figura 25.** Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias. 69
- Figura 26.** Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias. 70
- Figura 27.** Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 (a), 7 (b) e 10 (c) dias. 71
- Figura 28.** Cromatograma do extrato ácido neutralizado bac⁺ em HPLC para utilização em modelo alimentar. 72
- Figura 29.** Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 e 5 dias. 76
- Figura 30.** Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 e 5 dias. 76
- Figura 31.** Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 5 dias. 77
- Figura 32.** Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) em todas as condições nas quatro formulações do modelo alimentar armazenados a 4° C por 10 dias em: **a:** modelo alimentar, **b:** modelo alimentar + NaCl, **c:** modelo alimentar + glicose, **d:** modelo alimentar + NaCl + glicose. 78

Figura 33. Mecanismo de regulação da biossíntese de bacteriocina.
(NASCIMENTO *et al.*, 2008; ENNHAHAR *et al.*, 2000) 84

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Combinações dos ingredientes do modelo alimentar.	21
Tabela 2. Condições para avaliação do efeito antilisteria das bacteriocinas produzidas nas quatro formulações do modelo alimentar.	26
Tabela 3. Condições para análise do efeito antilisteria das bacteriocinas produzida por <i>L. sakei</i> 2a nas quatro formulações do modelo alimentar.	29
Tabela 4. Condições para análise do efeito antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar.	31
Tabela 5. Condições para análise do efeito antilisteria das bacteriocinas produzida por <i>L. sakei</i> 2a nas quatro formulações do modelo alimentar.	33
Tabela 6. Matriz de ensaios para o planejamento fatorial com as variáveis nas unidades codificadas e originais	37
Tabela 7. Diferenças nas populações de <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹) nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.	39
Tabela 8. Diferenças nas populações de <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹) nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, agrupadas de acordo com o tempo de armazenamento a 4° C por 10 dias.	41
Tabela 9. Diferenças nas populações de <i>L. sakei</i> 2a ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹), obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.	43
Tabela 10. Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na multiplicação de <i>L. sakei</i> 2a ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹) nos modelos alimentares, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.	44

Tabela 11.	Atividade das bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a nas quatro formulações do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.	49
Tabela 12.	Diferenças nas populações de <i>L. monocytogenes</i> ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹) obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, quando co-cultivada com <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ e com <i>L. sakei</i> bac ⁻ , durante armazenamento a 4° C por 10 dias.	51
Tabela 13.	Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a nos modelos alimentares, durante armazenamento a 4° C por 10 dias	52
Tabela 14.	Unidades Arbitrárias (UA.mL ⁻¹), proteína total (mg.mL ⁻¹) e atividade específica (UA.mg ⁻¹) determinadas nos materiais contendo as bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a.	55
Tabela 15.	Diferenças nas populações de <i>L. monocytogenes</i> ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹) obtidas das quatro formulações do modelo alimentar, adicionadas do sobrenadante concentrado livre de células da cultura de <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ e <i>L. sakei</i> bac ⁻ em caldo MRS, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.	58
Tabela 16.	Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células das culturas de <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ e <i>L. sakei</i> bac ⁻ em caldo MRS, avaliados nos modelos alimentares, durante armazenado a 4° C por 10 dias.	59
Tabela 17.	Diferenças nas populações de <i>L. monocytogenes</i> ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹) obtidas das quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, adicionadas do extrato ácido neutralizado das culturas de <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ e de <i>L. sakei</i> bac ⁻ , durante o armazenamento a 4°C por 10 dias.	63
Tabela 18.	Diferenças nas populações de <i>L. monocytogenes</i> ($\Delta\log$ UFC.mL ⁻¹) obtidas das quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, adicionadas do extrato ácido neutralizado das culturas de <i>L. sakei</i> 2a bac ⁺ (A) e de <i>L. sakei</i> bac ⁻ (B), agrupadas de acordo com o tempo de armazenamento a 4° C por até 10 dias.	

- Tabela 19.** Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, adicionadas dos extratos ácidos neutralizados das culturas de *L. sakei* 2a bac+ e de *L. sakei* bac- durante armazenamento a 4°C por 10 dias. 67
- Tabela 20.** Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado nos modelos alimentares durante armazenamento a 4°C por 10 dias. 68
- Tabela 21.** Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, adicionadas e não adicionados do extrato ácido semi-purificado, durante armazenamento a 4°C por até 10 dias. 74
- Tabela 22.** Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado, nos modelos alimentares durante armazenamento a 4°C por 10 dias. 75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O que são bacteriocinas	1
1.2 Bacteriocinas de aplicação em alimentos	2
1.3 <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a	4
1.4 Ação de bacteriocinas sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.5 Importância do controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos	6
1.6 Ação dos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos na atividade das bacteriocinas	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Padronização das culturas usadas no estudo	10
3.2 Quantificação das bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a	12
3.3 Preparo do modelo alimentar e das formulações I, II, III e IV	13
3.4 Preparo dos materiais para testes da atividade das bacteriocinas	14
3.4.1 Preparo do sobrenadante da cultura em caldo MRS	14
3.4.2 Preparo do caldo MRS concentrado livre de células contendo bacteriocina	15
3.4.3 Preparo do extrato ácido neutralizado contendo bacteriocina	16
3.4.4 Preparo do extrato ácido semi-purificado contendo bacteriocina	18
3.4.5 Dosagem de proteínas nos materiais preparados contendo bacteriocina	18
3.5 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na multiplicação de <i>L. sakei</i> 2a	21
3.5.1 Avaliação da influência dos ingredientes	21
3.5.2 Avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	23
3.6 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na produção das bacteriocinas por <i>L. sakei</i> 2a	25
3.6.1 Avaliação da influência dos ingredientes	25
3.6.2 Avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	25

3.7 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na atividade antilisteria dos materiais contendo as bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a	26
3.7.1 Testes com as bacteriocinas produzidas no modelo	26
3.7.1.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	26
3.7.2 Testes com o sobrenadante do caldo MRS concentrado livre de células	28
3.7.2.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	28
3.7.3 Testes com o extrato ácido neutralizado	31
3.7.3.1 Avaliação da influência dos ingredientes	31
3.7.3.2 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	33
3.7.4 Testes com o extrato ácido semi-purificado	35
3.7.4.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	35
3.8 Interpretação dos resultados e análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na multiplicação de <i>L. sakei</i> 2a	38
4.1.1 Avaliação da influência dos ingredientes	38
4.1.2 Avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	42
4.2 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na produção das bacteriocinas por <i>L. sakei</i> 2a	48
4.2.1 Avaliação da influência dos ingredientes	48
4.2.2 Avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	48
4.3 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na atividade antilisteria dos materiais contendo as bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a	50
4.3.1 Testes com as bacteriocinas produzidas nos modelos alimentares	50
4.3.1.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose	50

4.3.2 Determinação da atividade específica dos diferentes materiais contendo bacteriocinas_____	54
4.3.3 Testes com as bacteriocinas presentes no sobrenadante da cultura em caldo MRS _____	56
4.3.3.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose _____	56
4.3.4 Testes com o extrato ácido neutralizado da cultura em caldo MRS_____	62
4.3.4.1 Avaliação da influência dos ingredientes_____	62
4.3.4.2 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose__	66
4.3.5 Testes com o extrato ácido semi-purificado_____	72
4.3.5.1 Avaliação da influencia da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose_____	73
5. DISCUSSÃO _____	79
5.1 Influência de proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido na multiplicação e na produção das bacteriocinas por <i>L. sakei</i> 2a _____	79
5.2 Influência de 0,5% de glicose e 4% de NaCl na multiplicação e na produção das bacteriocinas por <i>L. sakei</i> 2a em modelo alimentar armazenado a 4° C durante 10 dias _____	81
5.3 Influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por <i>L. sakei</i> 2a presentes nos diferentes materiais adicionados ao modelo alimentar durante armazenamento a 4° C durante 10 dias _____	86
6. CONCLUSÕES _____	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 O que são bacteriocinas

As bacteriocinas de bactérias lácticas (LAB) são peptídeos catiônicos pequenos, heterogêneos, hidrofóbicos, apresentando de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado, características anfipáticas, sendo ribossomicamente sintetizados e secretados pelas bactérias produtoras (VERHEUL *et al.*, 1997; CINTAS *et al.*, 1997; COTTER *et al.*, 2005). As bacteriocinas variam em relação ao espectro de atividade (estreito ou amplo espectro), modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (EIJSINK *et al.*, 2002; ZASLOFF, 2002). As bacteriocinas podem ser produzidas espontaneamente ou induzidas, e seus produtores são imunes a estas devido a proteínas de imunidade específica (MARTINIS e FRANCO, 2002; COTTER *et al.*, 2005). A produção de bacteriocinas em bactérias Gram-positivas geralmente ocorre na mudança da fase exponencial para a fase estacionária (RILEY e WERTZ, 2002).

Segundo KLAENHAMMER (1993), as bacteriocinas de bactérias lácticas podem ser divididas em quatro classes. As bacteriocinas da classe I e II são as mais conhecidas, apresentando massa molecular inferior a 10 kDa, termoestabilidade e aminoácidos modificados. As classes III e IV não são bem conhecidas, mas apresentam massa molecular superior a 30 kDa, são termolábeis e podem ser proteínas hidrofílicas ou complexos de proteínas compostos por proteínas, fosfolipídios e/ou carboidratos.

COTTER *et al.* (2005) propuseram uma nova classificação, dividindo as bacteriocinas em bacteriocinas lantibióticas (classe I), não lantibióticas (classe II) e as bacteriolisinas (classe III), que são proteínas de alto peso molecular e termolábeis. Devido à disponibilidade limitada de dados sobre as bacteriocinas da classe IV, essa classe não foi incluída na nova classificação.

DEEGAN *et al.* (2006) definiram as bacteriocinas de LAB da classe I como peptídeos pequenos (<5 kDa) e termoestáveis, com resíduos dos aminoácidos lantionina e metil-lantionina. Esta classe foi dividida em duas subclasses, sendo a subclasse Ia composta de peptídeos compridos, flexíveis e carregados positivamente, que atuam na membrana citoplasmática através

da formação de poros. A subclasse Ib é caracterizada por peptídeos esféricos, rígidos, e neutros ou carregados negativamente.

As bacteriocinas da classe II, definidas por DEEGAN *et al.* (2006), são pequenas (<10 kDa), termoestáveis e não contêm resíduos de lantionina e metil-lantionina. A classe II também é subdividida em duas subclasses: IIa, que contém a região N-terminal consenso YGNGVXCXXXXCXV, e IIb que é composta de bacteriocinas contendo dois componentes para sua atividade antimicrobiana.

1.2 Bacteriocinas de aplicação em alimentos

Segundo RODGERS (2001), a utilização de compostos químicos para a conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos “frescos”. Além disso, a adição de nitrito a alimentos cárneos visando o aumento da segurança e da vida útil pode levar à formação de nitrosaminas, que tem efeito carcinogênico ao organismo (CHEN e HOOVER, 2003). Dessa forma, a utilização de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas tem sido estudada como forma alternativa para o aumento da segurança e da qualidade alimentar (EIJSSINK *et al.*, 2002; LISERRE *et al.*, 2002; DEEGAN *et al.*, 2006; MARTINIS e FREITAS, 2003).

A aplicação de bacteriocinas em alimentos tende a ser mais eficiente quando as cepas produtoras são isoladas do mesmo produto em que se pretende utilizá-las. Neste sentido, vários estudos sobre a aplicação de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em produtos cárneos vêm sendo desenvolvidos no Brasil (MARTINIS e FRANCO, 2002; LISERRE *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2002).

As bacteriocinas podem ser utilizadas de três formas em um alimento: 1) inoculação do alimento com cepas de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas; 2) adição de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas e 3) adição de um ingrediente fermentado com cepas bacteriocinogênicas (CHEN e HOOVER, 2003; COTTER *et al.*, 2005; DEEGAN *et al.*, 2006).

Estudos utilizando sistemas de modelo alimentar demonstraram que em produtos cárneos as bacteriocinas da classe IIa apresentam atividade contra *L. monocytogenes* mais eficazes do que a nisina (bacteriocina da classe I) sendo recomendadas para o uso em alimentos que apresentam risco de contaminação por esse patógeno (ENNAHAR *et al.*, 1999; NES e HOLO, 2000). Além do controle de *L. monocytogenes*, as bacteriocinas da classe IIa também podem inibir outros microrganismos, como *Clostridium* spp. e seus esporos, porém a sensibilidade de diferentes microrganismos a diferentes bacteriocinas da classe IIa varia de espécie para espécie (ENNAHAR *et al.*, 2000).

As bacteriocinas comercialmente utilizadas em alimentos são a nisina, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e a pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici*, comercializadas como Nisaplin™ e ALTA™ 2431, respectivamente (DEEGAN *et al.*, 2006).

A nisina foi a primeira bacteriocina a ser comercializada e seu uso em alimentos está atualmente aprovado em 48 países (COTTER *et al.*, 2005). De modo geral, a nisina é ativa apenas frente a bactérias Gram-positivas e seus esporos, não afetando as Gram-negativas, devido à parede destas bactérias serem compostas por lipopolissacarídeos que atuam como uma barreira, impedindo que a nisina atinja a membrana citoplasmática (STEVENS *et al.*, 1991; GARCERÁ *et al.*, 1993; VERHEUL *et al.*, 1997; CLEVELAND *et al.*, 2001). Contudo, a injúria celular pela adição de agentes quelantes ou pelo uso de pressão hidrostática podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina (GELINSKI, 2003).

A aplicação de nisina em carnes é um assunto bastante controverso (MARTINIS e FREITAS 2002). A efetividade da aplicação de nisina na superfície de salsichas, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura do Brasil foi avaliada por CASTRO (2002), que demonstrou que esse procedimento é pouco efetivo no controle de *L. monocytogenes* ou de microrganismos deteriorantes, incluindo psicotróficos e bactérias lácticas. HAMPIKYAN e UGUR (2007) observaram que a nisina adicionada à lingüiça fermentada nas concentrações de 100 µg.g⁻¹ e 50 µg.g⁻¹ foi capaz de inibir a multiplicação *L. monocytogenes* até 20 e 25 dias, respectivamente.

FOEGEDING *et al.* (1992), estudaram a atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas *Pediococcus acidilactici* na fermentação de lingüiça, inoculada com cinco cepas de *Listeria monocytogenes*, demonstrando que o processo de fermentação da lingüiça seca em combinação com a pediocina reduz a população de *L. monocytogenes* de forma mais eficiente que a fermentação apenas.

