

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

Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra

Danielle Nader Furtado

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Furtado, Danielle Nader

F992i Isolamento de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo frescal de leite de cabra / Danielle Nader Furtado. -- São Paulo, 2010.

87p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Bacteriocinas : Microbiologia de alimentos I. T. II.
Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

664.07 CDD

Danielle Nader Furtado

Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo frescal de leite de cabra

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
orientadora/presidente

Prof. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis
1º. examinadora

Dra. Alcina Maria Liserre
2º. examinadora

São Paulo, 04 de março de 2010.

Aos meus pais, Valdir e Sílvia, com muito amor e gratidão, pela presença e incansável apoio durante a elaboração desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por todo cuidado.

À Prof. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco pela orientação, amizade, dedicação e oportunidade de aprendizado.

Ao pesquisador Dr. Svetoslav Dimitrov Todorov pelo auxílio e orientação na realização dos experimentos deste trabalho.

Às Professoras Dra. Maria Teresa Destro e Dra. Mariza Landgraf pelo ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais, Valdir e Sílvia, que nunca mediram esforços para que eu fosse adiante, sempre presentes e me apoiando em todos os momentos de minha vida e principalmente durante a realização deste trabalho.

À minha tia Sonia Maria Nader, pelo apoio, carinho, amizade e atenção.

À minha tia e madrinha Venilda, pelo incentivo, carinho e presença nos principais momentos de minha vida.

Aos meus irmãos João Fábio e Juliana, por estarem sempre ao meu lado, apoiando em todos os momentos.

Aos queridos amigos Matheus, Graciela, Anderson, Maria Crystina, Janaina, Priscila, Monika, Ângela, André e Vanessa pela amizade, momentos de descontração e por toda ajuda prestada na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos: Adriana, Ana, Cecília, Denise, Eb, Flávia, Gabriela, Hans, Joyce, Kátia Leani, Kátia Lima, Keila, Lina, Lúcia,

Mayra, Marildes, Tatiana, Verena e Vinicius, pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

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

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela concessão de bolsa de estudos e apoio financeiro para desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

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

Muito Obrigada!

RESUMO

FURTADO, D.N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo frescal de leite de cabra.** 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Listeria monocytogenes é uma bactéria que causa a listeriose, uma doença zoonótica grave que se manifesta através de infecções do sistema nervoso central (meningite, encefalite e meningoencefalite), bacteremia primária e septicemia. A doença apresenta baixa morbidade e alta mortalidade e acomete, principalmente, grupos de risco, como mulheres grávidas, neonatos, indivíduos imunocomprometidos e idosos. *L. monocytogenes* tem sido encontrada com frequência em alimentos *in natura* e/ou processados, como queijos e outros produtos lácteos. Esse estudo objetivou isolar bactérias lácticas a partir de leite de cabra, capazes de produzir peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas), identificar estas cepas, caracterizar as bacteriocinas produzidas e avaliar o seu potencial de aplicação no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* em queijo de cabra durante armazenamento a 8-10°C. Trabalhando-se com leite de cabra cru, foi possível isolar seis cepas produtoras de bacteriocinas (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi). Através de testes fenotípicos apropriados e sequenciamento do 16S rRNA, essas cepas foram identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi e DF5Mi), *Leuconostoc lactis* (DF6Mi) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (DF60Mi). A caracterização físico-química e biológica das bacteriocinas produzidas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi indicou que estas eram resistentes ao calor e extremos de pH, mas apresentavam características diferentes em relação ao espectro de ação, sensibilidade a agentes químicos, adsorção à células-alvo e lise das células de *L. monocytogenes*. O efeito do pH, temperatura e composição do meio de cultura na produção das bacteriocinas foi também cepa-dependente. A cepa DF4Mi apresentou melhor atividade antimicrobiana e foi selecionada para o estudo de inibição de *L. monocytogenes* em queijos. Para isso, foram preparados lotes de queijo frescal feitos com leite de cabra pasteurizado adicionados ou não da cepa DF4Mi (10^6 UFC/mL), experimentalmente contaminados com *L. monocytogenes* (10^3 UFC/g), além dos controles positivo (queijo adicionado de nisina 12,5 mg/Kg) e negativo (leite adicionado de uma cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* não bacteriocinogênica). Observou-se que a cepa DF4Mi apresentou efeito bacteriostático no queijo, sendo capaz de inibir a multiplicação do patógeno durante o armazenamento a 8-10°C por 10 dias. No entanto, inibição semelhante foi obtida nos queijos com a bactéria láctica não bacteriocinogênica *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis+cremoris*) R704 (Chr. Hansen), indicando que a inibição não pode ser creditada às bacteriocinas. Nos queijos-controlados com nisina, foi observada uma redução de 2 log na contagem de *L. monocytogenes* após 10 dias a 8-10°C. Já nos queijos preparados sem nisina e sem nenhuma bactéria láctica, os níveis de *L. monocytogenes* atingiram níveis elevados (10^6 UFC/g) após 10 dias de armazenamento a 8-10°C. Os resultados demonstraram que houve maior eficácia na aplicação da nisina em queijos frescal de leite de cabra para o controle da multiplicação de *L. monocytogenes* quando comparados com a aplicação da cepa bacteriocinogênica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF4Mi.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, bactérias lácticas, bacteriocinas, queijo frescal de leite de cabra.

ABSTRACT

FURTADO, D.N. **Isolation of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and their application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese.** 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Listeria monocytogenes is a bacteria that causes listeriosis, a serious zoonotic disease that is manifested through infections in the central nervous system (meningitis, encephalitis and meningoencephalitis), bacteremia and septicemia. The disease presents low morbidity and high mortality and affects mainly those in the risk group, such as pregnant women, neonates, immunocompromised individuals and the elderly. *L. monocytogenes* has been frequently detected in *in natura* and processed foods. Like cheeses and other dairy products. This study aimed to isolate lactic acid bacteria capable of producing antimicrobial compounds from goat milk, identify the isolates, characterize the bacteriocins and evaluate their potential application in controlling the growth of *L. monocytogenes* in goat cheese during storage at 8-10°C. Six bacteriocinogenic strains (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi) were successfully isolated from raw goat milk. Using appropriate phenotypic tests and 16S rRNA sequencing, these strains were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi e DF5Mi), *Leuconostoc lactis* (DF6Mi) and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (DF60Mi). The physico-chemical and biological characterization of the bacteriocins produced by the strains DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi indicated that they were resistant to heat and pH extremes, but presented different spectrum of activity, sensitivity to chemicals, adsorption to target cells and lysis of *L. monocytogenes*. The effect of pH, temperature and culture media composition in bacteriocin production was also strain-dependent. The strain DF4Mi presented the best antimicrobial activity and was selected for the studies on inhibition of *L. monocytogenes* in cheese. Frescal cheese was manufactured with pasteurized goat milk added of a culture of DF4Mi (10^6 CFU/mL), and experimentally contaminated with *L. monocytogenes* (10^3 CFU/g). Control cheeses were also prepared: those added of 12.5 mg/Kg nisin (positive control) and those added of a non-bacteriocinogenic *L. lactis* subsp. *lactis* strain. The strain presented a bacteriostatic effect, controlling the growth of the pathogen for 10 days at 8-10°C. However, a similar effect was observed in the cheeses prepared with the non-bacteriocinogenic strain *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis+cremoris*) R704 (Chr. Hansen), indicating that the inhibition cannot be credited to bacteriocins. In the cheeses containing nisin, a 2 log reduction in the counts of *L. monocytogenes* was achieved after 10 days at 8-10°C. In the cheeses with no added nisin or lactic acid bacteria, levels of *L. monocytogenes* after 10 days at 8-10°C were high (10^6 CFU/g). The results showed greater effectiveness in the application of nisin in fresh goat cheese to control the growth of *L. monocytogenes* when compared with the application of the bacteriocinogenic strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF4Mi.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, lactic acid bacteria, bacteriocins, goat cheese.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Microrganismos indicadores utilizados para o teste de avaliação do espectro de ação dos sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas, isoladas de leite de cabra cru	39
TABELA 2. Formulação do caldo MRS comercial (Difco).....	44
TABELA 3. Espectro de ação das cepas de bactérias lácticas DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi, DF60Mi.....	56
TABELA 4. Influência do pH inicial do meio de cultura na produção de bacteriocinas pelas cepas <i>L. lactis subsp. lactis</i> DF4Mi, <i>Leuconostoc lactis</i> DF6Mi e <i>L. paracasei subsp. paracasei</i> DF60Mi em caldo MRS.....	60
TABELA 5. Influência dos componentes do caldo MRS na atividade das bacteriocinas produzidas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi.....	63
TABELA 6. Adsorção da bacteriocina produzida por <i>L. lactis subsp. lactis</i> DF4Mi à diferentes células alvo.....	66
TABELA 7. Efeito da temperatura e pH na adsorção da bacteriocina produzida por <i>L. lactis subsp. lactis</i> DF4Mi à <i>L. monocytogenes</i> 711.....	67
TABELA 8. Efeito de agentes químicos na adsorção da bacteriocina produzida por <i>L. lactis subsp. lactis</i> DF4Mi à <i>L. monocytogenes</i> 711.....	70
TABELA 9. Contagens microbianas no leite de cabra após a pasteurização lenta do leite (63°C durante 30 minutos).....	70
TABELA 10. Enumeração de <i>L. monocytogenes</i> em queijos submetidos a diferentes tratamentos e mantidos a 8-10°C durante 10 dias.....	75
TABELA 11. Enumeração das bactérias lácticas em queijos submetidos a diferentes tratamentos e mantidos a 8-10°C durante 10 dias.....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do preparo dos queijos utilizados nos experimentos de co-inoculação.....	49
FIGURA 2. Efeito da adição do sobrenadante das culturas bacteriocinogênicas <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DF4Mi (3.200 UA/mL), <i>L. lactis</i> DF6Mi (800 UA/mL) e <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DF60Mi (800 UA/mL) na multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> 711.....	65
FIGURA 3. Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott em queijos de cabra frescal submetidos a diferentes condições de tratamento.....	71
FIGURA 4. Enumeração de bactérias lácticas em queijos de cabra frescal submetidos a diferentes condições de tratamento.....	72