CINTAS *et al.* (1998) avaliaram a atividade de diversas bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de lingüiça e verificaram que enterocina L50 e pediocina PA-1 apresentam atividade contra *L. monocytogenes*, enquanto esse microrganismo foi resistente à nisina A e lactocina S.

ANANOU *et al.* (2005) descreveram o controle de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 em lingüiça pela adição de enterocina AS-48 produzida por *Enterococcus faecalis* UM-48-32 e *Enterococcus faecium* S-32-81, indicando que esta bacteriocina pode ser usada no controle de *L. monocytogenes* em lingüiça.

1.3 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a

Em 1997, pesquisadores do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) isolaram uma cepa de bactéria láctica (*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a) de lingüiça frescal e observaram que esta cepa produz bacteriocina com atividade contra *Listeria monocytogenes* em meio de cultura e também em produtos cárneos (MARTINIS e FRANCO, 1997 e 1998). Esta cepa foi capaz de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal embalada em atmosfera modificada durante armazenamento sob refrigeração (LISERRE *et al.*, 2002). ROSA *et al.* (2002) verificaram que a bacteriocina produzida por *L. sakei* 2a é um peptídeo pertencente à classe IIa de DEEGAN, sendo termorresistente, permanecendo ativa após 60 min a 60° C, 20 min a 100° C e 15 min a 121° C. Outras bactérias como *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria innocua* foram sensíveis a esta bacteriocina, mas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 foram resistentes. A bacteriocina purificada por extração ácida, seguida de eletroforese em gel de

poliacrilamida-tricina apresentou massa molecular estimada entre 3 e 6 kDa. O modo de ação dessa bacteriocina é o mesmo das demais bacteriocinas do grupo IIa, ou seja, há dissipação da força próton motriz nas células de *L. monocytogenes*, e redução da concentração intracelular de ATP, sem aumento na concentração de ATP extracelular. A bacteriocina forma poros na membrana citoplasmática de células sensíveis, não necessitando de um receptor específico. Desta forma, esta bacteriocina apresenta um bom potencial como bioconservante, podendo ser utilizada no controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos. De acordo com os resultados de ROSA *et al.* (2002), a bacteriocina produzida pela cepa *L. sakei* 2a foi denominada sakacina 2a.

Recentemente, pesquisadores da FCF/USP verificaram que *L. sakei* 2a além de produzir sakacina 2a é capaz de produzir também outros peptídeos antimicrobianos, ainda não descritos na literatura, com atividade antagonista contra *L. monocytogenes* Scott A. Alguns desses peptídeos parecem atuar no RNA e DNA de células alvo, pois apresentam semelhança à proteínas ribossomais e histona-like de *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* (LIMA *et al.*, submetido).

1.4 Ação de sakacinas sobre *Listeria monocytogenes*

Diversos trabalhos comprovam a ação de diferentes sakacinas no controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

HUGAS *et al.* (1998) reportaram que a presença de *Lactobacillus sakei* CTC494 ou da sakacina K produzida por essa bactéria láctica em modelos alimentares à base de carne, embalados em filme permeável a oxigênio, à vácuo e em atmosfera modificada (20% CO₂: 80% O₂) inibiu a multiplicação de *L. monocytogenes* em todos os produtos durante o armazenamento a 4° C.

KATLA *et al.* (2001) observaram que a adição da sakacina P em salmão defumado congelado embalado a vácuo têm um efeito antilisteria durante armazenamento a 10° C por 4 semanas. Quando duas cepas de *Lactobacillus sakei*, sendo uma produtora e a outra não produtora de bacteriocina, foram

inoculadas nas mesmas condições, ambas as cepas apresentaram um efeito bacteriostático na multiplicação de *L. monocytogenes*. E uma inibição mais acentuada foi observada quando a cepa de bactéria láctica bacteriocinogênica foi inoculada com sakacina P.

URSO *et al.* (2006) produziram lingüiça fermentada empregando *Lactobacillus sakei* produtor de sakacina P como cultura fermentadora e observaram que a presença de lactose e de 4% de NaCl (5% p.v⁻¹) reduzia a produção de bacteriocina, mas não interferia na multiplicação da bactéria láctica. Já no terceiro dia de fermentação, o número de bactérias capazes de produzir sakacina P estava elevado, persistindo durante toda a fermentação. Também foi observado que *L. sakei* interferiu na multiplicação de enterococos, diminuindo seu número rapidamente.

1.5 Importância do controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos

Listeria monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, doença importante para indivíduos imunocomprometidos, mulheres grávidas, idosos, neonatos e pacientes com HIV. Os sintomas clínicos envolvem infecção do Sistema Nervoso Central e bacteremia, podendo causar também endocardite, aborto, parto pré-maturo e septicemia neonatal (FENLON, 1999; MARCO *et al.*, 2000; DEEGAN *et al.*, 2006). Os principais vetores de *L. monocytogenes* são os alimentos, com destaque para sua tolerância às altas concentrações de sal e capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração, podendo assim proliferar em alimentos mantidos nestas condições (FENLON, 1999; DEEGAN *et al.*, 2006).

Listeria monocytogenes possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua presença em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico. Esta resistência, aliada à capacidade de formar biofilmes nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos, torna este microrganismo uma ameaça à indústria. Assim, cuidados especiais, como a adoção de boas práticas de higiene durante as etapas de produção de alimentos, são indispensáveis (FENLON, 1999; BERSOT *et al.*, 2001).

1.6 Ação dos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos na atividade das bacteriocinas

O controle de *L. monocytogenes* em alimentos inclui a combinação de vários fatores tais como atividade de água, baixa temperatura, baixo pH, utilização de sais, compostos químicos e antimicrobianos naturais. A combinação destes fatores cria um ambiente adverso para o patógeno resultando na redução da sua taxa de multiplicação, entendendo a fase lag da multiplicação e declínio de sua população (BOZIARIS *et al.*, 2007). Estes fatores podem ser intrínsecos ou ser novas barreiras intencionalmente aplicadas. As bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e de outros metabólitos antimicrobianos podem ser consideradas como uma barreira adicional para a multiplicação de microrganismos indesejáveis (CASTELLANO *et al.*, 2008).

Bacteriocinas são moléculas anfifílicas com uma extremidade carregada positivamente e com alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos. Esta carga pode liga-se aos componentes da matriz alimentar e com isto diminuir sua atividade, sendo esta uma desvantagem para o uso como conservante (AASEN *et al.*, 2003).

LEROY e DE VUYST (1999 a) mostraram que a produção de sakacina K por *Lactobacillus sakei* CTC 494 em caldo MRS foi influenciada pela temperatura e pH. A temperatura ótima para produção de bacteriocina esteve entre 20° e 25° C, enquanto para a multiplicação foi 35° C. O valor do pH ótimo para a produção de sakacina K foi 5 e para multiplicação foi entre 5,5 e 6,5.

Em outro trabalho, LEROY e DE VUYST (1999 b) observaram que tanto a multiplicação de *Lactobacillus sakei* CTC 494 quanto a produção da sakacina K em caldo MRS foram reduzidas na presença de 3% a 8% cloreto de sódio e nas concentrações de 0,02% a 0,04% nitrato de sódio.

AASEN *et al.* (2003) avaliaram a ação da sakacina P e da nisina em salmão defumado e em frango, e observaram que mais de 80% da sakacina P e da nisina adicionadas aos alimentos reagiu com as proteínas da matriz alimentar. Nos alimentos tratados com calor, a atividade das bacteriocinas permaneceu estável por até 4 semanas. Nos alimentos não tratados pelo calor as bacteriocinas foram degradadas, possivelmente devido a atividade proteolítica. O alto conteúdo de gordura do salmão não influenciou a atividade das bacteriocinas.

LEROY e DE VUYST (2005) avaliaram a produção de bacteriocina por *Lactobacillus sakei* CTC 494 num modelo alimentar composto pelos ingredientes típicos de lingüiça. A temperatura e o pH empregados na simulação das condições da fermentação de lingüiça favoreceram a produção de bacteriocina, enquanto que o nitrito de sódio diminuiu a multiplicação bacteriana e a produção de bacteriocinas. O magnésio não influenciou na multiplicação bacteriana, diferentemente do manganês. Além disso, a presença de grandes quantidades de gordura reduziu a atividade das bacteriocinas.

Conforme apresentado, a influência dos ingredientes do alimento na ação das bacteriocinas ainda é pouco estudada. Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a ação de ingredientes alimentares na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas pela cepa *L. sakei* subsp. *sakei* 2a, trabalhando com um modelo alimentar composto de proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação de ingredientes alimentares na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas pela cepa *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, trabalhando-se com um modelo alimentar composto de proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos ingredientes do modelo alimentar (proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido) e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo alimentar na multiplicação e na produção das bacteriocinas pela cepa *L. sakei* 2a;
- Avaliar a influência dos ingredientes do modelo alimentar (proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido) na atividade das bacteriocinas produzidas pela cepa *L. sakei* 2a, trabalhando-se com um extrato ácido, obtido a partir de uma cultura de 18 h a 25° C em caldo MRS;
- Avaliar a influência da adição de 4% de NaCl e/ou 0,5% de glicose ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes na cultura em caldo MRS concentrado, no extrato ácido e no extrato ácido semi-purificado por HPLC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Padronização das culturas usadas no estudo

No estudo foram utilizadas três culturas: *Listeria monocytogenes* Scott A, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a produtora de bacteriocinas (bac+) e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 não produtora de bacteriocina (bac-). A cultura de *L. monocytogenes* foi reativada em caldo soja triptona (Código: CM0129, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSBYE) a 37° C por 18 h e centrifugada a 2810 xg por 10 min (centrífuga Hettich Mikro 22R) a 10° C. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada, repetindo-se o processo de centrifugação mais duas vezes. Em seguida, a suspensão lavada foi submetida à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada, transferindo-se 0,1 mL de cada diluição para a superfície de placas contendo ágar soja triptona (Código: CM0131, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE) para enumeração de *L. monocytogenes*. A diluição da cultura de *L. monocytogenes* que continha entre 10² e 10³ UFC.mL⁻¹ foi empregada como inóculo de contaminação artificial dos modelos alimentares (Figura 1).

As culturas de *L. sakei* 2a bac+ e *L. sakei* 15521 bac- foram reativadas separadamente em caldo Lactobacilli MRS (Código: 288130, Difco, Detroit, Estados Unidos) e mantidas a 30° C por 18 h. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 2810 xg por 10 min (centrífuga Hettich Mikro 22R) a 10° C. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada, repetindo-se o processo de centrifugação mais duas vezes. Em seguida, a suspensão lavada foi submetida à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada, transferindo-se 0,1mL de cada diluição para placas contendo ágar

DE MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) (Código: CM0361, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) incubando-as a 30° C durante 48 h. A diluição das culturas de *L. sakei* 2a e *L. sakei* 15521 contendo entre 10^5 e 10^6 UFC.mL⁻¹ foi empregada como inóculo nos modelos alimentares.

Figura 1. Representação esquemática do procedimento para a padronização das culturas *Listeria monocytogenes* Scott A para a utilização como inóculo artificial dos modelos alimentares.

3.2 Quantificação das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a

As bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a foram quantificadas utilizando-se a técnica de diluição crítica, conforme descrito por ROSA *et al.* (2002), e pelo método *spot-on-the-lawn*, descrito por VAN REENEN *et al.* (1998), com modificações.

Os materiais a serem testados quanto à presença das bacteriocinas foram diluídos sucessivamente em placas de microtitulação nas proporções de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128, em solução tampão 2-[N-morfolino] etanosulfônico (MES) (Código: M3885, Sigma, Nova Iorque, Estados Unidos) a 5 mmol.L⁻¹, pH 6,5. De cada diluição, uma alíquota de 10 µL foi depositada sobre a superfície de uma placa com 10 mL de ágar soja triptona (Código: CM0131, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE) e uma sobrecamada de 5 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) (Código: CM0225, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,75% de ágar (Código: 214010, Difco, Detroit, Estados Unidos) (BHI semi-sólido) contendo *L. monocytogenes* (10⁵ a 10⁶ UFC.mL⁻¹), previamente preparada. Após a completa absorção da alíquota, as placas foram incubadas a 37° C por 12 h, observando-se a formação de halos de inibição ao redor do inóculo (Figura 2). A quantidade das bacteriocinas na preparação foi definida como a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, expresso em unidades arbitrárias por mililitro (UA.mL⁻¹). Controle positivo (Nisina 1000 UI.mL⁻¹) e negativo (água ultrapurificada em Milli-Q®, Millipore, Bedford, Estados Unidos) foram incluídos em todos os testes.

Figura 2. Representação esquemática do procedimento para a quantificação das bacteriocinas.

3.3 Preparo do modelo alimentar e das formulações I, II, III e IV

Preparou-se um modelo alimentar, de acordo com ALVES *et al.* (2003), composto por 1,8% de proteose peptona (Código: LP0085, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), 1,2% de extrato de carne (Código: LP0029, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e 2,0% de amido de milho (Maizena, Unilever).

Esse modelo foi utilizado para o preparo de quatro formulações diferentes, conforme sugeridas por ALVES *et al.* (2003), descritas a seguir:

- **Formulação I** Modelo alimentar;
- **Formulação II** Modelo alimentar com 4% de NaCl;
- **Formulação III** Modelo alimentar com 0,5% de glicose;
- **Formulação IV** Modelo alimentar com 0,5% de glicose e 4% de NaCl.

As formulações foram esterilizadas em autoclave a 121° C por 15 min.

3.4 Preparo dos materiais para testes da atividade das bacteriocinas

3.4.1 Preparo do sobrenadante da cultura em caldo MRS

Seis litros de caldo Lactobacilli MRS (Código: 288130, Difco, Detroit, Estados Unidos) adicionados de 0,5 mg.mL⁻¹ de cisteína (Código: C7880, Sigma, Nova Iorque, Estados Unidos) foram inoculados com 60 mL da cultura de *L. sakei* 2a e incubados a 25° C por 18 h. A cultura foi aquecida em banho-maria a 70° C durante 30 min para inativação de proteases e das células e, após o ajuste do pH para 5,5-6 com solução NaOH a 20 N, as células foram separadas por centrifugação a 3000 xg (4° C) por 15 min (Sorvall Instruments, modelo RC5C), conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática do procedimento para o preparo do sobrenadante com a cultura em caldo MRS

3.4.2 Preparo do sobrenadante do caldo MRS concentrado livre de células contendo bacteriocinas

O sobrenadante preparado conforme descrito no item 3.4.1 foi concentrado e dialisado através do sistema Amicon (Millipore, Bedford, Estados Unidos), utilizando inicialmente uma membrana com limite de exclusão de 50.000 Da e logo após outra membrana com limite de exclusão de 1000 Da. O concentrado foi

esterilizado por filtração em Millex GV 0,22 μm (Millipore, Bedford, Estados Unidos) (Figura 4). A quantificação das bacteriocinas no concentrado foi realizada conforme descrito no item 3.2. O mesmo procedimento foi aplicado à cepa de *L. sakei* 15521 não bacteriocinogênica.

Figura 4. Representação esquemática do procedimento para o preparo do sobrenadante concentrado livre de célula em caldo MRS contendo bacteriocinas.

3.4.3 Preparo do extrato ácido neutralizado contendo bacteriocina

O sedimento da cultura centrifugada descrita em 3.4.1 foi submetido à extração ácida de acordo com YANG *et al.* (1992) e ROSA *et al.* (2002). Após duas lavagens com solução tampão 2-[N-morfolino] etanosulfônico (MES) (Código: M3885, Sigma, Nova Iorque, Estados Unidos) a 5 mmol.L^{-1} , pH 6,5, o sedimento foi ressuspenso em 400 mL de solução NaCl 100 mmol.L^{-1} ajustado para pH 1,5 com ácido fosfórico concentrado. Após 1 h de agitação a 4°C , a suspensão foi centrifugada a $3000 \times g$ durante 15 min à 4°C . O sobrenadante foi concentrado e dialisado através do sistema Amicon (Millipore, Bedford, Estados Unidos), usando membrana com limite de exclusão de 1000 Da, obtendo-se um extrato ácido. Após a neutralização do pH com NaOH 20 N,

este extrato foi esterilizado por filtração em membrana Millex GV 0,22 μm (Millipore, Bedford, Estados Unidos) (Figura 5). A quantificação das bacteriocinas no extrato ácido neutralizado foi realizada conforme descrito no item 3.2. O mesmo procedimento foi aplicado à cepa de *L. sakei* 15521 não bacteriocinogênica.

Figura 5. Representação esquemática do procedimento para o preparo do extrato ácido neutralizado contendo bacteriocinas.

3.4.4 Preparo do extrato ácido semi-purificado contendo bacteriocina

Foi cultivado 1% da cepa de *L. sakei* 2a em 48 L de caldo Lactobacilli MRS (Código: 288130, Difco, Detroit, Estados Unidos), preparando-se um extrato ácido neutralizado conforme descrito no item 3.4.3. Em seguida, 30 mL do extrato ácido neutralizado esterilizado foram submetidos à cromatografia de fase reversa em HLPC (Shimadzu) utilizando-se uma coluna Jupiter C₁₈ 2,2 cm x 25 cm, 15 µm, 300 Å (Phenomenex), e um gradiente linear de dois solventes: A (0,1% ácido trifluoroacético (TFA) e H₂O) e B (60% de acetonitrila e solvente A), variando de 5 a 95% de solvente B em 30 min, sob fluxo de 10 mL.min⁻¹ (Figura 6). As frações foram coletadas e testadas quanto à sua atividade contra *L. monocytogenes* Scott A. As frações com atividade foram liofilizadas, combinadas e re-hidratadas com água ultrapurificada em Milli-Q® (Millipore, Bedford, Estados Unidos).

Figura 6. Representação esquemática do procedimento para o preparo do extrato ácido semi-purificado contendo bacteriocinas.

3.4.5 Dosagem de proteínas nos materiais preparados contendo bacteriocina

A quantidade total de proteínas no sobrenadante do caldo MRS concentrado livre de células, no extrato ácido neutralizado e no extrato ácido semi-purificado foi determinada segundo o método de BRADFORD (1976) adaptado para micro-ensaio. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços

de fundo plano foram colocados 20 μL do material em teste ou do padrão protéico de albumina sérica bovina (Código: P0914, Sigma, Nova Iorque, Estados Unidos) e adicionados 180 μL do reagente de Bradford (Código: B6916, Sigma, Nova Iorque, Estados Unidos). Após 10 min em temperatura ambiente efetuou-se a leitura de absorbância a 595 nm, empregando-se um leitor de ELISA (Spectramax 340, Molecular Devices). A concentração de proteínas nos materiais testados foi calculada com base na curva de calibração com albumina bovina (Figura 7).

Os cálculos realizados para a obtenção do valor de atividade específica foram:

Proteína total = Resultado do teste de Bradford x Volume total

Atividade total = Unidades arbitrária x Volume total

Atividade específica = Atividade total x Proteína total⁻¹

Figura 7. Representação esquemática do procedimento para a dosagem de proteína total.

3.5 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na multiplicação de *L. sakei* 2a

3.5.1 Avaliação da influência dos ingredientes

Para verificar a influência dos ingredientes do modelo alimentar (proteose peptona, extrato de levedura, extrato de carne e amido) na multiplicação de *L. sakei* 2a, foram preparadas quatro diferentes combinações dos ingredientes, conforme a Tabela 1, adicionando-se a cultura de *L. sakei* 2a preparada conforme descrito no item 3.1. As combinações foram mantidas sob refrigeração (4° C) ao longo de 10 dias, e após 0, 3, 5, 7 e 10 dias foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid - Basingstoke, Inglaterra) esterilizada, e alíquotas de cada diluição (1 mL) foram transferidas para placas de petri às quais se adicionou ágar DE MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) (Código: CM0361, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) em duplicata e incubadas a 30° C durante 48 h para a contagem de *L. sakei* 2a (Figura 8). Em todos os tempos avaliados, mensurou-se o pH das combinações, empregando-se uma fita indicadora (Merck - Darmstadt, Alemanha, Darmstadt, Alemanha). Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

Tabela 1. Combinações dos ingredientes do modelo alimentar.

Combinação	Proteose peptona (p.v ⁻¹)	Extrato de levedura (p.v ⁻¹)	Amido de milho (p.v ⁻¹)	Extrato de carne (p.v ⁻¹)
1	1,8%	0,6%	2,0%	--
2	1,8%	--	2,0%	1,2%
3	--	0,6%	2,0%	1,2%
4	1,8%	0,6%	--	1,2%

Figura 8. Representação esquemática do procedimento para a avaliação da influência dos ingredientes do modelo alimentar na multiplicação e produção das bacteriocinas de *L. sakei* 2a.

3.5.2 Avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

Para avaliação do efeito da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na multiplicação da bactéria láctica bacteriocinogênica, adicionou-se a cultura de *L. sakei* 2a bac+ preparada conforme descrito no item 3.1 nas quatro formulações do modelo alimentar, descritas no item 3.3.

As formulações foram mantidas a 4° C por 10 dias, efetuando-se a quantificação de *L. sakei* 2a após 0, 3, 5, 7 e 10 dias. Para tanto, uma alíquota de cada formulação foi submetida à diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid - Basingstoke, Inglaterra) esterilizada. Uma alíquota (1mL) de cada diluição foi transferida para uma placa de petri, adicionando-se 15 mL ágar DE MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS) (Código: CM0361, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), em duplicatas. Após incubação a 30° C por 48 h, efetuou-se a contagem de *L. sakei* 2a bac+, calculando-se a média das duas placas (Figura 9). Em todos os tempos avaliados, mensurou-se o pH das formulações, empregando-se uma fita indicadora (Merck - Darmstadt, Alemanha). Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

Figura 9. Representação esquemática do procedimento para a avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na multiplicação e produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a em modelo alimentar.

3.6 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a

3.6.1 Avaliação da influência dos ingredientes

Para verificar a influência dos ingredientes do modelo alimentar (proteose peptona, extrato de levedura, extrato de carne e amido) na produção das bacteriocinas, foram preparadas quatro diferentes combinações dos ingredientes, conforme a Tabela 1, adicionando-se a cultura de *L. sakei* 2a preparada conforme descrito no item 3.1. As combinações foram mantidas sob refrigeração (4° C) por 10 dias.

Para a quantificação das bacteriocinas nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar nos tempos avaliados (0, 3, 5, 7 e 10 dias), alíquotas de 1 mL de cada combinação foram centrifugadas a 3000 xg por 15 min. O pH de cada sobrenadante foi ajustado entre 6 e 7 com NaOH 1 N. O número de Unidades Arbitrárias por mililitro (UA.mL⁻¹) do sobrenadante foi determinado pelo teste *spot-on-the-lawn*, descrito no item 3.2 (Figura 8).

3.6.2 Avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

Para avaliação do efeito da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na produção das bacteriocinas no modelo alimentar, adicionou-se a cultura de *L. sakei* 2a preparada conforme descrito no item 3.1 nas quatro formulações do modelo alimentar, descritas no item 3.3.

As formulações foram mantidas a 4° C por até 10 dias, efetuando-se a quantificação das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a após 0, 3, 5, 7 e 10 dias, conforme o item 3.6.1 (Figura 9).

3.7 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na atividade antilisteria dos materiais contendo as bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a

3.7.1 Testes com as bacteriocinas produzidas no modelo alimentar

3.7.1.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

Para avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose no efeito antilisteria das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a em cada uma das formulações do modelo alimentar foram testadas duas condições, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Condições para avaliação do efeito antilisteria das bacteriocinas produzidas nas quatro formulações do modelo alimentar.

Condições		Formulações*
1	<i>L. sakei</i> 2a (bac+) + <i>L. monocytogenes</i>	I
		II
		III
		IV
2	<i>L. sakei</i> 15521 (bac-) + <i>L. monocytogenes</i>	I
		II
		III
		IV

* Formulação I - Modelo alimentar; Formulação II - Modelo alimentar + 4% de NaCl; Formulação III - Modelo alimentar + 0,5% de glicose; Formulação IV - Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose.

Todas as formulações foram mantidas a 4° C por até 10 dias, efetuando-se a quantificação de *L. monocytogenes* após 0, 3, 5, 7 e 10 dias. Para tanto, uma alíquota de cada formulação, nas duas condições testadas, foi submetida

à diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada. Uma alíquota (1 mL) de cada diluição foi transferida para uma placa de petri, adicionando-se 10 mL de ágar soja triptona (Código: CM0131, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE). Após a homogeneização e solidificação do meio, adicionou-se uma sobrecamada de 5 mL de ágar seletivo listeria (formulação oxford) (Código: SR0140, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), conforme sugerido por KANG e FUNG (1999) e incubou-se a 37° C por 48 h, as placas foram preparadas em duplicata (Figura 10). As contagens de *L. monocytogenes* nas diferentes condições testadas foram transformadas em logaritmos, considerando a média das duplicatas.

Para a quantificação das bacteriocinas e mensuração do pH nas formulações nos tempos avaliados, foram realizados testes conforme descrito no item 3.2 e no item 3.5.2, respectivamente.

Figura 10. Representação esquemática do procedimento para a avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a em modelo alimentar.

3.7.2 Testes com o sobrenadante do caldo MRS concentrado livre de células

3.7.2.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

A atividade antimicrobiana das bacteriocinas presentes no caldo MRS concentrado livre de célula nas quatro formulações do modelo alimentar,

mantida sob refrigeração (4° C) por até 10 dias, foi avaliada nas condições descritas na Tabela 3 através da enumeração de *L. monocytogenes* após 0, 3, 5, 7 e 10 dias. Controle negativo, no qual o caldo MRS concentrado bac+ foi substituído por caldo MRS concentrado preparado com uma cultura não bacteriocinogênica, também foi incluído nos testes.

Tabela 3. Condições para análise do efeito antilisteria das bacteriocinas produzida por *L. sakei* 2a nas quatro formulações do modelo alimentar.

Condições		Formulação*
1	Sobrenadante concentrado livre de células da cultura bac+ em caldo MRS + <i>L. monocytogenes</i>	I
		II
		III
		IV
2	Sobrenadante concentrado livre de células da cultura bac- em caldo MRS + <i>L. monocytogenes</i>	I
		II
		III
		IV

* Formulação I) Modelo alimentar; Formulação II) Modelo alimentar + 4% de NaCl; Formulação III) Modelo alimentar + 0,5% de glicose; Formulação IV) Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose.

Para a enumeração de *L. monocytogenes*, cada modelo foi submetido à diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada e alíquotas de cada diluição (1 mL) foram transferidas para placa de petri às quais se adicionou ágar soja triptona (Código: CM0131, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE), após a solidificação do meio se adicionou uma sobrecamada de ágar seletivo listeria (formulação Oxford) (Código: SR0140, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram preparadas em duplicata. Após a incubação a 37° C por 48 h, efetuaram-se as contagens de *L. monocytogenes* (Figura 11), transformando os resultados em logaritmos, considerando-se as médias das duplicatas. Em todos os tempos avaliados, mensurou-se o pH das formulações, empregando-se uma fita indicadora (Merck - Darmstadt, Alemanha). Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

Figura 11. Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células do caldo MRS, em modelo alimentar.

3.7.3 Testes com o extrato ácido neutralizado

3.7.3.1 Avaliação da influência dos ingredientes

Para verificar a influência dos ingredientes do modelo alimentar (proteose peptona, extrato de levedura, extrato de carne e amido) no efeito antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, repetiram-se os experimentos descritos no item 3.5.1, substituindo-se a cultura de *L. sakei* 2a por *L. monocytogenes* e adicionando o extrato ácido neutralizado nas quatro formulações do modelo alimentar (Tabela 4).

Tabela 4. Condições para análise do efeito antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar.

Condições	Combinação*
1 Extrato ácido neutralizado bac+ + <i>L. monocytogenes</i>	1
	2
	3
	4
2 Extrato ácido neutralizado bac- + <i>L. monocytogenes</i>	1
	2
	3
	4

* Combinação 1) Proteose peptona, extrato de levedura e amido; Combinação 2) Proteose peptona, extrato de carne e amido; Combinação 3) Extrato de carne, extrato de levedura e amido; Combinação 4) Extrato de carne, extrato de levedura e proteose peptona.

Para cada dia de análise (0, 3, 5, 7 e 10 dias), as combinações foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada e alíquotas de cada diluição (1 mL) foram transferidas para placa de petri às quais se adicionou ágar soja triptona (Código: CM0131, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE), após a solidificação do meio se adicionou uma sobrecamada de ágar seletivo listeria

(formulação oxford) (Código: SR0140, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), em duplicata e incubadas a 37° C por 48 h para a contagem de *L. monocytogenes* (Figura 12). Em todos os tempos avaliados, mensurou-se o pH das combinações, empregando-se uma fita indicadora (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

Figura 12. Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência dos ingredientes do modelo alimentar na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado.