SUMÁRIO

1. OBJETIVOS	12
2. INTRODUÇÃO	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Bactérias láticas	16
3.1.1 Classificação e identificação das bactérias láticas	17
3.1.2 Bacteriocinas e atividade antagonística de bactérias láticas.....	19
3.1.3. Classificação e mecanismo de ação das bacteriocinas.....	20
3.1.4 Detecção de cepas produtoras de bacteriocinas	22
3.1.5 Aplicação de bacteriocinas e bactérias láticas em alimentos	24
3.2 Controle de microrganismos patogênicos em derivados de leite	26
3.3 <i>Listeria monocytogenes</i> e características da listeriose.....	28
3.4 Leite de cabra e seus derivados	30
3.5 A caprinocultura no Brasil	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Matéria-prima	34
4.2 Isolamento de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas a partir de leite de cabra cru	34
4.3 Teste de antagonismo “spot-on-the-lawn”	36
4.4 Avaliação da sensibilidade das substâncias antagonísticas a proteases.....	36
4.5 Avaliação da produção de bacteriocinas a 8-10°C	37
4.6 Avaliação do espectro de atividade dos sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas	37
4.7 Avaliação da influência do pH, temperatura e agentes químicos na atividade das bacteriocinas	40
4.8 Identificação das cepas bacteriocinogênicas.....	40
4.9 Quantificação das bacteriocinas nos sobrenadantes das culturas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi....	41
4.10 Avaliação da produção de bacteriocinas em meios de cultura de diferentes composições e pH inicial pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi.....	42
4.11 Avaliação da influência da composição do meio de cultura na produção de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi.....	43
4.12 Avaliação da lise do microrganismo indicador pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi.....	45
4.13 Avaliação da adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi às células alvo	45
4.14 Avaliação da influência do pH e da temperatura na adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi à células de <i>L. monocytogenes</i> 711	46
4.15 Avaliação da influência de compostos orgânicos e sais inorgânicos na adsorção das bacteriocinas produzidas cepa DF4Mi à células de <i>L. monocytogenes</i> 711.....	47
4.16 Avaliação da atividade das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi em queijo frescal de leite de cabra experimentalmente contaminado com <i>Listeria monocytogenes</i>	48

4.16.1 Preparo do queijo de cabra frescal	48
4.16.2 Preparo dos inóculos.....	50
4.16.3 Inoculação dos queijos.....	50
4.16.4 Enumeração das culturas nos queijos preparados.....	51
4.16.5 Monitoramento do pH dos queijos	52
4.17 Manutenção das culturas bacterianas	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de leite de cabra cru	54
5.2 Sensibilidade das substâncias antagonísticas a proteases	54
5.3 Teste para produção de bacteriocinas a 8-10°C	54
5.4 Espectro de atividade dos sobrenadantes das culturas	55
5.5 Influência do pH, temperatura e agentes químicos na atividade das bacteriocinas	57
5.6 Identificação das cepas bacteriocinogênicas.....	58
5.7 Avaliação da produção de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi em meios de cultura de diferentes composições e pH inicial.....	58
5.8 Avaliação da influência da composição do meio de cultura na produção de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi.....	61
5.9 Avaliação da lise do microrganismo indicador pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi.....	64
5.10 Avaliação da adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi às células alvo	65
5.11 Avaliação da influência do pH e da temperatura na adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi à células de <i>L. monocytogenes</i> 711	66
5.12 Avaliação da influência de compostos orgânicos e sais inorgânicos na adsorção das bacteriocinas produzidas cepa DF4Mi à células de <i>L. monocytogenes</i> 711	68
5.13 Avaliação da atividade das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi em queijo frescal de leite de cabra experimentalmente contaminado com <i>Listeria monocytogenes</i>	69
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. OBJETIVOS

Visando a utilização de cepas de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas como bioconservantes em queijos de cabra e considerando que a aplicação de bacteriocinas em alimentos tende ser mais eficiente quando as cepas produtoras são isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Isolar, a partir de leite de cabra, bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas capazes de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*;
2. Identificar as cepas produtoras de bacteriocinas;
3. Caracterizar as bacteriocinas produzidas quanto às suas propriedades físico-químicas e biológicas;
4. Selecionar uma das cepas produtoras de bacteriocinas e verificar sua ação bioconservante frente a *L. monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra experimentalmente contaminado (10^3 UFC/g), durante o armazenamento em refrigeração por até 10 dias;
5. Verificar a ação da nisina (12,5mg/Kg) na inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra, durante o armazenamento a 8-10°C por até 10 dias.

2. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico conhecido pelos microbiologistas desde 1926, quando E.G.D. Murray identificou essa bactéria como o agente etiológico de septicemia em cobaias na cidade de Cambridge, Inglaterra. Os primeiros casos de listeriose humana foram registrados na Dinamarca em 1929 (COSSART, 2007).

Durante muitos anos, isolados clínicos de *L. monocytogenes* em humanos eram raramente obtidos e sua epidemiologia permaneceu desconhecida. No final da década de 70, o número de casos de listeriose relatados começou a aumentar e, a partir de 1983, foi registrada uma série de surtos de listeriose humana na América do Norte, na Europa e no Japão estabelecendo-se como uma infecção importante transmitida por este microrganismo através dos alimentos (DREVETS; BRONZE, 2008; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Os principais reservatórios de *L. monocytogenes* incluem tanto o homem como os animais e o ambiente. A contaminação de alimentos com essa bactéria representa um problema sério para saúde, devido à capacidade desse patógeno se multiplicar em temperatura de refrigeração, além de tolerar uma ampla faixa de pH e de concentração de cloreto de sódio (ADRIÃO et al., 2008; GANDHI; CHIKINDAS, 2007; RYAN; HILL; GAHAN, 2008).

L. monocytogenes é uma bactéria disseminada no ambiente rural, sendo, conseqüentemente, responsável pela contaminação do alimento cru, utilizado como matéria-prima para a fabricação de alimentos processados, assim como da própria indústria (REBAGLIATI et al., 2009). Esta bactéria tem sido detectada em alimentos em diversos países, podendo ser encontrada em leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, aves, peixes, embutidos, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de refeições preparadas para consumo imediato (FRANCO; LANDGRAF, 2008; LIANOU; SOFOS, 2007).

Nos animais ruminantes, a listeriose é causada pela ingestão da silagem contaminada e de má qualidade, com pH acima de 5,5, que favorece a multiplicação de *L. monocytogenes*. Outras fontes de contaminação incluem o solo e as fezes ou o leite de animais portadores. Desta forma, a grande distribuição de *L. monocytogenes* na natureza em associação com o ambiente doméstico torna quase inevitável sua presença em leite cru (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009; RISSI et al, 2006).