3.7.3.2 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

A influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado nos quatro modelos alimentares, mantidos sob refrigeração (4° C) por até 10 dias, foi avaliada nas condições descritas na Tabela 5 através da determinação do número de *L. monocytogenes* após 0, 3, 5, 7 e 10 dias de armazenamento a 4° C. Controle negativo, no qual o extrato ácido neutralizado do sedimento de *L. sakei* 2a bac+ foi substituído por extrato ácido neutralizado do sedimento de *L. sakei* bac- foi incluído nos testes.

Tabela 5. Condições para análise do efeito antilisteria das bacteriocinas produzida por *L. sakei* 2a nas quatro formulações do modelo alimentar.

Condições	Formulação*
1 Extrato ácido neutralizado bac+ + <i>L. monocytogenes</i>	I
	II
	III
	IV
2 Extrato ácido neutralizado bac- + <i>L. monocytogenes</i>	I
	II
	III
	IV

* Formulação I) Modelo alimentar; Formulação II) Modelo alimentar + 4% de NaCl; Formulação III) Modelo alimentar + 0,5% de glicose; Formulação IV) Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose.

Cada modelo foi submetido à diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada e alíquotas de cada diluição (1 mL) foram transferidas para placa de petri às quais se adicionou ágar soja triptona (Código: CM0131, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE), após a solidificação do meio se adicionou uma sobrecamada de ágar seletivo listeria (formulação Oxford)

(Código: SR0140, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), em duplicata. Após a incubação a 37° C por 48 h, efetuaram-se as contagens de *L. monocytogenes*, transformando os resultados em logaritmos, considerando-se as médias das duplicatas (Figura 13). Em todos os tempos avaliados, mensurou-se o pH das formulações, empregando-se uma fita indicadora (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

Figura 13. Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado em modelo alimentar.

3.7.4 Testes com o extrato ácido semi-purificado

3.7.4.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

Para avaliar a interferência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose no efeito antilisteria das bacteriocinas do extrato ácido semi-purificado, o material semi-purificado foi adicionado às quatro formulações do modelo alimentar preparado conforme descrito no item 3.3, mantidas a 4° C por 10 dias. Nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 de análise, as formulações foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) (Código: LP0037, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) esterilizada e alíquotas de cada diluição (1 mL) foram transferidas para placa de petri às quais se adicionou ágar soja triptona (Código: CM0131, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Código: LP0021, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (TSAYE), após a solidificação do meio se adicionou uma sobrecamada de ágar seletivo listeria (formulação oxford) (Código: SR0140, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) em duplicata e incubadas a 37° C por 48 h para a contagem de *L. monocytogenes* (Figura 14). Em todos os tempos avaliados, mensurou-se o pH das combinações, empregando-se uma fita indicadora (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

Figura 14. Representação esquemática do procedimento para avaliação da influência de 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado em modelo alimentar.

3.8 Interpretação dos resultados e análise estatística

Calculou-se as médias das populações de *L. monocytogenes*, *L. sakei* 15521 (bac-) e *L. sakei* 2a (bac+) nas diferentes condições testadas, que foram transformadas em logaritmos ($\log \text{ UFC.mL}^{-1}$). Para cada uma das três repetições efetuadas, calculou-se a diferença entre o log de cada população média em cada um dos tempos avaliados em relação ao tempo zero ($\Delta \log \text{ UFC.mL}^{-1}$), calculando-se em seguida a média destas diferenças nas três repetições efetuadas, para cada tempo analisado. Os valores obtidos dos itens 3.6.1, 3.6.3 e 3.7.3.1 foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey para verificar a significância da diferença entre eles ($p < 0,05$).

Os valores dos itens restantes foram submetidos à análise de acordo com um planejamento fatorial 2^2 com três replicas, utilizando-se o programa Minitab™, versão 15.

A tabela 6 apresenta os níveis avaliados das variáveis dependentes, 4% de NaCl e 0,5% de glicose, e as condições dos quatros experimentos realizados.

Tabela 6. Matriz de ensaios para o planejamento fatorial com as variáveis nas unidades codificadas e originais

Experimentos	NaCl		glicose	
	Codificado X_1	Não codificado (%)	Codificado X_2	Não codificado (%)
1	-1	0	-1	0
2	1	4	-1	0
3	-1	0	1	0,5
4	1	4	1	0,5

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose ao modelo na multiplicação de *L. sakei* 2a

4.1.1 Avaliação da influência dos ingredientes

A Tabela 7 e a Figura 15 apresentam os resultados das diferenças de contagens de *L. sakei* 2a em relação ao tempo zero ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, após 10 dias de armazenamento a 4° C. Embora a análise estatística tenha indicado diferenças significantes ($p < 0,05$) nas diferenças das populações de *L. sakei* 2a nas combinações estudadas, a diferença foi perceptível do ponto de vista microbiológico somente nas combinações contendo extrato de carne e extrato de levedura (combinações 3 e 4) a partir do 3° dia de armazenamento a 4° C.

O pH do modelo alimentar, nas quatro combinações, permaneceu entre 6 e 7 durante os 10 dias de armazenamento a 4° C.

Tabela 7. Diferenças nas populações de *L. sakei* 2a bac+ ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Combinação	Tempo de armazenamento (Dia)	pH do modelo	$\Delta\log$ em relação à contagem no tempo zero*
1 Proteose peptona + Extrato de levedura + Amido	0	7	0 a
	3	7	0,46±0,12 b
	5	7	0,72±0,01 bc
	7	6	0,90±0,07 c
	10	6	0,69±0,21 bc
2 Proteose peptona + Extrato de carne + Amido	0	7	0 a
	3	7	0,35±0,11 a
	5	7	0,80±0,25 b
	7	6	0,86±0,07 b
	10	6	0,85±0,21 b
3 Extrato de carne + Extrato de levedura + Amido	0	7	0 a
	3	7	0,85±0,70 ab
	5	7	0,27±0,08 ab
	7	6	0,91±0,06 b
	10	6	1,15±0,22 b
4 Proteose peptona + Extrato de levedura + Extrato de carne	0	7	0 a
	3	7	0,78±0,24 b
	5	7	0,86±0,31 b
	7	6	1,19±0,11 b
	10	6	1,2±0,11 b

* valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentam diferença estatística entre si ($p>0,05$)

Combinação 1) Proteose peptona, extrato de levedura e amido; (vermelho)
 Combinação 2) Proteose peptona, extrato de carne e amido; (laranja)
 Combinação 3) Extrato de carne, extrato de levedura e amido; (amarelo)
 Combinação 4) Extrato de carne, extrato de levedura e proteose peptona. (verde)

Figura 15. Diferenças nas populações de *L. sakei* 2a bac+ ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Os resultados das diferenças nas populações de *L. sakei* 2a nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar de acordo com o tempo de armazenamento (3, 5, 7 e 10 dias) estão descritos na Tabela 8. Embora tenha sido possível detectar algumas diferenças com significância estatística ($p < 0,05$), no geral os resultados mostram que nenhum dos ingredientes influenciou marcadamente a multiplicação de *L. sakei* 2a, já que a maior diferença observada foi de 0,51 $\Delta\log \text{mL}^{-1}$.

Tabela 8. Diferenças nas populações de *L. sakei* 2a bac+ ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, agrupadas de acordo com o tempo de armazenamento a 4° C por 10 dias.

Tempo de armazenamento (Dia)		Combinação	$\Delta\log$ em relação à contagem no tempo zero*
3	1	Proteose peptona + extrato de levedura + amido	0,46±0,12 A
	2	Proteose peptona + extrato de carne + amido	0,35±0,11 A
	3	Extrato de carne + extrato de levedura + amido	0,85±0,70 A
	4	Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	0,78±0,24 A
5	1	Proteose peptona + extrato de levedura + amido	0,72±0,01 A
	2	Proteose peptona + extrato de carne + amido	0,80±0,25 AB
	3	Extrato de carne + extrato de levedura + amido	0,27±0,08 B
	4	Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	0,86±0,31 B
7	1	Proteose peptona + extrato de levedura + amido	0,90±0,07 A
	2	Proteose peptona + extrato de carne + amido	0,86±0,07 A
	3	Extrato de carne + extrato de levedura + amido	0,91±0,06 A
	4	Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	1,19±0,11 B
10	1	Proteose peptona + extrato de levedura + amido	0,69±0,21 A
	2	Proteose peptona + extrato de carne + amido	0,85±0,21 A
	3	Extrato de carne + extrato de levedura + amido	1,15±0,22 A
	4	Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	1,2±0,11 A

* valores seguidos da mesma letra maiúscula não apresentam diferença estatística entre si ($p>0,05$)

4.1.2 Avaliação da influência do 4% de NaCl e 0,5% de glicose

A Tabela 9 apresenta as diferenças nas populações de *L. sakei* 2a obtidas em cada um dos tempos avaliados em relação ao tempo zero ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas formulações I, II, III e IV, bem como os correspondentes valores de pH. A redução mais acentuada do pH foi observada nos modelos alimentares adicionados de 0,5% de glicose, independente da adição de 4% de NaCl.

Na Tabela 10 estão apresentadas as estimativas dos efeitos das variáveis avaliadas (4% de NaCl e 0,5% de glicose), calculadas através do planejamento fatorial. A Figura 16 apresenta graficamente os efeitos do 4% de NaCl na multiplicação de *L. sakei* 2a durante o armazenamento a 4° C por 10 dias nas quatro formulações dos modelos alimentares. A Figura 17 apresenta graficamente os efeitos da 0,5% de glicose e a Figura 18 apresenta os efeitos do 4% de NaCl e da 0,5% de glicose simultaneamente ao modelo alimentar.

Verifica-se na Tabela 10 e nas Figuras 15 e 16 que tanto a 0,5% de glicose como 4% de NaCl afetaram significativamente ($p < 0,05$) a multiplicação de *L. sakei* 2a em todos os modelos avaliados. A adição de 4% de NaCl causou uma redução na multiplicação do microrganismo durante o armazenamento a 4° C, com um valor médio mínimo de $0,43 \Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$ em 3 dias e um valor médio máximo de $0,75 \Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$ em 7 dias. Por outro lado, a adição de 0,5% de glicose favoreceu a multiplicação de *L. sakei* 2a, com um valor médio mínimo de $1,1 \Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$ para 7 dias e um valor médio máximo de $1,3 \Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$ para 3 dias de armazenamento a 4° C.

Quando 4% de NaCl e a 0,5% de glicose foram adicionados simultaneamente ocorreu uma interação significativa ($p < 0,05$) entre esses ingredientes em todos os tempos de armazenamento avaliados (Tabela 10 e Figura 17). Onde a adição de 4% de NaCl no modelo alimentar com 0,5% de glicose reduziu a multiplicação de *L. sakei* 2a em todos os tempos avaliados.

Tabela 9. Diferenças nas populações de *L. sakei* 2a ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$), obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Formulação	Tempo de armazenamento (Dia)	pH do modelo	$\Delta\log$ em relação à contagem no tempo zero
I (Modelo alimentar)	0	7	0
	3	7	0,86±0,26
	5	7	1,10±0,07
	7	6	1,21± 0,27
	10	6	0,76±0,28
II (Modelo alimentar + 4% de NaCl)	0	7	0
	3	7	0,84±0,26
	5	7	1,12±0,40
	7	6	1,03±0,17
	10	6	1,08±0,21
III (Modelo alimentar + 0,5% de glicose)	0	7	0
	3	5	2,57±0,14
	5	5	2,72±0,43
	7	5	2,87±0,57
	10	4	2,56±0,34
IV (Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose)	0	7	0
	3	5	1,73±0,29
	5	5	1,78±0,34
	7	5	1,56±0,38
	10	5	1,69±0,52

Tabela 10. Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na multiplicação de *L. sakei* 2a ($\Delta \log \text{ UFC.mL}^{-1}$) nos modelos alimentares, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Tempo de armazenamento (Dia)	Modelo alimentar	Avaliação estatística*		
		Efeito	Valor p	Significância
3	4% de NaCl	-0,43	0,030	Sim
	0,5% de glicose	1,30	0,000	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,41	0,034	Sim
5	4% de NaCl	-0,46	0,028	Sim
	0,5% de glicose	1,14	0,000	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,50	0,019	Sim
7	4% de NaCl	-0,75	0,007	Sim
	0,5% de glicose	1,10	0,001	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,56	0,024	Sim
10	4% de NaCl	-0,28	0,185	Não
	0,5% de glicose	1,21	0,001	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,60	0,018	Sim

* efeitos com $p \leq 0,05$ são significativos.

Figura 16. Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na multiplicação de *L. sakei* 2a durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.

Figura 17. Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na multiplicação de *L. sakei* 2a durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.

Figura 18. Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na multiplicação de *L. sakei* 2a, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4°C) por 3 (a), 5 (b), 7 (c) e 10 (d) dias.

4.2 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e de 0,5% de glicose ao modelo na produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a

4.2.1 Avaliação da influência dos ingredientes

A produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a nas diferentes combinações dos ingredientes do modelo alimentar foi detectada somente no 10º dia de armazenamento a 4º C (100 AU.mL^{-1}), independentemente dos ingredientes (proteose peptona, extrato de levedura, extrato de carne ou amido) presentes no modelo.

4.2.2 Avaliação da influência do 4% de NaCl e 0,5% de glicose

Os resultados da atividade das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a nas quatro formulações do modelo alimentar durante o armazenamento a 4º C por 10 dias estão apresentados na Tabela 11. No modelo alimentar adicionado de 4% de NaCl (formulação II), não houve produção das bacteriocinas. Embora tenha ocorrido produção das bacteriocinas em todas as demais formulações, a quantidade produzida variou de acordo a formulação, sendo maior naquela com 0,5% de glicose (formulação III). Na formulação com 4% de NaCl e 0,5% de glicose (formulação IV), a produção das bacteriocinas foi mais baixa quando comparada a formulação com somente 0,5% de glicose (formulação III). No modelo alimentar sem 4% de NaCl e/ou 0,5% de glicose (formulação I), a produção das bacteriocinas foi baixa e detectada somente no décimo dia de armazenamento.

Tabela 11. Atividade das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a nas quatro formulações do modelo alimentar, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Formulação	Tempo de armazenamento (Dia)	Atividade das bacteriocinas (AU.mL ⁻¹)
I (Modelo alimentar)	0	0
	3	0
	5	0
	7	0
	10	100
II (Modelo alimentar + 4% de NaCl)	0	0
	3	0
	5	0
	7	0
	10	0
III (Modelo alimentar + 0,5% de glicose)	0	0
	3	0
	5	100
	7	200
	10	200
IV (Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose)	0	0
	3	0
	5	100
	7	100
	10	100

4.3 Avaliação do efeito dos ingredientes do modelo alimentar e da adição de 4% de NaCl e de 0,5% de glicose ao modelo na atividade antilisteria dos materiais contendo as bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a

4.3.1 Testes com as bacteriocinas produzidas nos modelos alimentares

4.3.1.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

A Tabela 12 apresenta as diferenças nas populações de *L. monocytogenes* nas quatro formulações do modelo alimentar, obtidas em cada um dos tempos avaliados, em relação ao tempo zero, expressas em $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$, quando *L. monocytogenes* foi co-cultivada com a cepa bacteriocinogênica (*L. sakei* 2a bac+) e com a cepa não bacteriocinogênica (*L. sakei* bac-).

Na Tabela 13 estão apresentadas as estimativas dos efeitos das variáveis avaliadas (4% de NaCl e 0,5% de glicose) nos valores de $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$ de *L. monocytogenes* quando co-cultivada com *L. sakei* 2a bac+ em relação aos valores de $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$ de *L. monocytogenes* quando co-cultivada com *L. sakei* bac-, calculadas através do planejamento fatorial.

A Figura 19 apresenta graficamente o efeito de 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a durante o armazenamento a 4° C por 10 dias.

Conforme a Tabela 13, o efeito da 0,5% de glicose na atividade antilisteria foi significativo ($p < 0,05$) em todos os tempos de armazenamento sob refrigeração (4° C). Em 3 dias, a 0,5% de glicose reduziu a atividade das bacteriocinas, mas com o aumento do tempo de armazenamento, a atividade antilisteria na presença de 0,5% de glicose aumentou, sendo 1,0, 1,5 e 1,8 $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$ nos dias 5, 7 e 10, respectivamente.

Verificou-se que o efeito do 4% de NaCl na atividade das bacteriocinas ao longo do armazenamento sob refrigeração (4° C) não foi significativo ($p < 0,05$).

A Figura 20 apresenta os efeitos da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente ao modelo alimentar, na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a durante o armazenamento a 4° C por 10 dias. Uma interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores avaliados foi verificada apenas no 5° dia de armazenamento sob refrigeração, onde a adição de 4% de NaCl no modelo alimentar contendo 0,5% de glicose potencializou o efeito das bacteriocinas.

Tabela 12. Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, quando co-cultivada com *L. sakei* 2a bac⁺ e com *L. sakei* bac⁻, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Formulação	Tempo de armazenamento (Dia)	Δlog em relação à contagem no tempo zero*				A-B**
		Co-cultivada com <i>L. sakei</i> bac- (A)		Co-cultivada com <i>L. sakei</i> 2a bac+ (B)		
		Δlog	pH do	Δlog	pH do	
		UFC.mL ⁻¹	modelo	UFC.mL ⁻¹	modelo	
I (Modelo alimentar)	0	0	7	0	7	0
	3	1,52	7	1,77	7	-0,25±0,40
	5	1,79	7	1,87	7	-0,08±0,46
	7	1,71	6	2,41	6	-0,70±0,04
	10	2,03	6	2,29	6	-0,26±0,41
II (Modelo alimentar + 4% de NaCl)	0	0	7	0	7	0
	3	0,97	7	1,09	7	-0,12±0,32
	5	2,75	7	3,52	7	-0,77±0,13
	7	2,90	6	3,63	6	-0,73±0,17
	10	3,03	6	3,54	6	-0,51±0,36
III (Modelo alimentar + 0,5% de glicose)	0	0	7	0	7	0
	3	1,48	5	2,09	5	-0,61±0,12
	5	2,14	5	1,94	5	0,20±0,06
	7	2,23	5	1,75	5	0,48±0,21
	10	2,91	5	1,40	4	1,51±0,28
IV (Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose)	0	0	7	0	7	0
	3	0,79	6	1,78	5	-0,99±0,46
	5	1,94	6	1,21	5	0,73±0,35
	7	2,77	5	1,73	5	1,04±0,38
	10	3,14	5	1,74	5	1,40±0,14

* valores positivos indicam aumento da contagem em relação ao tempo zero, valores negativos indicam diminuição da contagem em relação ao tempo zero;

** valores positivos indicam atividade das bacteriocinas e valores negativos indicam ausência de atividade das bacteriocinas.

Tabela 13. Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a nos modelos alimentares, durante armazenamento a 4° C por 10 dias

Tempo de armazenamento (Dia)	Modelo alimentar	Avaliação estatística*		
		Efeito	Valor p	Significância
3	4% de NaCl	-0,13	0,375	Não
	0,5% de glicose	-0,62	0,004	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,24	0,122	Não
5	4% de NaCl	0,06	0,650	Não
	0,5% de glicose	1,02	0,000	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,46	0,012	Sim
7	4% de NaCl	0,26	0,116	Não
	0,5% de glicose	1,47	0,000	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,30	0,078	Não
10	4% de NaCl	-0,19	0,402	Não
	0,5% de glicose	1,84	0,000	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,08	0,719	Não

* efeitos com $p \leq 0,05$ são significativos.

Figura 19. Efeito da adição de 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a no modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.

Figura 20. Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 5 dias.

4.3.2 Determinação da atividade específica dos diferentes materiais contendo bacteriocinas

A atividade específica de cada um dos materiais contendo as bacteriocinas está apresentada na Tabela 14, calculada conforme indicado no item 3.4.5. A Figura 21 mostra a curva padrão de albumina, utilizada para a quantificação dos peptídeos nos materiais, através da técnica de BRADFORD (1976).

Tabela 14. Unidades Arbitrárias (UA.mL⁻¹), proteína total (mg.mL⁻¹) e atividade específica (UA.mg⁻¹) determinadas nos materiais contendo as bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a.

Material	Unidade Arbitrária (UA.mL ⁻¹)	Proteína Total (mg.mL ⁻¹)	Atividade Específica (UA.mg ⁻¹)
Sobrenadante concentrado	3200	0,15	8000
Extrato ácido neutralizado	800	0,14	2000
Extrato ácido semi-purificado	409600	281,7	14540,29

Figura 21. Curva padrão de albumina bovina.

4.3.3 Testes com as bacteriocinas presentes no sobrenadante da cultura em caldo MRS

4.3.3.1 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e 0,5% de glicose

A Tabela 15 apresenta as diferenças dos $\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$ das populações de *L. monocytogenes* nas quatro formulações do modelo alimentar adicionadas do sobrenadante concentrado livre de células das culturas de *L. sakei* 2a bac⁺ e *L. sakei* bac⁻ em caldo MRS.

Na Tabela 16 estão apresentadas as estimativas dos efeitos das variáveis avaliadas (4% de NaCl e 0,5% de glicose) na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células das culturas em caldo MRS, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro formulações dos modelos alimentares durante o armazenamento a 4° C por 10 dias, calculadas através do planejamento fatorial.

As Figura 22 e 23 apresentam graficamente os efeitos de 4% de NaCl e 0,5% de glicose respectivamente, na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células das culturas em caldo MRS, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro formulações dos modelos alimentares durante o armazenamento a 4° C por 10 dias.

Conforme indicado na Tabela 16, 0,5% de glicose e 4% de NaCl causaram uma redução na atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células das culturas em caldo MRS, mas essa redução foi significativa apenas no 7° dia de armazenamento a 4° C. A adição de 4% de NaCl causou uma redução média nas diferenças das populações de *L. monocytogenes* de $0,45 \Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$, enquanto a adição de 0,5% de glicose causou uma redução de $0,30 \Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$. Quando 4% de NaCl e 0,5% de glicose estavam simultaneamente presentes, a redução na atividade antilisteria foi significativa ($p < 0,05$) no 3° e no 7° dia de

armazenamento. Do ponto de vista microbiológico essa redução tem pouco valor, pois em nenhuma das condições testadas foi obtida uma redução superior a 1 $\Delta\log$ UFC.mL⁻¹.

Para uma melhor visualização dos resultados, a Figura 24 apresenta graficamente o efeito da interação de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células das culturas em caldo MRS, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log$ UFC.mL⁻¹) nas quatro formulações do modelo alimentar durante o armazenamento a 4° C por 10 dias. Conforme indicado na Figura 24, verifica-se que nos dias 3 e 7 de armazenamento, a presença de 4% de NaCl favoreceu a atividade das bacteriocinas nos modelos com 0,5% de glicose.

Tabela 15. Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{ UFC.mL}^{-1}$) obtidas das quatro formulações do modelo alimentar, adicionadas do sobrenadante concentrado livre de células da cultura de *L. sakei* 2a bac⁺ e *L. sakei* bac⁻ em caldo MRS, durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Formulação	Tempo de armazenamento (Dia)	$\Delta\log$ em relação à contagem no tempo zero*			A-B**
		Sobrenadante concentrado	Sobrenadante concentrado bac ⁻	Sobrenadante concentrado bac ⁺	
			(A)	(B)	
I (Modelo alimentar)	0	0	0	0	0
	3	0,17±0,14	-0,10	-0,24	0,14±0,09
	5	0,14±0,11	-0,14	-0,35	0,21±0,16
	7	0,13±0,13	-0,23	-0,49	0,26±0,15
	10	0,10±0,18	-0,28	-0,39	0,11±0,18
II (Modelo alimentar + 4% de NaCl)	0	0	0	0	0
	3	0,13±0,15	-0,30	-0,30	0±0,23
	5	0,15±0,11	-0,29	-0,55	0,26±0,18
	7	0,11±0,11	-0,35	-0,72	0,37±0,03
	10	0,17±0,13	-0,44	-0,61	0,17±0,15
III (Modelo alimentar + 0,5% de glicose)	0	0	0	0	0
	3	0,03±0,12	-0,16	-0,05	-0,11±0,09
	5	0,09±0,01	-0,04	-0,38	0,34±0,08
	7	0,09±0,07	-0,47	-0,68	0,21±0,10
	10	0,12±0,02	-0,62	-0,81	0,19±0,07
IV (Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose)	0	0	0	0	0
	3	0,01±0,05	-0,07	-0,38	0,31±0,30
	5	0,08±0,08	-0,13	-0,52	0,39±0,23
	7	0,08±0,02	-0,14	-1,27	1,13±0,38
	10	0,05±0,04	-0,23	-0,65	0,42±0,25

* valores positivos indicam aumento da contagem em relação ao tempo zero, valores negativos indicam diminuição da contagem em relação ao tempo zero;

** valores positivos indicam atividade das bacteriocinas e valores negativos indicam ausência de atividade das bacteriocinas.

Tabela 16. Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células das culturas de *L. sakei* 2a bac+ e *L. sakei* bac- em caldo MRS, avaliados nos modelos alimentares, durante armazenado a 4° C por 10 dias.

Tempo de armazenamento (Dia)	Modelo alimentar	Avaliação estatística*		
		Efeito	Valor p	Significância
3	4% de NaCl	0,050	0,600	Não
	0,5% de glicose	-0,02	0,803	Não
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,23	0,043	Sim
5	4% de NaCl	-0,01	0,879	Não
	0,5% de glicose	0,07	0,471	Não
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,06	0,497	Não
7	4% de NaCl	0,45	0,001	Sim
	0,5% de glicose	0,30	0,007	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,34	0,004	Sim
10	4% de NaCl	0,07	0,470	Não
	0,5% de glicose	0,08	0,386	Não
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,01	0,912	Não

* efeitos com $p \leq 0,05$ são significativos.

Figura 22. Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 7 dias.

Figura 23. Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 7 dias.

Figura 24. Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 (a) e 7 (b) dias.

4.3.4 Testes com o extrato ácido neutralizado da cultura em caldo MRS

4.3.4.1 Avaliação da influência dos ingredientes

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados das diferenças das populações ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) de *L. monocytogenes* nas quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, adicionadas ou não de extrato ácido neutralizado bac+ (2000 UA.mg⁻¹ de atividade específica), durante 10 dias de armazenamento a 4°C. Conforme indicado, verifica-se uma diferença significativa nas diferenças das populações observadas após 7 e 10 dias de armazenamento a 4°C nas combinações 1, 3 e 4, mas essas diferenças não inferiores a 1 $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$, portanto, de baixo significado do ponto de vista microbiológico.

Tabela 17. Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) obtidas das quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, adicionadas do extrato ácido neutralizado das culturas de *L. sakei* 2a bac+ e de *L. sakei* bac-, durante o armazenamento a 4°C por 10 dias.

Combinação	Tempo de armazenamento (Dia)	$\Delta\log$ em relação à contagem no tempo zero*		A-B****
		Extrato ácido bac- (A)	Extrato ácido bac+ (B)	
1 Proteose peptona + Extrato de levedura + Amido	0	0	0	0 a
	3	-0,05	-0,10	0,05±0,27 a
	5	0,06	0	0,06±0,1 a
	7	0,89	-0,05	0,94±0,16 b
	10	0,44	-0,03	0,47±0,46 b
2 Proteose peptona + Extrato de carne + Amido	0	0	0	0 a
	3	-0,12	-0,38	0,26±0,21 a
	5	0,31	-0,10	0,41±,21 a
	7	0,13	-0,21	0,34±0,25 a
	10	0,28	-0,19	0,47±0,19 a
3 Extrato de carne + Extrato de levedura + Amido	0	0	0	0 a
	3	0,21	-0,15	0,36±0,21 a
	5	0,31	-0,24	0,55±0,37 a
	7	0,23	-0,19	0,42±0,55 b
	10	0,60	-0,18	0,78±0,36 b
4 Proteose peptona + Extrato de levedura + Extrato de carne	0	0	0	0 b
	3	-0,84	-0,15	-0,69±0,18 a
	5	0,11	-0,02	0,13±0,26 bc
	7	0,19	-0,31	0,50±0,04 cd
	10	0,37	-0,27	0,64±0,13 d

* valores positivos indicam aumento da contagem em relação ao tempo zero, valores negativos indicam diminuição da contagem em relação ao tempo zero;

** valores positivos indicam atividade das bacteriocinas e valores negativos indicam ausência de atividade das bacteriocinas;

*** valores seguidos da mesma letra maiúscula não apresentam diferença estatística entre si ($p>0,05$).

Comparando-se os resultados das quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar agrupados de acordo com o tempo de armazenamento sob refrigeração (Tabela 18), pode-se observar que no terceiro dia de armazenamento, apenas a combinação sem amido (combinação 4) diferiu significativamente ($p < 0,05$) das demais combinações. No quinto dia, nenhum dos resultados apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). No sétimo dia, a combinação sem extrato de carne (combinação 1) foi a que apresentou maior atividade antimicrobiana. No último dia de análise, as combinações 1 (sem extrato de carne) e 3 (sem proteose peptona), apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às combinações 2 (sem extrato de levedura) e 4 (sem amido). Estes resultados, apesar de apresentarem diferenças estatísticas entre si, são de pouca importância do ponto de vista microbiológico, pois a redução na população de *L. monocytogenes* foi sempre inferior a $1 \Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$. Com isto, conclui-se que nenhum dos ingredientes do modelo alimentar testados tem influência na atividade do extrato ácido neutralizado obtido a partir da cultura de *L. sakei* 2a em caldo MRS.