No Brasil, existem registros da presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados (ABRAHÃO et al., 2008; BORGES et al, 2003; BRANCO et al., 2003; BRITO et al., 2008; RAMOS; COSTA 2003; SILVA et al.,1998). Dentre eles, Silva et al. (2003), pesquisando a contaminação por *Listeria* spp. nos pontos críticos de controle da produção de queijo Minas Frescal em laticínios na Bahia, encontraram *Listeria* spp. em 50% de amostras de leite cru, das quais 8,3% eram *L. monocytogenes*.

Apesar da ocorrência freqüente de *L. monocytogenes* em alimentos no Brasil, há poucos relatos de surtos de listeriose e casos isolados da doença em diversos estados (DE SÁ et al., 2004; HOFER; REIS; HOFER, 2006; HOFER; RIBEIRO; FEITOSA, 2000; TOYOSHIMA et al., 2006). A razão para ausência de dados relativos à listeriose humana no Brasil é o fato da notificação da doença não ser compulsória no país (CARMO et al., 2005).

Com a finalidade de prevenir infecções de origem alimentar por *L. monocytogenes* é necessário que haja um controle de higiene rigoroso no local de processamento de leite e derivados, bem como é fundamental que sejam pesquisadas alternativas tecnológicas para impedir a multiplicação de listérias nesses produtos, visto que evitar a contaminação é muito difícil, se não impossível. A utilização de bactérias lácticas e/ou seus produtos metabólicos como conservadores desses alimentos pode oferecer uma alternativa interessante (GÁLVEZ et al., 2008).

Embora diversos aditivos químicos sejam utilizados como conservantes em produtos alimentícios, há uma crescente valorização dos alimentos naturais por

parte dos consumidores, que buscam cada vez mais benefícios para a saúde através do consumo de alimentos nutritivos, minimamente processados e menos artificiais (DEEGAN et al., 2006; GÁLVEZ et al., 2007; GÁLVEZ et al., 2008).

As bacteriocinas têm sido muito estudadas devido as suas aplicações como conservadores naturais nos alimentos, sendo que centenas de bacteriocinas de bactérias láticas já foram identificadas (GÁLVEZ et al., 2008). A aplicação de bacteriocinas em alimentos tende ser mais eficiente quando as cepas produtoras são isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las (COTTER; HILL; ROSS, 2005; De MARTINIS et al., 2002).

Frente a essa realidade, o presente estudo visou isolar, a partir de leite de cabra, bactérias láticas capazes de inibir *L. monocytogenes* pela produção e ação de bacteriocinas, bem como caracterizar parcialmente a substância antimicrobiana envolvida em tal atividade e realizar testes de inibição do patógeno a partir da inoculação da cultura bacteriocinogênica em queijos de cabra tipo frescal experimentalmente contaminados com *L. monocytogenes*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas representam um grupo de diversos microrganismos presentes em habitats ricos em nutrientes como os alimentos, particularmente, produtos lácteos, carnes e vegetais, sendo também constituintes normais da microbiota da boca, intestino e vagina de mamíferos. Devido a sua capacidade de produzir compostos aromáticos, as bactérias lácticas são bastante utilizadas na fabricação de vários alimentos e bebidas, com sua aplicação como culturas *starters* nos derivados de leite, como queijos de diversos tipos, iogurtes, manteiga e leite fermentado, entre outros produtos, conferindo a esses produtos características sensoriais únicas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; PFEILER; KLAENHAMMER, 2007; SCHROETER; KLAENHAMMER, 2009).

As bactérias lácticas formam um grupo de microrganismos com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. No entanto, não existe uma definição única do termo “bactéria láctica”. A definição mais encontrada é aquela que diz que essas bactérias são Gram positivas, não esporuladas, catalase negativas, desprovidas de citocromos, anaeróbias, aerotolerantes, fastidiosas, ácido tolerantes, e com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto da fermentação de carboidratos (AXELSSON, 2004; CARR; CHILL; MAIDA, 2002; PFEILER; KLAENHAMMER, 2007).

A classificação das bactérias lácticas tem sido objeto de controvérsias, mas historicamente, os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* formam a base desse grupo de bactérias (AXELSSON, 2004). De acordo com a classificação baseada nas características fisiológicas e no estudo do genoma dessas bactérias, revisões taxonômicas revelam que poderiam existir cerca de 20 gêneros de bactérias lácticas. No entanto, do ponto de vista da atuação das bactérias lácticas em tecnologia de alimentos, os principais representantes desse grupo incluem os gêneros: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*,

Lactococcus, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Desemzia*, *Isobacillum*, *Paralactobacillus*, *Trichococcus*, *Weissella* e *Melissococcus* (AXELSSON, 2004; CARR; CHILL; MAIDA, 2002; MOHANIA et al., 2008).

A classificação das bactérias lácticas em diferentes gêneros é baseada na morfologia, modo de fermentação da glicose, multiplicação em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido, capacidade de multiplicação em altas concentrações salinas e tolerância a condições ácidas e básicas. Para alguns gêneros, características adicionais como composição dos ácidos graxos e motilidade foram utilizadas na classificação. Além disso, a taxonomia atual das bactérias lácticas também leva em conta a relação filogenética entre os diferentes microrganismos desse grupo, elucidada através do seqüenciamento do RNA ribossômico (AXELSSON, 2004; HOLZAPFEL, 2001).

As bactérias lácticas apresentam duas principais vias de fermentação de carboidratos: glicólise, que resulta quase exclusivamente na formação de ácido láctico (fermentação homoláctica) e a via do 6-fosfogluconato/ fosfocetolase, que resulta em quantidades significativas de outros produtos, tais como etanol, acetato e dióxido de carbono, além de ácido láctico (fermentação heteroláctica) (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Para o isolamento e manutenção de bactérias lácticas, o uso do meio de cultura ágar ou caldo MRS tem sido cada vez mais utilizado devido a sua capacidade de manter adequadamente uma grande variedade de espécies de bactérias desse grupo. A sigla MRS deriva originalmente da fórmula desenvolvida pelos pesquisadores de Man, Rogosa e Sharpe em 1960 (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

3.1.1 Classificação e identificação das bactérias lácticas

A crescente descrição de novos gêneros e espécies no grupo das bactérias lácticas tornou a realização de testes clássicos para classificação e identificação

dessas bactérias extremamente trabalhosa. No entanto, metodologias que detectam as características fenotípicas dessas bactérias ainda servem como ponto de partida para realização de testes mais sofisticados. Sendo assim, de acordo com a análise morfológica, as bactérias láticas podem ser divididas em bacilos (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos ou coco-bacilos (todos os outros gêneros), com exceção do gênero *Weissella*, descrito recentemente, que é o primeiro gênero do grupo das bactérias láticas que pode se apresentar tanto na forma de cocos como de bacilos. Além disso, a divisão celular em dois planos, levando à formação de tétrades, é utilizada como característica principal na diferenciação de cocos. Os gêneros que formam tétrades são *Pediococcus* e *Tetragenococcus* (AXELSSON, 2004).

O modo de fermentação da glicose sob condições padronizadas (concentração não limitante de glicose e de fatores de crescimento e disponibilidade limitada de oxigênio) é uma característica importante para a diferenciação dos gêneros das bactérias láticas. Com base nesta característica, as bactérias láticas podem ser divididas em homofermentativas (convertem glicose quase totalmente em ácido lático) e heterofermentativas (fermentam glicose a ácido lático, etanol/ácido acético e dióxido de carbono) (AXELSSON, 2004; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

A multiplicação em certas temperaturas é uma característica importante para diferenciar alguns cocos, assim como a tolerância ao sal e a condições ácidas também é utilizada na classificação de bactérias láticas (AXELSSON, 2004; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

A formação de diferentes formas isoméricas durante a fermentação da glicose pode ser utilizada para distinção entre leuconostocs e a maioria dos lactobacilos heterofermentativos, pois os primeiros produzem apenas D-ácido lático e os últimos uma mistura racêmica (DL-ácido lático) (AXELSSON, 2004; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

A diferenciação dos gêneros e espécies das bactérias láticas está se tornando cada vez mais dependente de métodos de análises mais sensíveis,

como aqueles baseados em caracterização genética, empregados de forma crescente visando a melhor classificação desse grupo de bactérias (AXELSSON, 2004; MOHANIA et al., 2008).

3.1.2 Bacteriocinas e atividade antagonística de bactérias lácticas

As bactérias lácticas são capazes de produzir uma série de substâncias antimicrobianas incluindo ácido lático, peróxido de hidrogênio, diacetil e outros ácidos orgânicos. Além desses produtos finais resultantes do metabolismo, algumas cepas de bactérias lácticas também são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de origem protéica, denominados bacteriocinas (DEEGAN et al., 2006; GÁLVEZ et al., 2008; TOPISIROVIC et al., 2006). De um modo simplificado, as bacteriocinas podem ser definidas como pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, ativos contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER; HILL; ROSS, 2005). As bacteriocinas variam em relação ao espectro de atividade (restrito ou amplo espectro), modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (EIJSSINK *et al.*, 2002; GÁLVEZ et al., 2008; ZASLOFF, 2002).

Os primeiros relatos a respeito da inibição de outros microrganismos por essas substâncias surgiram há 80 anos, quando foi inicialmente observada atividade antagonística produzida por cepas de *Escherichia coli* devido a sua capacidade de sintetizar colicinas. Somente em 1951 foi proposto o uso de bacteriocinas como conservantes nos alimentos. Os trabalhos com colicinas foram importantes pois permitiram o desenvolvimento dos métodos básicos atualmente utilizados para detecção e isolamento de outras classes de bacteriocinas (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A nomenclatura para bacteriocinas é contraditória e ainda está em discussão. Algumas bacteriocinas recebem nomes com base em suas espécies bacterianas produtoras, mas mesmo essa nomenclatura dá origem a contradições.

Às vezes, os nomes dos gêneros (completos ou não) são utilizados como raízes dos nomes, outras vezes são usados como os nomes das espécies. Por exemplo, as bacteriocinas produzidas por *Listeria* têm sido designadas por listeriocinas e monocinas (COTTER; HILL; ROSS, 2005; De MARTINIS, 1997; JACK; TAGG; RAY, 1995).

3.1.3. Classificação e mecanismo de ação das bacteriocinas

Diversas classificações foram propostas para as bacteriocinas, no entanto, de acordo com a mais recente (HENG et al., 2007), as bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas dividem-se em quatro classes, de acordo com a estrutura química e função biológica: Classe I: peptídeos lantibióticos, Classe II: peptídeos não-lantibióticos de peso molecular inferior a 10kDa, Classe III: peptídeos não-lantibióticos de peso molecular superior a 10kDa e Classe IV: proteínas cíclicas.

(a) Bacteriocinas de Classe I (Lantibióticos). Os lantibióticos podem ser divididos em dois subgrupos (subclasse Ia e Ib) de acordo com sua estrutura e modo de ação. A subclasse Ia é composta por peptídeos mais compridos, flexíveis e carregados positivamente que atuam na membrana plasmática da bactéria alvo através da formação de poros ocasionando o efluxo de metabólitos, íons e/ou a diminuição da concentração intracelular de ATP. Por lado, a subclasse Ib é caracterizada por peptídeos esféricos, rígidos e neutros ou carregados negativamente que atuam nas reações enzimáticas essenciais de bactérias sensíveis. Contudo, recentemente, foi demonstrado que a nisina possui ambos os mecanismos de ação (HENG et al., 2007).

Embora a atuação do lantibiótico na membrana bacteriana não tenha sido elucidada completamente, sabe-se que lipídeo II da membrana celular bacteriana participa da ligação da bacteriocina à bactéria. Esta molécula de lipídeo é o principal transportador de subunidades de peptidoglicanos do citoplasma para a parede celular. Além disso, ela também promove o processo de inserção da

bacteriocina na membrana da célula, dando início a formação de poros. Assim, a ligação da nisina ao lipídeo II facilita este mecanismo de ação duplo envolvendo tanto a prevenção da síntese de peptidoglicanos quanto a formação de poros na célula bacteriana (COTTER; HILL E ROSS, 2005).

(b) Bacteriocinas de Classe II. Em geral, os peptídeos dessa classe possuem uma estrutura helicoidal anfifílica que permite sua inserção na membrana da célula alvo, seguida pela despolarização da membrana e morte celular através da formação de poros. Nesse grupo de bacteriocinas também há uma divisão proposta para dois tipos de bacteriocinas: a subclasse IIa, composta por peptídeos semelhantes à pediocina, como a pediocina PA1, que contém a região N-terminal YGNGVXCXXXCXV e a subclasse IIb, que é composta de bacteriocinas contendo dois componentes para sua atividade bacteriana (HENG et al., 2007).

(c) Bacteriocinas de Classe III (Bacteriolisinas). Essas proteínas líticas possuem um tipo de estrutura complexa composta por vários domínios, os quais possuem funções específicas para translocação, ligação ao receptor e atividade letal. Apenas quatro bacteriolisinas foram caracterizadas até o momento. Entretanto, outras moléculas desse grupo e de interesse para os microbiologistas de alimentos têm sido identificadas. O mecanismo de ação dessas proteínas ocorre através da hidrólise das membranas celulares de bactérias sensíveis. Essas moléculas também possuem uma estrutura modular composta por um domínio N-terminal homólogo às peptidases e um C-terminal que provavelmente compõem o sítio de ligação dessa proteína na parede bacteriana alvo (HENG et al., 2007).

(d) Bacteriocinas de Classe IV. A classe IV inclui peptídeos inibitórios circulares, cujo principal modelo é a enterocina AS-48 (HENG et al., 2007).

3.1.4 Detecção de cepas produtoras de bacteriocinas

A detecção de cepas produtoras de bacteriocinas baseia-se na determinação da atividade antimicrobiana frente a um microrganismo-alvo, feita em placas com meio de cultura sólido onde se cultiva o microrganismo em teste e posteriormente se adiciona uma cultura sensível, observando-se a formação de halos de inibição após incubação em tempo e temperatura apropriados (MÜLLER et al., 2009). Outros testes incluem aqueles baseados em medidas de diferenças na turbidez de uma cultura indicadora quando cultivada na presença de diferentes concentrações da bacteriocina (PAPAGIANNI et al., 2006), na liberação de material celular que absorve luz ultravioleta (GIRAFFA; NEVIANI; VERONI, 1990), na capacidade dos sobreviventes provocarem a redução (mudança de cor) de um corante indicador (GIRAFFA; NEVIANI; VERONI, 1990) ou ainda, medidas de alteração na condutância de um meio de cultura (GIRAFFA; NEVIANI; VERONI, 1990).

A inibição observada nesses testes também pode ser devida à produção de ácido, peróxido de hidrogênio ou outros inibidores não específicos. A própria competição por nutrientes entre os microrganismos testados e a inibição decorrente da presença de bacteriófagos líticos também podem ser causas da inibição (PAPAGIANNI et al., 2006; VESTERLUND et al., 2004). Todos estes inibidores devem ser testados antes de se concluir que uma inibição observada é devida à ação de bacteriocinas e descartados caso não seja devido às mesmas (MONTVILLE; WINKOWSKI, 1997).

É importante considerar que a inibição detectada nesses ensaios pode ser bactericida ou bacteriostática. Para determinar exatamente o tipo de atividade, é necessário realizar a contagem de células viáveis (MÜLLER et al., 2009).

Para a seleção de uma linhagem produtora de bacteriocina, é importante que a capacidade inibitória seja testada em diferentes meios de cultura e condições de crescimento visto que as condições ótimas de cultura não necessariamente coincidem com as de máxima produção de uma dada

bacteriocina. Além disso, a composição do meio pode afetar a sensibilidade da linhagem indicadora (JACK; TAGG; RAY, 1995; TODOROV; DICKS, 2004).

A formação de halos de inibição pode ser avaliada utilizando diferentes métodos: inoculação e inversão do ágar (“flip-streak”), inoculação na superfície de placa com a cultura indicadora (“spot-on-the-lawn”) e o de difusão em poços (“well diffusion assay”) (LEWUS; MONTVILLE, 1991).

No método de inoculação e inversão do ágar, a bactéria produtora de bacteriocina é estriada em um meio de cultura, incubada e o organismo sensível à bacteriocina é estriado perpendicularmente no lado inverso do ágar. Para o método “spot-on-the-lawn”, a cultura produtora de bacteriocina é semeada como um ponto sobre o meio de cultura contendo ágar e uma sobrecamada inoculada com um microrganismo indicador sensível é semeada sobre a colônia resultante. Já no método de difusão em poços, os sobrenadantes de culturas produtoras de bacteriocinas são adicionados em orifícios cortados em um ágar previamente semeado com um microrganismo sensível. Segundo Lewis e Montville (1991), o método de difusão em poços apresenta um grande número de resultados falso-negativos e quando comparado com o método “spot-on-the-lawn” e o método “flip-streak” é mais trabalhoso.