Tabela 18. Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{ UFC.mL}^{-1}$) obtidas das quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar, adicionadas do extrato ácido neutralizado das culturas de *L. sakei* 2a bac+ (A) e de *L. sakei* bac- (B), agrupadas de acordo com o tempo de armazenamento a 4° C por até 10 dias.

Tempo de armazenamento (Dia)	Combinação	$\Delta \log$ em relação à contagem do tempo zero*		A-B****
		(A)	(B)	
3	1 Proteose peptona + extrato de levedura + amido	-0,05	-0,10	0,05±0,27 B
	2 Proteose peptona + extrato de carne + amido	-0,12	-0,38	0,26±0,21 B
	3 Extrato de carne + extrato de levedura + amido	0,21	-0,15	0,36±0,21 B
	4 Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	-0,84	-0,15	-0,69±0,18 A
5	1 Proteose peptona + extrato de levedura + amido	0,06	0	0,06±0,1 A
	2 Proteose peptona + extrato de carne + amido	0,31	-0,10	0,41±,21 A
	3 Extrato de carne + extrato de levedura + amido	0,31	-0,24	0,55±0,37 A
	4 Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	0,11	-0,02	0,13±0,26 A
7	1 Proteose peptona + extrato de levedura + amido	0,89	-0,05	0,94±0,16 AB
	2 Proteose peptona + extrato de carne + amido	0,13	-0,21	0,34±0,25 A
	3 Extrato de carne + extrato de levedura + amido	0,23	-0,19	0,42±0,55 B
	4 Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	0,19	-0,31	0,50±0,04 A
10	1 Proteose peptona + extrato de levedura + amido	0,44	-0,03	0,47±0,46 B
	2 Proteose peptona + extrato de carne + amido	0,28	-0,19	0,47±0,19 A
	3 Extrato de carne + extrato de levedura + amido	0,60	-0,18	0,78±0,36 B
	4 Proteose peptona + extrato de carne + extrato de levedura	0,37	-0,27	0,64±0,13 A

* valores positivos indicam aumento da contagem em relação ao tempo zero, valores negativos indicam diminuição da contagem em relação ao tempo zero;

** valores positivos indicam atividade das bacteriocinas e valores negativos indicam ausência de atividade das bacteriocinas;

*** valores seguidos da mesma letra maiúscula não apresentam diferença estatística entre si ($p>0,05$).

4.3.4.2 Avaliação da influência da adição de 4% de NaCl e de 0,5% de glicose

Na Tabela 19 estão representados os resultados dos $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$ da população de *L. monocytogenes* nas quatro formulações do modelo alimentar adicionadas dos extratos ácidos neutralizados obtidos das culturas de *L. sakei* 2a bac+ e de *L. sakei* bac- em caldo MRS, ao longo do armazenamento a 4° C por 10 dias.

Na Tabela 20 estão apresentadas as estimativas dos efeitos das variáveis avaliadas (4% de NaCl e 0,5% de glicose) na atividade das bacteriocinas presentes nos extratos ácidos neutralizados obtidos das culturas de *L. sakei* 2a bac+ e de *L. sakei* bac-, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro formulações dos modelos alimentares durante o armazenamento a 4° C por 10 dias, calculadas através do planejamento fatorial.

A Figura 25 apresenta graficamente o efeito de 4% de NaCl e a Figura 26 apresenta o efeito de 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro formulações do modelo alimentar durante o armazenamento a 4° C por 10 dias.

Conforme indicado na Tabela 20, verifica-se que a adição de 4% de NaCl ou 0,5% de glicose causou um aumento na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado adicionado aos modelos alimentares, durante o armazenamento a 4° C por 10 dias. Deve-se notar, no entanto, que os aumentos observados, embora estatisticamente significantes ($p < 0,05$), têm pouco valor do ponto de vista microbiológico. Apenas no 5° dia de armazenamento do modelo alimentar adicionado de 4% de NaCl foi observada uma diferença superior a 1 $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$ (1,18 $\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$).

Na Figura 27 estão apresentados os efeitos de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro formulações do modelo alimentar durante o armazenamento a 4° C por 10 dias. De modo geral, a adição de 4% de NaCl ao

modelo alimentar contendo 0,5% de glicose favoreceu a atividade antilisteria das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado.

Tabela 19. Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, adicionadas dos extratos ácidos neutralizados das culturas de *L. sakei* 2a bac+ e de *L. sakei* bac- durante armazenamento a 4°C por 10 dias.

Formulação	Tempo de armazenamento (Dia)	$\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$ em relação à contagem do tempo zero*		A-B**
		Extrato ácido bac- (A)	Extrato ácido bac+ (B)	
I (Modelo alimentar)	0	0	0	0
	3	0,15	-0,16	0,31±0,12
	5	0,42	-0,51	0,93±0,20
	7	0	-0,98	0,98±0,04
	10	-0,13	-1,16	1,03±0,04
II (Modelo alimentar + 4% de NaCl)	0	0	0	0
	3	-0,61	-0,21	-0,40±0,12
	5	1,84	-0,13	1,97±0,25
	7	1,83	-0,15	1,98±0,29
	10	0,33	-0,31	0,64±0,16
III (Modelo alimentar + 0,5% de glicose)	0	0	0	0
	3	-0,15	0,02	-0,17±0,26
	5	0,22	-0,24	0,46±0,36
	7	2,51	-0,03	2,54±0,31
	10	0,33	-0,18	0,51±0,31
IV (Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose)	0	0	0	0
	3	-0,08	-0,27	0,19±0,22
	5	1,45	-0,34	1,79±0,12
	7	1,88	-0,24	2,12±0,15
	10	1,67	-0,17	1,84±0,08

* valores positivos indicam aumento da contagem em relação ao tempo zero, valores negativos indicam diminuição da contagem em relação ao tempo zero;

** valores positivos indicam atividade das bacteriocinas e valores negativos indicam ausência de atividade das bacteriocinas.

Tabela 20. Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado nos modelos alimentares durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Tempo de armazenamento (Dia)	Modelo alimentar	Avaliação estatística*		
		Efeito	Valor p	Significância
3	4% de NaCl	-0,18	0,049	Sim
	0,5% de glicose	0,06	0,477	Não
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,54	0,000	Sim
5	4% de NaCl	1,18	0,000	Sim
	0,5% de glicose	-0,32	0,035	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,15	0,258	Não
7	4% de NaCl	0,30	0,095	Não
	0,5% de glicose	0,85	0,001	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,71	0,003	Sim
10	4% de NaCl	0,47	0,004	Sim
	0,5% de glicose	0,34	0,017	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,86	0,000	Sim

* efeitos com $p \leq 0,05$ são significativos.

Figura 25. Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.

Figura 26. Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3, 5, 7 e 10 dias.

Figura 27. Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 (a), 7 (b) e 10 (c) dias.

4.3.5 Testes com o extrato ácido semi-purificado

A Figura 28 mostra o cromatograma resultante da purificação do extrato ácido do sedimento da cultura de *L. sakei* 2a em caldo MRS por HPLC. As frações semi-purificadas obtidas após 10min de corrida, que continham todos os peptídeos com atividade antimicrobiana, foram unidos e aplicados nos modelos alimentares.

Coluna- Júpiter C₁₈ (2,2x25cm), 300 Å, 15 µm (Phenomenex)
Solvente A- 0,1% TFA e H₂O
Solvente B- 60% de Acetonitrila e solvente A
Gradiente- 5-95% B
Volume injetado- 30 µL
Fluxo- 10 mL.min⁻¹

Figura 28. Cromatograma do extrato ácido neutralizado bac⁺ em HPLC para utilização em modelo alimentar.

4.3.5.1 Avaliação da influencia da adição de 4% de NaCl e de 0,5% de glicose

A Tabela 21 apresenta as diferenças das populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar adicionadas ou não do extrato ácido semi-purificado da cultura de *L. sakei* 2a em caldo MRS, durante o armazenamento a 4° C por 10 dias.

Na Tabela 22 estão apresentadas as estimativas dos efeitos das variáveis avaliadas (4% de NaCl e 0,5% de glicose) na atividade das bacteriocinas presentes nos extratos ácidos semi-purificado produzidos pela cepa *L. sakei* 2a bac+, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro formulações dos modelos alimentares durante o armazenamento a 4° C por 10 dias, calculadas através do planejamento fatorial.

As Figuras 29 e 30 apresentam graficamente os efeitos do 4% de NaCl e da 0,5% de glicose respectivamente, na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) nas quatro formulações do modelo alimentar durante o armazenamento a 4° C por 10 dias.

Observa-se na Tabela 22 que o efeito da adição de 0,5% de glicose ou de 4% de NaCl na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado foi variável de acordo com o tempo de armazenamento. O efeito de 0,5% de glicose foi significativo ($p < 0,05$) no 3° e no 5° dia de armazenamento, mas não nos demais dias, apresentando um efeito negativo e positivo, respectivamente. O efeito do 4% de NaCl foi significativo apenas no 5° dia de armazenamento.

De um modo similar, o efeito da interação de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente também variou de acordo com o tempo de armazenamento, sendo significativo apenas no 5° dia.

A Figura 31 apresenta graficamente os efeitos de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado, obtidas a partir das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$) no modelo alimentar durante o armazenamento a 4° C por 5 dias. A adição de 4% de NaCl no modelo alimentar com 0,5% de glicose aumentou a atividade das bacteriocinas de 2,5 para 4,5 $\Delta\log \text{UFC.mL}^{-1}$. No modelo alimentar

sem 0,5% de glicose, o efeito de 4% de NaCl praticamente não teve influência (Tabela 22).

Tabela 21. Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta\log \text{ UFC.mL}^{-1}$) obtidas nas quatro formulações do modelo alimentar, adicionadas e não adicionadas do extrato ácido semi-purificado, durante armazenamento a 4°C por até 10 dias.

Formulação	Tempo de armazenamento (Dia)	$\Delta\log$ em relação à contagem do tempo zero*		A-B**
		Sem extrato ácido semi-purificado (A)	Com extrato ácido semi-purificado (B)	
I (Modelo alimentar)	0	0	0	0
	3	1,69	-0,12	1,97±0,66
	5	2,11	-0,23	2,34±0,21
	7	2,47	-0,23	2,70±0,26
	10	2,42	-0,30	2,72±0,24
II (Modelo alimentar + 4% de NaCl)	0	0	0	0
	3	1,67	0,20	1,47±0,36
	5	2,92	0,46	2,46±0,59
	7	3,85	0,22	3,63±0,36
	10	3,79	-0,01	3,80±0,12
III (Modelo alimentar + 0,5% de glicose)	0	0	0	0
	3	1,50	0,50	1±0,98
	5	2,79	-0,01	2,80±0,14
	7	2,95	-0,08	3,03±0,82
	10	3,93	0,39	3,54±0,53
IV (Modelo alimentar + 4% de NaCl + 0,5% de glicose)	0	0	0	0
	3	1,02	0,24	0,78±0,93
	5	3,09	-1,12	4,21±0,64
	7	3,40	-0,01	3,41±0,79
	10	3,51	-0,02	3,53±0,73

* valores positivos indicam aumento da contagem em relação ao tempo zero, valores negativos indicam diminuição da contagem em relação ao tempo zero;

** valores positivos indicam atividade das bacteriocinas e valores negativos indicam ausência de atividade das bacteriocinas.

Tabela 22. Estimativas dos efeitos das variáveis 4% de NaCl e 0,5% de glicose na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado, nos modelos alimentares durante armazenamento a 4° C por 10 dias.

Tempo de armazenamento (Dia)	Modelo alimentar	Avaliação estatística*		
		Efeito	Valor p	Significância
3	4% de NaCl	-0,28	0,283	Não
	0,5% de glicose	-0,75	0,020	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,06	0,815	Não
5	4% de NaCl	0,77	0,007	Sim
	0,5% de glicose	1,11	0,001	Sim
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	0,65	0,014	Sim
7	4% de NaCl	0,65	0,080	Não
	0,5% de glicose	0,06	0,840	Não
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,29	0,405	Não
10	4% de NaCl	0,51	0,072	Não
	0,5% de glicose	0,30	0,239	Não
	4% de NaCl + 0,5% de glicose	-0,51	0,072	Não

* efeitos com $p \leq 0,05$ são significativos.

Figura 29. Efeito da adição de 4% de NaCl ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 e 5 dias.

Figura 30. Efeito da adição de 0,5% de glicose ao modelo alimentar na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 3 e 5 dias.

Figura 31. Efeito de 4% de NaCl e 0,5% de glicose simultaneamente, na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido semi-purificado, em modelo alimentar durante o armazenamento em refrigeração (4° C) por 5 dias.

A Figura 32 apresenta um agrupamento dos resultados das diferenças nas populações de *L. monocytogenes* nos diferentes experimentos realizados neste trabalho.

Pode-se observar que as diferenças nas populações de *L. monocytogenes* nos diferentes modelos testados foram influenciadas pela presença de 4% de NaCl e 0,5% de glicose e pelo co-cultivo com as bactérias lácticas. A redução mais acentuada foi obtida quando o co-cultivo foi realizado com bactéria láctica bacteriocinogênica.

Verificou-se também que as diferenças nas populações de *L. monocytogenes* nas quatro formulações do modelo alimentar, quando adicionadas das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células da cultura de *L. sakei* 2a em caldo MRS, no extrato ácido neutralizado do sedimento do cultivo em caldo MRS ou do extrato ácido semi-purificado em HPLC foram maiores do que quando se fez o co-cultivo com a cultura de *L. sakei* 2a.

Figura 32. Diferenças nas populações de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$) em todas as condições nas quatro formulações do modelo alimentar armazenados a 4° C por 10 dias em: **a:** modelo alimentar, **b:** modelo alimentar + NaCl, **c:** modelo alimentar + glicose, **d:** modelo alimentar + NaCl + glicose.

5. DISCUSSÃO

5.1 Influência de proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido na multiplicação e na produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a

Bactérias láticas são microrganismos fastidiosos, necessitando de meios ricos para uma ótima multiplicação (VAN DEN BERGHE *et al.*, 2006). A produção de bacteriocinas por bactérias láticas é dependente do pH, fontes de nutrientes e temperatura, mas a taxa de produção de bacteriocina nem sempre está relacionada com a taxa de multiplicação das cepas. Algumas vezes os níveis mais altos de produção de bacteriocina por bactérias láticas são obtidos em valores de temperatura, fontes de nutrientes e pH inferiores aos ideais para sua multiplicação (TODOROV e DICKS, 2004).

Os resultados obtidos por este estudo indicam que as populações mais altas de *L. sakei* 2a foram obtidas nos modelos alimentares que continham extrato de levedura e extrato de carne (combinações 3 e 4) no final de 10 dias de armazenamento a 4° C. Extratos, em particular extrato de levedura, contêm aminoácidos livres, pequenos peptídeos (dois ou três aminoácidos) e proteínas hidrolisadas que são facilmente metabolizados pelas bactérias láticas levando à uma multiplicação intensa (CHEIGH *et al.*, 2002; AASEN *et al.*, 2000). No entanto, verificou-se que nas demais combinações do modelo alimentar, nas quais não havia extrato de levedura ou extrato de carne, a multiplicação de *L. sakei* 2a também foi boa, observando-se que após 10 dias em refrigeração a 4° C, a máxima diferença obtida nas contagens nos modelos com e sem extratos foi 0,51 $\Delta \log \text{ UFC.mL}^{-1}$. Embora essa diferença tenha sido estatisticamente significativa ($p < 0,05$), a sua importância do ponto de vista microbiológico é pequena. A produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a também não foi influenciada por nenhum dos ingredientes do modelo alimentar (extrato de carne, extrato de levedura, proteose peptona e amido de milho), pois a produção foi praticamente a mesma em todas as quatro combinações dos ingredientes do modelo alimentar. Com isto, é possível concluir que

nenhum dos ingredientes do modelo alimentar é indispensável para a multiplicação de *L. sakei* 2a bem como para a produção de suas bacteriocinas.

Foi possível constatar neste estudo que o aumento da população de *L. sakei* 2a não foi acompanhado de aumento da produção das bacteriocinas nas quatro combinações do modelo alimentar armazenado sob refrigeração. Fenômeno semelhante foi relatado por LI *et al.* (2002), que verificaram que concentrações mais elevadas de biomassa de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 não necessariamente resultavam em concentrações mais elevadas de nisina.

Vários estudos relatam que a multiplicação e a produção de bacteriocinas por bactérias lácticas dependem da cepa e do tipo e concentração da fonte de nitrogênio. Assim CHEIGH *et al.* (2002) observaram que a produção de bacteriocina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 em caldo M17 foi maior quando o meio foi suplementado com extrato de levedura (16384 UA.mL^{-1}). A atividade da bacteriocina nesse meio suplementado foi duas vezes maior do que a obtida com outras fontes de nitrogênio (extrato de carne, triptona, peptona, proteose peptona e outras). Avaliando a concentração ideal de extrato de levedura (0,5; 1; 2; 3; 4; 5%) para a produção de bacteriocina por esta cepa, os autores verificaram que a maior produção de bacteriocina (32768 UA.mL^{-1}) ocorreu em concentração igual ou superior a 3%, não havendo diferença na quantidade produzida nas concentrações de 4 e 5%.

GUERRA e PASTRANA (2002) observaram que a adição de extrato de levedura e bacto casitone estimulou a produção de bacteriocina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 e *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627, porém diminuiu a biossíntese da massa celular, sem alterar o valor do pH do meio. Este efeito positivo na produção das bacteriocinas foi relacionado ao aumento de minerais, vitaminas e aminoácidos como serina, cisteína e treonina, que agem como precursores na biossíntese da bacteriocina. Os autores notaram também que concentrações desses compostos acima de 0,1% inibiram a produção de nisina, provavelmente por um efeito “feedback” de inibição de sua biossíntese.

TODOROV e DICKS (2004) observaram que na presença de triptona, triptona mais extrato de carne e triptona mais extrato de levedura, após 20 h de incubação a 30°C , a cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR produziu

6400 UA.mL⁻¹ de bacteriocina, enquanto que na presença de extrato de carne mais extrato de levedura a produção foi mais baixa: 3200 UA.mL⁻¹. Resultados semelhantes foram relatados pelos mesmos autores em 2006, com as cepas *Lactobacillus plantarum* ST23LD e ST341LD (TODOROV e DICKS, 2006).

KIM *et al.* (2006) avaliaram a influência do extrato de carne, proteose peptona, triptona, extrato de levedura e “soytone” na multiplicação e produção de bacteriocina por *Micrococcus* sp. GO5 em caldo MRS modificado, observando que a multiplicação foi maior no meio contendo 1% de extrato de levedura, com maior produção de bacteriocina no meio contendo 0,5% de triptona e 1% de extrato de levedura.

5.2 Influência de 4% de NaCl e de 0,5% de glicose na multiplicação e na produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a em modelo alimentar armazenado a 4° C durante 10 dias

O presente trabalho demonstrou que a adição de 0,5% de glicose no modelo alimentar auxiliou a multiplicação de *L. sakei* 2a e a produção de suas bacteriocinas durante o armazenamento a 4° C por 10 dias. Os dados reportados na literatura indicam que a influência da fonte de carbono na produção de bacteriocina e multiplicação das bactérias lácticas parecem ser dependentes da concentração e do tipo da fonte de carbono adicionadas no meio e da cepa de bactéria láctica estudada. AASEN *et al.* (2000) reportaram que para *Lactobacillus sakei* CCUG 42687, uma concentração de glicose acima de 40 g.L⁻¹ reduziu a produção de bacteriocina. URSO *et al.* (2006) verificaram que para *Lactobacillus sakei* isolado de lingüiça, a multiplicação foi auxiliada pela adição de 0,5; 1 ou 1,5% de glicose e a produção de bacteriocina foi maior quando o meio foi adicionado de glicose mais sacarose (360 UA.mL⁻¹), enquanto que a adição de lactose reduziu a multiplicação e a produção de bacteriocina em 50%. TODOROV e DICKS (2004) relataram que para *Lactobacillus plantarum* ST34BR, a concentração de 15 g.L⁻¹ a 40 g.L⁻¹ de glicose estimulou a produção de bacteriocina, enquanto que em concentrações de 5 g.L⁻¹ ou menos não houve produção de bacteriocina. Esses autores

verificaram também que, para *Lactobacillus plantarum* ST341LD, a produção de bacteriocina podia ser regulada pela concentração de glicose no meio, onde níveis abaixo de 20 g.L⁻¹ e acima de 30 g.L⁻¹ interferiram negativamente na produção (TODOROV e DICKS, 2006). KIM *et al.* (2006) observaram que a produção de bacteriocina por *Micrococcus* sp. GO5 foi maior na presença de 2% de lactose ou sacarose (256 UA.mL⁻¹) do que 2% de glicose. Para *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, esses autores verificaram que a glicose foi preferencialmente metabolizada como fonte de energia para a sua multiplicação, quando comparada à maltose e frutose. Verificaram também que a produção de bacteriocina foi melhor na presença de dois ou três açúcares do que na presença de um dos açúcares isoladamente.

MORETRO *et al.* (2000) observaram que tanto a multiplicação de *Lactobacillus sakei* quanto a produção de sakacina P cessaram quando metade da glicose no meio foi consumida. Contudo, o consumo de glicose continuou até sua total depleção e a concentração de sakacina P começou a diminuir após alcançar o seu pico máximo.

Em relação a 4% de NaCl observou-se, neste estudo, que sua presença nos modelos alimentares estudados inibiu a multiplicação de *L. sakei* 2a e também a produção das bacteriocinas. Estes resultados estão de acordo com MORETRO *et al.* (2000), que observaram que a adição de 1%, 2% e 3% de NaCl reduziu a multiplicação e a produção de bacteriocina por *Lactobacillus sakei* incubado a 20° C. ALVES *et al.* (2003) verificaram que a produção de bacteriocina por *Lactobacillus sakei* 1 foi reduzida em um modelo de carne contendo de 4% de NaCl. Também VERLUYTEN *et al.* (2004) demonstraram que baixas concentrações de NaCl (2%) inibem a produção de bacteriocina por *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. DELGADO *et al.* (2007) observaram que a produção máxima de bacteriocina por *Lactobacillus plantarum* 17.2b requer temperatura e pH abaixo dos valores ótimos necessários para a multiplicação, assim como ausência de NaCl no meio de cultura.

De acordo com AASEN *et al.* (2000) o efeito do NaCl pode ser explicado pelo estresse osmótico causado pelo sal na célula bacteriana, que resulta em redução na capacidade de produção de bacteriocinas. O efeito do NaCl na multiplicação e bacteriocinogênese é menos intenso quando o microrganismo é

cultivado em temperatura inferior a ótima para sua multiplicação porque há uma diminuição do metabolismo celular e conseqüentemente um aumento na disponibilidade de aminoácidos e energia.

Alguns trabalhos sugerem que a influência do NaCl na produção de bacteriocina pode ser dependente da sua concentração, como demonstrado por DELGADO *et al.* (2005) que verificaram que um stress moderado causado por baixa concentração de NaCl ($0,65 \text{ mol.L}^{-1}$) e temperatura sub-ótima (22° C) auxiliaram a produção de bacteriocina por *Lactobacillus pentosus* B96. URSO *et al.* (2006) observaram que 2% de NaCl não interferiu na produção de sakacina P por *Lactobacillus sakei*, enquanto 3,5% de NaCl causou uma redução drástica na produção que foi completamente inibida a 5% de NaCl.

As bactérias láticas homofermentativas multiplicam-se melhor na presença de cloreto de sódio do que as bactérias láticas heterofermentativas (LEROY e DE VUYST, 1999; NEYSENS *et al.*, 2003). LEROY e DE VUYST (1999 b) observaram que o aumento da concentração de NaCl diminuiu a taxa de multiplicação de *Lactobacillus sakei* CTC 494, e a produção de sakacina K também foi mais baixa.

NILSEN *et al.* (1998) sugeriram que a produção de bacteriocina por algumas bactérias láticas pode ser induzida por componentes por elas produzidos (Figura 33). A regulação da transcrição dos genes da bacteriocina parece envolver três componentes: um fator de indução, uma proteína histidina-quinase transmembrana e uma proteína reguladora. Acredita-se que o fator de indução liga-se na proteína histidina-quinase transmembrana e ativa a fosforilação da proteína regulatória, a qual estimula a transcrição dos genes das bacteriocinas. Uma possível explicação para a inibição da produção de bacteriocina por NaCl é a sua interferência na ligação dos fatores de indução nos receptores da membrana celular (VERLUYTEN *et al.*, 2004). MORETO *et al.* (2000) relataram que o ajuste de pH com NaOH reduz a multiplicação e produção de sakacina P por *Lactobacillus sakei* CCUG 42687 possivelmente devido a um stress causado pelo íons sódio, o mesmo causado pela adição de NaCl.

Figura 33. Mecanismo de regulação da biossíntese de bacteriocina. (NASCIMENTO *et al.*, 2008; ENNHAHAR *et al.*, 2000)

Observou-se neste estudo que o efeito inibidor de 4% de NaCl na multiplicação de *L. sakei* 2a e na produção das bacteriocinas foi menos intenso que no modelo contendo também 0,5% de glicose, indicando que 0,5% de glicose auxilia na produção das bacteriocinas, mesmo na presença de 4% de NaCl. LEAL-SANCHEZ *et al.* (2002) também observaram que a produção de bacteriocina por *Lactobacillus plantarum* LPCO10 foi maior quando se empregou 2,3-2,5% de NaCl e 2% de glicose.

O paralelismo entre as curvas de multiplicação e de produção de bacteriocina para várias bactérias lácticas sugere que as bacteriocinas são metabolismo primário, conforme reportado para *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 (NEYSENS *et al.*, 2003; LEROY *et al.*, 2006), *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 (VAN DEN BERGHE *et al.*, 2006) e *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 (KOUAKOU *et al.*, 2008). No entanto, alguns estudos indicam que bacteriocinas são sintetizadas na fase estacionária da curva de multiplicação, o que caracteriza um metabolismo secundário, como para *Carnobacterium piscicola* 213 (KHOUTI e SIMON, 2004) e *Lactobacillus pentosus* B96 (DELGADO *et al.*, 2005). No presente estudo, também foi observada que os níveis mais altos de bacteriocinas de *L. sakei* 2a foram produzidas nos

modelos estudados em 5 dias a 4° C, quando os modelos foram adicionados de 0,5% de glicose. Na ausência de 0,5% de glicose e 4% de NaCl, a produção das bacteriocinas foi observada após maior tempo de armazenamento a 4° C (Tabela 11).

Existem evidências de que a produção de bacteriocina não depende somente da multiplicação da bactéria láctica, mas também de estímulos para sua síntese, gerados por pequeno stress ambiental, como por exemplo, concentração das fontes de nitrogênio e carbono, sal, valores de pH, etc. (DELGADO *et al.*, 2005).

A produção de bacteriocina é um mecanismo de defesa, no qual cepas bacteriocinogênicas têm vantagem sobre cepas não produtoras e sobre cepas sensíveis as bacteriocinas. Em ambientes rico em nutrientes para sua multiplicação ou na ausência de microbiota competitiva é de se esperar que a produção de bacteriocinas seja diminuída (VAN DEN BERGHE *et al.*, 2006)

Sabe-se que o valor do pH é importante para a multiplicação de bactérias lácticas e a produção de bacteriocina. Dependendo do pH, ocorre a adsorção da bacteriocina à célula bacteriana, ou a secreção para o meio, onde a degradação proteolítica pode afetar sua atividade (KIM *et al.*, 2006). Neste estudo, foi observado que a produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a foi maior nos modelos que continham 0,5% de glicose (formulações 3 e 4), nos quais o pH atingiu o valor 5, inferior ao atingido nos demais modelos. Resultados semelhantes foram obtidos por MATARAGAS *et al.* (2003) com *Leuconostoc mesenteroides* L124 e *Lactobacillus curvatus* L442 que apresentaram um valor ótimo de pH para a produção das bacteriocinas de 5,5.

A diminuição do pH resulta na diminuição das reações enzimáticas e conseqüentemente na redução da multiplicação microbiana, com um efeito positivo na síntese de bacteriocinas, devido ao aumento nas reservas de componentes essenciais, incluindo o ATP. Dessa forma, o aumento da produção de bacteriocina pode ser devido à uma melhor utilização de energia quando a multiplicação é reduzida (MATARAGAS *et al.*, 2003).