Para a exclusão da inibição devida à produção de ácidos nesses ensaios, deve-se utilizar um meio de cultura sem glicose ou outro açúcar fermentável. O meio mais utilizado é ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura. Já para reduzir a inibição causada pela produção de peróxido de hidrogênio deve-se incubar em anaerobiose (LEWUS; KAISER, MONTVILLE, 1991).

Todorov e Dicks (2004) realizaram uma triagem de cepas produtoras de bacteriocinas a partir de cerveja de cevada artesanal africana usando o método da camada tripla, que se mostrou mais simples e mais eficiente que os métodos “flip-streak”, “spot-on-the-lawn” e “well diffusion assay”. Neste método, as diluições do material do qual se deseja isolar as cepas são semeadas por profundidade (“pour-plate”) em meio ágar MRS, o qual recebe uma camada extra do mesmo meio,

propiciando um ambiente microaerófilo. Após incubação de 48 horas, as placas quem contém até 50 colônias são adicionadas de uma camada de meio ágar BHI (ágar infusão-cérebro-coração) semi-sólido contendo o microrganismo indicador. Após a incubação final em temperatura ótima para multiplicação do microrganismo indicador, isolam-se as colônias que apresentarem halos de inibição ao seu redor (TODOROV; DICKS, 2004).

3.1.5 Aplicação de bacteriocinas e bactérias lácticas em alimentos

As bacteriocinas podem ser utilizadas como agentes de bioconservação de alimentos de três maneiras (CHEN; HOVER, 2003; DEEGAN et al., 2006; GÁLVEZ et al, 2008):

- a) fermentação do alimento com bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas;
- b) adição das bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas ao alimento;
- c) adição de ingrediente fermentado por bactérias lácticas bacteriocinogênicas.

Atualmente, apenas a nisina (Nisaplin™), produzida por *Lactococcus lactis* e a pediocina PA-1/AcH (ALTA™ 2431), produzida por *Pediococcus acidilactici*, são ingredientes comerciais utilizados como bioconservantes nos alimentos (COTTER; HILL; ROSS, 2005; GÁLVEZ et al, 2007; GÁLVEZ et al, 2008).

A nisina foi a primeira bacteriocina a ser comercializada na Inglaterra em 1953 e, desde então, o uso está aprovado em 48 países, inclusive o Brasil (COTTER; HILL; ROSS, 2005). Ela foi reconhecida como aditivo alimentar pela Food and Agriculture Organization / World Health Organization (FAO/WHO) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/Kg de peso corpóreo. Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite e derivados lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

No Brasil, a nisina é aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso em queijos fundidos, preparados à base de queijos fundidos, queijos pasteurizados e requeijão, no limite máximo de 12,5 mg/Kg (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1996).

Além de prevenir a multiplicação de microrganismos patogênicos nos alimentos, as bacteriocinas também podem ser utilizadas para inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e/ou indesejáveis em diversos alimentos, bem como no controle do crescimento de outras bactérias lácticas não consideradas como culturas *starters* em queijos, mas presentes naturalmente nesse alimento (COTTER; HILL; ROSS, 2005; GÁLVEZ et al, 2008; GUINANE et. al, 2005; MARTINEZ-CUESTA, 1997).

Outra forma interessante de atuação das bacteriocinas é aumento da velocidade da proteólise e aceleração da maturação de diversos alimentos, decorrentes da lise de células bacterianas. Essa aplicação tem sido demonstrada na fabricação de queijos, onde pode ocorrer a liberação das enzimas intracelulares, acelerando maturação e melhorando as características organolépticas desses produtos (ÁVILA et al., 2005; BENECH et al, 2002; GARDE et al., 2006; MARTINEZ-CUESTA, 1997; O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2003).

Em relação à segurança, há geralmente um consenso quanto à ausência de patogenicidade das bactérias lácticas. Com exceção de algumas espécies de estreptococos e enterococos, as bactérias lácticas raramente são patogênicas para o homem e animais, havendo apenas relatos ocasionais de infecções causadas por estas bactérias. Por esta razão, a sua aplicação direta em alimentos deve ser criteriosamente avaliada e baseada em estudos clínicos e epidemiológicos, no sentido de definir quais cepas dessas bactérias podem realmente ser consideradas isentas de riscos para a saúde (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; GIRAFFA et al., 2003).

3.2 Controle de microrganismos patogênicos em derivados de leite

O leite constitui um excelente meio para a multiplicação de microrganismos devido à sua composição química e alta atividade de água. Assim, diversas espécies que compõem a microbiota bacteriana do leite são provenientes de fontes de contaminação tais como o canal do teto e a pele do animal durante a ordenha, os equipamentos utilizados no processamento, as embalagens utilizadas no acondicionamento, a água utilizada na higienização e o próprio ambiente (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SAMELIS et al., 2009).

Os microrganismos patogênicos presentes em alimentos derivados de leite podem ser provenientes do próprio animal e das más condições de higiene no processamento. A contaminação se dá através do homem, insetos, roedores, aves e outros animais que entrem em contato com o leite (BRITO et al., 2008; LEEDOM, 2006). Tal fato pode ser confirmado pela série de surtos de listeriose relacionados ao consumo de leite cru e queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado, registrados em diversos países (MCLAUCHLIN; GREENWOOD; PINI, 1990; DE BUYSER et al, 2001; MAKINO et al, 2005; ROSSI et al., 2008).

Do ponto de vista de segurança, queijo de cabra, assim como outros tipos de queijos podem conter uma série de microrganismos patogênicos, causadores de doenças no homem com destaque para *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (MORGAN et al, 2001). Ambos são microrganismos de difícil controle nas queijarias, já que *L. monocytogenes* é um contaminante ambiental que apresenta elevada resistência fisiológica, multiplicando-se bem em temperaturas de refrigeração, por sua característica psicrotrófica. *S. aureus*, por sua vez, pode ser proveniente do próprio leite quando ordenhado de animais com infecções no úbere, e pode ser ainda um contaminante decorrente de baixa qualidade higiênica durante o processamento (KABUKI et al, 2004; FEITOSA et al, 2003).

A pasteurização do leite, usada para eliminar microrganismos patogênicos e deteriorantes, não garante que produtos derivados estejam isentos de *L. monocytogenes*, devido a falhas durante esta etapa, bem como recontaminação

após a pasteurização (LEEDOM, 2006; SAMELIS et al., 2008). Relatos de surtos de listeriose causados pelo consumo de queijos fabricados com leite pasteurizado, fermentado e maturado, comprovam que mesmo quando esses produtos são preparados e conservados em condições adequadas, esse patógeno pode estar presente (MACDONALD et al, 2005).

O procedimento mais utilizado para limitar o crescimento microbiano em queijos é a conservação em baixa temperatura, mas sua utilização tem pouco efeito sobre os microrganismos psicrótrófos. Assim, uma alternativa interessante para prevenir a multiplicação desses microrganismos indesejáveis seria o emprego de bactérias lácticas produtoras de substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas, através do processo denominado bioconservação (DE MARTINIS; FREITAS, 2003).

Alguns estudos demonstram que cepas de diversas espécies de bactérias lácticas utilizadas como culturas “starters” na produção de queijos são capazes de produzir bacteriocinas “in situ” e podem ser utilizadas no controle de *L. monocytogenes*, assim como de outros patógenos (BAREFOOT; NETTLES, 1993; BENECH et al, 2002; GARDE et al., 2006; LOESSNER et al., 2003; O’SULLIVAN; N; ROSS; HILL, 2003).

Rodrigues et al. (2001) verificaram que durante todo o período de maturação (60 dias) de queijos produzidos com leite cru, houve inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* por *L. lactis subsp. cremoris* TAB 24, naturalmente presentes nestes produtos e produtoras de níveis altos de bacteriocinas.

Psoni et al. (2007) isolaram 40 cepas de *L. lactis* a partir de queijo de cabra “Batzos”, um queijo fabricado artesanalmente na Grécia utilizando-se como matéria-prima o leite cru, e verificaram a capacidade de inibição de 85% das cepas de *L. monocytogenes* (20% dos isolados), *S. aureus* (40%), *Bacillus cereus* (32,5%) e *Enterococcus faecalis* (5%) (PSONI et al., 2007).

Achemchem et al. (2005) isolaram cepas de *Enterococcus faecium* F58, presentes naturalmente em queijo de cabra artesanal típico do Marrocos, que

apresentaram atividade inibitória contra uma série de bactérias Gram positivas, as quais incluem: *L. monocytogenes* CECT 4032, *L. innocua* CECT 4030, *Staphylococcus aureus* CECT 828, *Bacillus cereus* LWL1 e *B. subtilis* DSM 6633.

Casla, Requena e Gómez (1996) isolaram cepas de bactérias lácticas bacteriocinogênicas do leite de cabra cru e queijos de cabra artesanais. Do total de 203 isolados de bactérias lácticas apenas duas cepas de *L. lactis*, uma cepa de *Enterococcus faecalis* e uma cepa de *Lactobacillus curvatus* apresentaram atividade inibitória contra vários microrganismos indicadores, mostrando-se produtoras de substância semelhante a bacteriocina. No entanto, apenas as substâncias inibitórias produzidas pelas cepas de *Lactobacillus curvatus* IFPL105 demonstraram estabilidade térmica a 121°C por 30 minutos, e sensibilidade às enzimas α -quimiotripsina, proteinase K e pancreatina. Estas cepas apresentaram espectro de ação contra *Clostridium sporogenes* C22/10, *C. tyrobutyricum* NCDO 1754, *L. monocytogenes*, *Bacillus subtilis* e outras espécies de bactérias lácticas, apresentando potencial de uso como culturas *starters* produtoras de bacteriocinas na fabricação de queijos de cabra (CASLA; REQUENA; GÓMEZ, 1996).

3.3 *Listeria monocytogenes* e características da listeriose

O gênero *Listeria* é composto por um grupo de bactérias Gram positivas em formato de cocos, ou cocobacilos, de tamanho 0,4 por 1 a 1,5 μm , que não possuem cápsulas, não formam esporos e apresentam motilidade por tombamento a 25°C. São catalase positivas, oxidase negativas e fermentam glicose com produção de ácido mas não de gás (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

O gênero *Listeria* inclui as espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi* (SALLEN et al., 1996). Apenas a espécie *L. monocytogenes* é patogênica para o homem e pode ser diferenciada das outras espécies de *Listeria* através de testes bioquímicos específicos e testes moleculares (HITCHINS, 1998, HAIN; STEINWEG; CHAKRABORTY, 2006).

A listeriose humana pode ser causada pela ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, sendo particularmente perigosa para gestantes, recém-nascidos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam o comprometimento do sistema imunológico. A taxa de mortalidade entre esses indivíduos infectados pode variar de 20 a 30%. Para indivíduos sadios a morte é rara. A dose infectante depende da patogenicidade e da virulência da cepa de *L. monocytogenes* envolvida na infecção, bem como do estado de saúde e fatores de risco do hospedeiro (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Em pessoas saudáveis, a listeriose pode se manifestar como doença leve, algumas vezes com sintomas de gripe, febre e/ou distúrbios gastrintestinais. Mulheres grávidas podem abortar, assim como transmitir a infecção ao feto, por via transplacentária ou durante o parto. As formas mais comuns de manifestação de listeriose, principalmente em recém-nascidos e idosos, são a meningite e a meningoencefalite. Entretanto, outras formas de listeriose podem ocorrer, tais como cutânea, septicêmica com faringite e mononucleose, oculogranular e pneumônica. As infecções podem ainda resultar em artrite, osteomielite, abscesso espinhal e cerebral, peritonite, colicistite e hepatite (SCHLECH, 2000).

Alguns sorotipos de *L. monocytogenes* são bastante invasivos, capazes de se multiplicar e sobreviver no interior de macrófagos e de outras células não fagocitárias, como fibroblastos, células epiteliais, hepatócitos, células endoteliais e vários tipos de células nervosas causando essa sintomatologia. Os fatores de virulência envolvidos no desenvolvimento de listeriose são: listeriolisina O (uma hemolisina), fosfolipases e a capacidade de polimerizar actina da célula hospedeira através da proteína ActA (permitindo a motilidade e conseqüente invasão de células adjacentes). Esses fatores de virulência são exclusivamente observados nas cepas patogênicas de *Listeria*, sendo que existem vários outros fatores envolvidos e que estão sob investigação (FREITAG; PORT; MINER, 2009).

3.4 Leite de cabra e seus derivados

O leite de cabra ocupa lugar de destaque dentre os alimentos de origem animal utilizados na alimentação humana por fornecer calorias e aminoácidos essenciais em proporções iguais ou superiores aos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (FURTADO, 1981).

Além do próprio leite, os derivados do leite de cabra, como iogurtes, queijos e manteiga, possuem grande importância do ponto de vista nutricional. Esses produtos revelam uma alternativa como substituição pelo leite de vaca e seus derivados na alimentação de indivíduos subnutridos ou que apresentam doenças gastrintestinais digestivas (HAENLEIN, 2004). Em alguns casos, podem também fazer parte da dieta de crianças alérgicas às proteínas do leite de vaca (INFANTE-PINA; TORMO-CARNICE; CONDE-ZANDUETA, 2003) e de pessoas idosas devido a fácil digestão e absorção pela mucosa intestinal (TOMOTAKE et al, 2006).

As propriedades físicas e sensoriais de queijos e outros derivados do leite dependem, entre outros fatores, da composição química do leite (LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003). Existem algumas características especiais que apresentam importância nos processos tecnológicos de fabricação dos derivados do leite de cabra, tais como:

a) os glóbulos de gordura do leite de cabra são menores do que os de leite de vaca, proporcionando desnate natural mais lento (ATTAIE; RICHTERT, 2000);

b) o leite de cabra possui, em geral, teor ligeiramente menor de proteínas do que o leite de vaca (em média 2,96% contra 3,27%), sendo que apresenta ainda uma menor quantidade de caseínas do que o leite de vaca (MORA-GUTIERREZ; KUMOSINSKI; FARREL, 1990) e uma maior quantidade de substâncias nitrogenadas não-proteicas (cerca de 0,27% contra 0,16% no leite de vaca) (PRATA et al, 1998), levando a um menor rendimento na fabricação de queijos;

c) o leite de cabra apresenta duas vezes mais ácidos graxos de cadeia curta do que o leite de vaca, o que explica o pronunciado sabor e aroma dos queijos de cabra (TORII et al, 2004);

d) o leite de cabra não possui β -caroteno, daí sua coloração branca (CHANDA, 1952);

e) o leite de cabra possui teor (1,35 g/l) de cálcio ligeiramente mais alto que o leite de vaca (1,25 g/l);

f) devido à sua composição protéica, as micelas do leite de cabra são menos hidratadas que as do leite de vaca. Esse fator, aliado ao maior teor de soroproteínas e de cálcio, conferem ao leite de cabra uma menor estabilidade térmica (VERDALET-GUZMAN, 1992; GAUCHERON, 2005).

A partir de 1970, surgiram inúmeras pesquisas sobre a composição do leite de cabra e seus derivados em diversos países, com o propósito de melhorar a qualidade e promover uma maior aceitação desses produtos no mercado (Bernard et al.,2009; HAENLEIN, 2004).

3.5 A caprinocultura no Brasil

A caprinocultura é uma atividade que vem se desenvolvendo muito nos últimos anos, especialmente em regiões em desenvolvimento, evidenciando a capacidade do caprino de se adaptar a condições adversas, justificando sua reputação de animal rústico (RIBEIRO, 1997).

A cabra foi o primeiro animal domesticado pelo homem capaz de produzir alimento, há cerca de dez mil anos e, conforme os diversos relatos históricos, sempre acompanhou a história da humanidade. Ainda hoje, a cabra tem um papel importante como fornecedora de alimentos e outros insumos, particularmente em países ou regiões em desenvolvimento. Existe uma variedade de produtos de origem caprina que podem ser explorados, tais como o leite, a carne, o couro, o pêlo e o esterco (RIBEIRO, 1997).

As raças domésticas atuais descendem provavelmente da *Capra aegagrus*, da Pérsia e Ásia Menor, *Capra falconeri*, do Himalaia, e *Capraprisca*, da bacia do Mediterrâneo (RIBEIRO, 1997).

As principais raças caprinas criadas no Brasil para a produção de leite são: saanen, alpina, alpina britânica, alpina americana, toggenburg, murciana e anglo-nubiana (RIBEIRO, 1997).

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Fundação IBGE, 2007), em 2007, a composição do rebanho brasileiro de caprinos foi estimada em 9.450.312 milhões de cabeças. Do efetivo de rebanhos nacional de caprinos, 91,36% estão na região Nordeste, 2,68% no Sudeste, 2,96% no Sul, 1,77% no Norte e 1,77% no Centro-Oeste (FUNDAÇÃO IBGE, 2007).