5.3 Influência de 4% de NaCl e de 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por *L. sakei* 2a presentes nos diferentes materiais adicionados ao modelo alimentar durante armazenamento a 4° C durante 10 dias

Assim como observado para a produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a, os modelos alimentares adicionados de 0,5% de glicose (formulações 3 e 4) foram os que apresentaram maior atividade antilisteria. Conclui-se que tanto a 0,5% de glicose quanto 4% de NaCl não interferem na atividade antilisteria, embora a produção das bacteriocinas tenha sido prejudicada na presença de 4% de NaCl. Um fator interessante é que nos modelos alimentares com 0,5% de glicose houve uma redução no valor do pH para 5, que aparentemente não interferiu na atividade antimicrobiana. BONNET e MONTVILLE (2005) observaram que *Listeria monocytogenes*, quando exposta a condições ácidas adquire resistência adaptativa, sendo este fenômeno denominado Resposta de Tolerância Ácida (RTA). Esses autores comprovaram que a RTA é responsável pela resistência cruzada de *L. monocytogenes* à nisina produzida por *Lactococcus lactis* em caldo M17G.

Durante o estudo da influência de 4% de NaCl ou de 0,5% de glicose na atividade antilisteria das bacteriocinas de *L. sakei* 2a presentes nos materiais estudados (sobrenadante concentrado livre de célula, extrato ácido neutralizado e extrato ácido semi-purificado em HPLC) adicionados ao modelo alimentar, verificou-se que em alguns casos, as diferenças nas populações foram estatisticamente significativas e superiores a $1 \Delta \log \text{UFC.mL}^{-1}$, e com importância do ponto de vista microbiológico. No entanto, estes resultados não foram uniformemente encontrados ao longo de 10 dias de armazenamento sob refrigeração. Nenhum dos ingredientes do modelo alimentar (proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido) influenciou na atividade das bacteriocinas presentes no extrato ácido neutralizado.

Alguns autores como GÄNZLE *et al.* (1999) verificaram que o NaCl pode auxiliar na atividade antimicrobiana. Esses autores observaram que a atividade da nisina, sakacina P e curvacina A contra *Escherichia coli* LTH1600 aumentou com o aumento da concentração de NaCl adicionado ao meio (0% a 6% de NaCl). Segundo esses autores, a adição de sal permitiu a penetração das

bacteriocinas pela parede externa das bactérias gram-negativas, atingindo a membrana citoplasmática. Quando essas bacteriocinas foram estudadas contra microrganismos gram-positivos (*Lactobacillus curvatus* e *Listeria innocua*), a atividade da curvacina A e sakacina P aumentou pela adição de NaCl, mas a atividade da nisina permaneceu inalterada. GARCÍA *et al.* (2004) observaram que NaCl, nas concentrações de 2, 4 e 6%, não interferiu na atividade da enterocina EJ97 produzida por *Enterococcus faecalis* EJ97 contra *L. monocytogenes* CECT 4032 em caldo BHI incubado a 37° C por 6 h.

Contudo, outros relatos demonstram que o NaCl têm um efeito negativo na atividade antimicrobiana das bacteriocinas. BOUTTEFROY *et al.* (2000) reportaram que a adição do NaCl à TSBYE influenciou na atividade antilisteria da curvacina 13. Na ausência de NaCl, a curvacina 13 apresentou uma rápida inibição do microrganismo. Contudo, na presença de 1% a 6% de NaCl no meio de cultura, a curvacina 13 apresentou uma redução na atividade antimicrobiana. Este efeito protetor pode ser devido à ligação dos íons sódio à camada fosfolipídica carregada negativamente da membrana citoplasmática. BOZIARIS e NYCHAS (2006) mostraram que a adição de uma concentração de 2,5 e 4,5% de NaCl em TSB gera um efeito protetor contra a inibição de *L. monocytogenes* por nisina. Estes autores também relataram que cátions monovalentes podem ligar-se ao fosfolipídio carregado negativamente da membrana citoplasmática, impedindo a adsorção da nisina à membrana.

6. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos pelo presente trabalho, podemos concluir que:

- Nenhum dos ingredientes do modelo alimentar avaliado (proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido) influenciou a multiplicação de *L. sakei* 2a ou a produção das bacteriocinas.
- A presença de 4% de NaCl no modelo alimentar inibiu a produção das bacteriocinas e interferiu negativamente na multiplicação de *L. sakei* 2a.
- A presença de 0,5% de glicose no modelo alimentar auxiliou na multiplicação e produção das bacteriocinas por *L. sakei* 2a, que foram influenciada negativamente pela presença de 4% de NaCl.
- Os ingredientes do modelo alimentar (proteose peptona, extrato de carne, extrato de levedura e amido) não influenciaram na atividade antimicrobiana do extrato ácido neutralizado.
- A presença de 0,5% de glicose e 4% de NaCl no modelo não teve interferência marcante ao longo de 10 dias em refrigeração, na atividade antimicrobiana das bacteriocinas presentes no sobrenadante concentrado livre de células da cultura de *L. sakei* 2a em caldo MRS, do extrato ácido neutralizado e do extrato ácido semi-purificado em HPLC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASEN, I.M.; MORETRO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; STORRO, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.159-166, 2000.

AASEN, I.M.; MARKUSSEN, S.; MORETRO, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.35-43, 2003.

ALVES, V.F.; LAVRADOR, M.A.; MARTINIS, E.C.P. Bacteriocin exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. **Journal of Food Safety**, v.23, p.201-217, 2003.

ANANOU, S.; GARRIGAB, M.; HUGASB, M.; MAQUEDAA, M.; MARTINEZ-BUENO, M.; GÁLVES, A.; VALDIVIA, E. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.179-190, 2005.

BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, v.57, p.13-17, 2001.

BONNET, M.; MONTVILLE, T.J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.237-242, 2005.

BOUTTEFROY, A.; LINDER, M.; MILLIÈRE, J.B. Predictive models of the combined effects of curvaticin 13, 4% de NaCl and pH on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.919-929, 2000.

BOZIARIS, I.S.; NYNCHAS, G.-J.E. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. **Food Microbiology**, v.23, p.779-784, 2006.

BOZIARIS, I.S.; SKANDAMIS, P.N.; ANASTASIADI, M.; NYNCHAS, G.-J.E. Effect of 4% de NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.796-805, 2007.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.483-499, 2008.

CASTRO, A.P. **Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicotróficas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina**. São Paulo, 2002. 100p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CHEIGH, C.I.; CHOI, H.J.; PARK, H.; KIM, S.B.; KOOK, M.C.; KIM, T.S.; HWANG, J.K.; PYUN, Y.R. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, v.95, p.225-235, 2002.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.82-100, 2003.

CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L.S.; HERNANDEZ, P.E.; NES, I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.7321-4330, 1997.

CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; FERNANDEZ, M.F.; HERMANDEZ, P.E. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, v.15, n.3, p.289-298, 1998.

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.

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

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.

DELGADO, A.; BRITO, D.; PERES, C.; NOÉ-ARROYO, F.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and 4% de NaCl concentration. **Food Microbiology**, v.22, p.521-528, 2005.

DELGADO, A.; LÓPEZ, F.N.A.; BRITO, D.; PERES, C.; FEVEREIRO, P.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of 4% de NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology**, v.130, p.193-201, 2007.

EIJSSINK, V.G.H.; AXELSSON, L.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; HOLO, H.; NES, I. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p.639-654, 2002.

ENNHAHAR, S.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, p.705-716, 1999.

ENNHAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.85-106, 2000.

FENLON, D.R., *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. eds. **Listeria, Listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.21-37.

FOEGEDING, P.M.; THOMAS, A.B.; PILKINGTON, D.H.; KLAENHAMMER, T.R. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.884-890, 1992.

GÄNZLE, M.G.; HERTEL, C.; VAN DER VOSSEN, J.M.B.M.; HAMMES, W.P. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. **International Journal of Food Microbiology**, v.48, p.21-35, 1999.

GARCERÁ, M.J.G.; ELFERINK, M.G.L.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. *In vitro* pore-forming activity of the lantibiotic nisin role of proton motive force and lipid composition. **European Journal of Biochemistry**, v.212, p.417-422, 1993.

GELINSKI, J.M.L.N. **Bacteriocina de *Lactobacillus sake* 2 a: potencial de aplicação em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de *Salmonella* de origem alimentar**. São Paulo, 2003. 89p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GUERRA, N.P.; PASTRANA, L. Nisin and pediocin production on mussel-processing waste supplemented with glucose and five nitrogen sources. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.114–118, 2002.

HAMPIKYAN, H.; UGUR, M. The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). **Meat Science**, v.76, p.327–332, 2007.

HUGAS, M.; PAGÉS, F.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.M. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. **Food Microbiology**, v.15, p.639-650, 1998.

KANG, D.H.; FUNG, D.Y.C. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1346-1349, 1999.

KATLA, T.; MORETRO, T.; AASEN, I.M.; HOLCK, A.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. **Food Microbiology**, v.18, p.431-439, 2001.

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

KHOUTI, Z.; SIMON, J.P. Carnocin KZ213 produced by *Carnobacterium piscicola* 213 is adsorbed onto cells during growth. Its biosynthesis is regulated by temperature, pH and medium composition. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.31, p.5-10, 2004.

KIM, M.H.; KONG, Y.J.; BAEK, H.; HYUN, H.H. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5. **Journal of Biotechnology**, v.121, p.54-61, 2006.

KOUAKOU, P.; GHALFI, H.; DESTAIN, J.; DUBOISDAUPHIN, R.; EVRARD, P.; THONART, P. Enhancing the antilisterial effect of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 in pork meat and cocultures by limiting bacteriocin degradation. **Meat Science**, v.80, p.640-648, 2008.

LEAL-SÁNCHEZ, M.V.; JIMÉNEZ-DÍA, R.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; RUIZ-BARBA, J.L. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4465-4471, 2002.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.974-981, 1999a.

LEROY, F.; DE VUYST, L. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5350-5356, 1999b.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. **International Journal Food Microbiology**, v.100, p.141-152, 2005.

LEROY, F.; DE WINTER, T.; ADRIANY, T.; NEYSENS, P.; DE VUYST, L. Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.102-111, 2006.

LI, C.; BAI, J.; CAI, Z.; OUYANG, F. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, v.93, p.27–34, 2002.

LISERRE, A.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Science**, v.61, p.449-455, 2002.

MARCO, F.; ALMELA, M.; NOLLA-SALAS, J.; COLL, P.; GASSER, J.; FERRER, M.D.; SIMON M. *In vitro* activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains in Barcelona – Spain. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.38, p.259-261, 2000.

MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus sakei* isolated from “lingüiça frescal”. **Revista de Microbiologia**, v.28, n.4, p.284-287, 1997.

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

MARTINIS, E.C.P.; 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.

MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**, v.14, p.197-200, 2003.

MATARAGAS, M.; METAXOPOULOU, J.; GAILOLOTO, M.; DROSINOS, E.H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, v.64, p.265–271, 2003.

MORETRO, T.; AASEN, I.M.; STORRO, I.; AXELSSON, L. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.536–545, 2000.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, p.120-127, 2008.

NES, I.F.; HOLO, H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. **Biopolymers: Peptide Science**, v.55, p.50-61, 2000.

NEYSENS, P.; MESSENS, W.; DE VUYST, L. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.29-39, 2003.

NILSEN, T.; NES, I.F.; HOLO, H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1848–1854, 1998.

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

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.12, p.276-284, 2001.

ROSA, C.M.; FRANCO, B.D.G.M.; MONTVILLE, T.J.; CHIKINDAS, M.L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolated, *Lactobacillus sakei* 2a. **Journal of Food Safety**, v.22, p.39-54, 2002.

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

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, 305-316, 2004.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiological Research**, v.161, p.102-108, 2006.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; CANTONI, C.; COMI, G.; COCOLIN, L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.232-239, 2006.

VAN DEN BERGHE, E.; DE WINTER, T.; DE VUYST, L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.159-170, 2006.

VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T.; CHIKINDAS, M.L. Isolation, purification and partial characterization of plataricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.1131-1137, 1998.

VERHEUL, A.; RUSSELL, N.J.; HOF, R.V.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.9, p.3451-3457, 1997.

VERLUYTEN, J.; LEROY, F.; DE VUYST, L. Influence of complex nutrient source on growth of and Curvacin A production by sausage isolate

Lactobacillus curvatus LTH 1174. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.5081–5088, 2004.

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

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v.415, p.389-395, 2002.

ANEXO

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9131 - 5720851/2 - Matheus de Souza Barbosa

Email: bio2204@usp.br
Data de Nascimento: 27/09/1982
Cédula de Identidade: RG - 33.034.693-64 - SP
Local Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Licenciado em Ciências Biológicas - Centro Universitário
Fundação Santo André - São Paulo - Brasil - 2003

Curso: Mestrado em Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data da Matrícula: 25/08/2006
Início da Contagem de Prazo: 25/08/2006
Data Limite: 25/02/2009
Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco -
25/08/2006 a -- E.Mail: bfranco@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 14/06/2007
Exame de Qualificação: Aprovado em 22/08/2008
Data do Depósito do Trabalho:
Data máxima para aprovação da Banca:
Título do Trabalho:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Ocorrência: Última matrícula em 24/07/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred .	Fre q.	Conc .	Exc .	Sit. Matric.
FBT5705-1	Tecnologia de produtos lácteos funcionais	09/11/2006	20/12/2006	90	0	0.00	-	N	Turma cancelada
HEP5732-9	Bioestatística I	06/03/2007	10/04/2007	30	0	0.00	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5892-4	Processos Deteriorantes de Alimentos pelo Desenvolvimento de Microrganismos	14/03/2007	24/04/2007	60	4	100.00	B	N	Concluída

FBA5870-5	Seminários em Ciência dos Alimentos e Nutrição	03/04/2007	12/06/2007	30	2	100.00	A	N	Concluída
FBA5886-5	Microorganismos Patogênicos em Alimentos I	16/04/2007	27/05/2007	90	6	100.00	B	N	Concluída
HEP5750-3	Bioestatística II	17/04/2007	29/05/2007	45	0	0.00	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5898-5	Bacteriocinas e suas Aplicações em Alimentos	07/05/2007	27/05/2007	45	3	100.00	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA-0404 Análise Microbiológica de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/08/2007	30/11/2007	-	3	0.00	-	-	-
BMM5829-1	Estudo do envoltório celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	22/10/2007	03/12/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	06/11/2007	04/12/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBT5729-5	Liofilização e suas Aplicações a Alimentos e à Medicamentos	26/03/2008	27/05/2008	90	6	100.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	32
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		32

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

Conceito até 31/12/1996:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito;
D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J -
Abandono Justificado; T - Transferência.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito;
R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.

Situação em: 16/01/2009 13:13