Observa-se que a região Nordeste do país detém a maior parte dos rebanhos, onde a maioria dos animais é criada em condições precárias, sendo exploradas apenas a carne e o leite. Por outro lado, existe no Centro-Sul e em algumas regiões do Nordeste uma caprinocultura mais organizada voltada para a produção de leite, onde se busca alta produtividade (RIBEIRO, 1997).

Os criadores brasileiros têm procurado exercer a atividade de forma mais profissional, preocupando-se em viabilizar economicamente suas criações através do aumento de eficiência na produção e comercialização do leite de cabra e seus derivados (RIBEIRO, 1997).

Na região Sudeste, os rebanhos de caprinos são direcionados para produtos com maior valor agregado, destacando-se atualmente na produção de queijos especiais. O enfoque da produção dá-se de maneira diferenciada em razão da proximidade com a cidade de São Paulo, que é o maior e mais exigente mercado consumidor do País. O segmento de leite e derivados, apresenta uma variedade de produtos diferenciados, já que o consumo de leite de cabra ainda é incipiente e, muitas vezes, utilizado na alimentação apenas de pessoas que apresentam alergia às proteínas do leite de vaca (NOGUEIRA; NOGUEIRA JUNIOR, 2005).

Segundo as estimativas da Food and Agriculture Organization (FAO, 2005), em 2005, o Brasil foi o 17º produtor mundial de leite de cabra.

Embora a caprinocultura no Brasil esteja em expansão, contando com o incentivo de governos estaduais e instituições de pesquisa, ainda verifica-se uma produção pequena, quando se compara o efetivo caprino brasileiro com o de outros países. Esta baixa produção está diretamente relacionada com a precariedade da tecnologia aplicada, aliada a não utilização de padrões de qualidade para os produtos caprinos, entre outros fatores (QUEIROGA; GUERRA; BISCONTINI; COSTA, 2003).

Tendo em vista essas questões, a expansão da caprinocultura leiteira, juntamente com a viabilização de produtos de qualidade, poderá resultar em um aumento da aceitabilidade do leite de cabra e seus derivados. Tal fato poderá proporcionar conseqüente ampliação da agroindústria regional, contribuindo, assim, para a melhoria do nível de vida e fixação do homem no meio rural e, sobretudo, influenciando positivamente na segurança alimentar e nutricional da população (QUEIROGA; GUERRA; BISCONTINI; COSTA, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

O leite de cabra utilizado nos experimentos foi adquirido diretamente de produtores de leite de cabra da raça Saanen, localizados na cidade de Ibiúna, SP.

Para o isolamento de bactérias lácticas, foram coletadas seis amostras de leite de animais diferentes, em garrafas de plástico esterilizadas e em condições assépticas. As amostras foram mantidas a 4-7°C, e levadas ao laboratório para análise em até 24 horas após a coleta.

Para os experimentos em queijos tipo frescal de leite de cabra, foram realizadas três coletas de 10 L de leite de cabra cru em dias diferentes.

4.2 Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de leite de cabra cru

A metodologia utilizada para isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de leite de cabra foi a de camada tripla, descrita por Todorov e Dicks (2004). Alíquotas de 25 mL da amostra de leite foram adicionadas a 225 mL de peptona bacteriológica 0,1% (p/v) e homogeneizadas em um homogeneizador de pistões (Stomacher, Seward Medical, Inglaterra) por 30 segundos. Em seguida, diluições decimais subseqüentes foram preparadas em peptona bacteriológica 0,1% e 1,0 mL de cada uma dessas diluições foi semeado por profundidade em meio de cultura ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Oxoid). Após a secagem da cultura sobre o ágar, as placas receberam uma camada extra de 5-6 mL de ágar MRS e foram incubadas em aerobiose a 30°C durante 48-72 horas. Após esse período de incubação, as placas que apresentaram até 50 colônias receberam uma sobrecamada contendo cerca de 5 mL de caldo infusão-cérebro-coração (BHI, Oxoid) contendo 0,8% de ágar (Oxoid) e 10^5 - 10^6 células/mL dos microrganismos indicadores *L. monocytogenes* Scott A

ou *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 (LEWUS; MONTVILLE, 1991). As placas inoculadas com *L. monocytogenes* foram incubadas a 37°C durante 18-24 horas e aquelas inoculadas com *L. sakei* ATCC 15521 foram incubadas a 30°C durante o mesmo período. As colônias que apresentaram zonas de inibição foram transferidas para tubos com caldo MRS (Difco), incubadas a 30°C por 24 h e, em seguida, estriadas em ágar MRS para purificação. Após a obtenção de uma cultura pura, foi realizado o teste de confirmação da atividade antimicrobiana.

Nos testes de produção de bacteriocinas, empregou-se como controle positivo uma cultura bacteriocinogênica de *Lactobacillus sakei* 2a, isolada de lingüiça frescal e pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (DE MARTINIS; FRANCO, 1998).

Os microrganismos isolados foram cultivados em ágar MRS por 24 horas a 30°C e submetidos à coloração de Gram e análise da morfologia. As observações foram realizadas em microscópio (Olympus) com objetiva 100x e ocular 10x.

As bactérias isoladas também foram submetidas ao teste de KOH, segundo Powers (1995). Uma quantidade visível da cultura em ágar MRS foi misturada a uma gota de solução KOH 3% (p/v) em uma lâmina de vidro, empregando-se uma alça de níquel estéril. A formação de uma suspensão viscosa, aderida à alça, era interpretado como resultado positivo, indicando tratar-se de uma cultura Gram negativa.

As culturas obtidas em caldo MRS foram submetidas ao teste de produção de catalase misturando-se 50 µL com 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e observando-se a produção de bolhas. A produção de bolhas indicava a presença de catalase.

Sessenta cepas que apresentaram resultados negativos para o teste da catalase e KOH e eram Gram positivas foram selecionadas, pois apresentaram características de bactérias láticas, e foram submetidas ao teste de antagonismo.

4.3 Teste de antagonismo “spot-on-the-lawn”

Para o teste de detecção da produção de bacteriocinas, foi seguido o procedimento descrito por De Martinis e Franco (1998) com algumas modificações. As culturas em teste, isoladas do leite de cabra, foram incubadas em caldo MRS a 30°C por 18-24 horas e centrifugadas a 10000 g por 10 min a 4°C. Após, os sobrenadantes das culturas foram aquecidos a 80°C durante 10 minutos. Com o objetivo de eliminar o efeito antimicrobiano do ácido láctico, o pH do sobrenadante das culturas foi ajustado para 6,0 com NaOH 1M estéril. Em seguida, 10 µL do sobrenadante de cada uma dessas culturas isoladas foram adicionados em um ponto no centro de placas de Petri contendo cerca de 20 mL de caldo infusão-cérebro-coração (BHI, Oxoid) suplementado com 0,8% de ágar (Oxoid) e contendo 10⁵-10⁶ células/mL dos microrganismos indicadores (*L. monocytogenes* Scott A ou *L. sakei* ATCC 15521). Após a secagem do sobrenadante, as placas inoculadas com *L. monocytogenes* foram incubadas a 37°C durante 18-24 horas e aquelas inoculadas com *L. sakei* ATCC 15521 foram incubadas a 30°C durante o mesmo período.

O teste de antagonismo foi realizado utilizando como controle positivo uma cultura bacteriocinogênica de *L. sakei* 2a, obtida em caldo MRS após incubação a 25°C durante 18-24 horas.

4.4 Avaliação da sensibilidade das substâncias antagonísticas a proteases

A natureza protéica das substâncias antagonísticas presentes nos sobrenadantes das 60 culturas com atividade antagonística foi confirmada através do método descrito por Todorov e Dicks (2006), utilizando-se *L. monocytogenes* Scott A ou *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como microrganismos indicadores. Os sobrenadantes foram tratados com α-quimiotripsina de pâncreas bovino tipo II (Sigma), protease de *Streptomyces griseus* tipo XIV (Sigma) e pepsina (Sigma) na concentração de 1,0 mg/mL. Após a adição das enzimas, os tubos contendo os sobrenadantes foram incubados a 30°C durante 2 horas. Em seguida, transferiu-

se 10 µL do sobrenadante tratado para um ponto no centro de placas de Petri contendo ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura – TSAYE (Oxoid). As placas foram então recobertas com 5 mL de caldo BHI (Oxoid) suplementado com 0,8% de ágar (Oxoid) e contendo 10^5 - 10^6 UFC/mL de uma das culturas de microrganismos indicadores citados anteriormente. As placas foram incubadas à 37°C durante 24 horas.

A destruição da substância antagonística devido à ação das enzimas proteolíticas era comprovada pela ausência de halo inibitório ao redor do ponto onde foi colocado o sobrenadante tratado e as substâncias foram consideradas bactérias lácticas.

O teste de sensibilidade das substâncias antagonísticas a proteases foi realizado utilizando como controle positivo uma cultura bacteriocinogênica de *L. sakei* 2a, obtida em caldo MRS após incubação a 25°C durante 18-24 horas.

4.5 Avaliação da produção de bacteriocinas a 8-10°C

Seis cepas (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi) que apresentaram sensibilidade às proteases foram inoculadas em tubos contendo caldo MRS e incubados a 8-10°C por dez dias, determinando-se a atividade inibitória dos sobrenadantes das culturas todos os dias até o décimo dia. Para realização do teste de antagonismo, foi utilizada a técnica “spot-on-the-lawn”, descrita no item 4.3. Os microrganismos indicadores utilizados para o teste de antagonismo foram *L. monocytogenes* Scott A ou *L. sakei* ATCC 15521.

4.6 Avaliação do espectro de atividade dos sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas

O espectro de atividade dos sobrenadantes das seis cepas de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas foi determinado através do teste “spot-on-the-lawn” conforme descrito no item 4.3, empregando-se os microrganismos testados

listados na TABELA 1. As temperaturas de incubação e os meios de cultura utilizados para o teste de antagonismo estão relatados na TABELA 1.

TABELA 1. Microrganismos indicadores utilizados para o teste de avaliação do espectro de ação dos sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas, isoladas de leite de cabra cru.

Microrganismos indicadores	Procedência	Meios de cultura / temperaturas de incubação
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
<i>L. monocytogenes</i> : Grupo sorológico 4b		
101	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
211	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
302	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
620	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
703	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
724	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
Grupo sorológico 1/2a		
103	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
104	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
106	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
409	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
506	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
709	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
Grupo sorológico 1/2b		
426	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
603	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
607	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
Grupo sorológico 1/2c		
408	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
422	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
637	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
711	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
712	LMA/FCF/USP*	BHI / 37°C
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	BHI / 37°C
<i>Lactobacillus. sakei</i>	ATCC 15521	MRS / 30°C
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	Rhodia	MRS / 30°C
<i>L. acidophilus</i> LaC4	Rhodia	MRS / 30°C
<i>L. acidophilus</i> La14	Rhodia	MRS / 30°C
<i>Lactobacillus. paracasei</i> LbC82	Rhodia	MRS / 30°C
<i>Lactococcus lactis</i> (sups. <i>lactis</i> + <i>cremoris</i>) R704	Chr.Hansen	MRS / 30°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	BHI / 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	BHI / 37°C
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 12755	MRS / 30°C
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	BHI / 37°C
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	BHI / 37°C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 4157	BHI / 37°C

*LMA/FCF/USP – Coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.7 Avaliação da influência do pH, temperatura e agentes químicos na atividade das bacteriocinas

A atividade dos sobrenadantes das seis cepas (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi) de bactérias lácticas em diferentes valores de pH e temperatura e na presença de agentes químicos foi testada de acordo com o método descrito por Todorov e Dicks (2006a). Desta forma, o pH dos sobrenadantes das culturas isoladas foi ajustado de 2.0 a 12.0 (com acréscimo de uma unidade) com NaOH 1M ou HCl 1M estéreis. Em seguida, os sobrenadantes foram submetidos ao teste de atividade “spot-on-the-lawn” após 30 min, 1h e 2h incubação a 30°C. Com o objetivo de testar a ação da temperatura na atividade das bacteriocinas, os sobrenadantes das seis cepas (pH 6.5) foram incubados a temperaturas de 30°C a 100°C, com intervalos de 10°C, e a 121°C. Após 20, 60 e 120 minutos de incubação, os sobrenadantes foram submetidos ao teste de atividade “spot-on-the-lawn”. A influência de agentes químicos na atividade das bacteriocinas foi testada através do tratamento dos sobrenadantes das culturas isoladas com Tween[®] 20 (Synth) 1% (v/v), Tween[®] 80 (Synth) 1% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) 1% (p/v), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma) 1% (p/v), tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (Sigma) 1% (p/v) e NaCl 1% (p/v) por 2 h a 30°C. Os sobrenadantes tratados foram submetidos ao teste de antagonismo “spot-on-the-lawn” como descrito anteriormente. Os testes de antagonismo foram realizados utilizando-se *L. monocytogenes* Scott A ou *L. sakei* ATCC 15521 como microrganismos indicadores. O experimento foi realizado em triplicata.

4.8 Identificação das cepas bacteriocinogênicas

A identificação inicial das seis cepas bactérias lácticas (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi) foi baseada em padrões de fermentação de 49

carboidratos, através do sistema API[®] 50 CHL (BioMérieux, França), com a utilização do serviço de dados API[®] Web para interpretação dos resultados.

As culturas previamente identificadas como bactérias lácticas foram confirmadas através do seqüenciamento do gene 16S do rRNA amplificado. Assim, de acordo com Felske et al. (1997), foram utilizados os *primers* universais 8f (5'-CAC GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC AG-3') e 1512r (5'-GTG AAG CTT ACG GYT AGC TTG TTA CGA CTT), em que Y e M indicam C+T e A+C, respectivamente. Os fragmentos amplificados foram seqüenciados utilizando-se o kit "DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing" para análise no MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema automatizado de seqüenciamento MegaBACE 1000. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com as seqüências depositadas na base de dados GenBank DNA utilizando-se o algoritmo BLAST (Felske et al., 1997).

Com base na identificação das cepas, as culturas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi foram selecionadas para os testes complementares por serem pertencentes à diferentes gêneros de bactérias lácticas. Estes testes incluíram quantificação e otimização da produção das bacteriocinas, avaliação do efeito da composição do meio de cultura na sua produção e teste de lise do microrganismo indicador. Apenas a cultura DF4Mi foi selecionada para o teste de adsorção de bacteriocinas às células produtoras.

4.9 Quantificação das bacteriocinas nos sobrenadantes das culturas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi

A quantificação das bacteriocinas nos sobrenadantes das culturas isoladas foi realizada utilizando a técnica da diluição crítica e o método "spot-on-the-lawn" (TODOROV; DICKS, 2005). As culturas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi, obtidas em caldo MRS incubado a 30°C durante 24 horas, foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes das culturas foram aquecidos a 80°C durante 10 minutos. Com o objetivo de eliminar o efeito antimicrobiano do ácido láctico, o pH

dos sobrenadantes foi ajustado para 6,0 com NaOH 1M estéril. A seguir, os sobrenadantes das culturas foram diluídos sucessivamente na proporção de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 em solução tampão fosfato de sódio 10mM a pH 6,5, utilizando-se placas de microtitulação. Ao final, 10 µL do sobrenadante de cada uma das diluições foram adicionados em um ponto sobre placas de Petri contendo cerca de 20 mL de caldo infusão-cérebro-coração (BHI, Oxoid) contendo 0,8% de ágar (Oxoid) e 10^5 - 10^6 UFC/mL do microrganismo indicador *L. monocytogenes* 711 (cepa pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - LMA/FCF/USP). As placas foram incubadas a 37 °C durante 18-24 horas.

Após 24 horas, as placas foram analisadas quanto à formação de halos de inibição. A atividade antimicrobiana foi expressa em unidades arbitrárias (UA/mL), calculada como " $a^b \times 100$ ", onde "a" representa o fator de diluição e "b" a última diluição capaz de produzir zonas de inibição de pelo menos 2mm de diâmetro. O título da bacteriocina na preparação original foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição. O experimento foi realizado em triplicata.

4.10 Avaliação da produção de bacteriocinas em meios de cultura de diferentes composições e pH inicial pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi

Seguindo a metodologia descrita em Todorov e Dicks (2004), uma cultura das cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi, obtida após 18 horas de incubação em caldo MRS a 30°C, foi inoculada (2% v/v) em caldo MRS (Difco), BHI (Oxoid) e em leite desnatado (10%, p/v, Molico), respectivamente, e incubada por 24 horas a 30°C, em ausência de agitação. A cada hora, foram retiradas alíquotas de 1 mL para observação da multiplicação desses microrganismos em função do tempo (DO.: 600nm) e para a verificação de alterações no pH das culturas. O teste de atividade dos sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas (AU/mL) também foi

realizado através do ensaio “spot-on-the-lawn”, como descrito no item 4.3. Utilizou-se *L. monocytogenes* 711 como microrganismo indicador.

O efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de bacteriocinas das cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi foi determinado de acordo com Todorov e Dicks (2004). Frascos contendo 300mL de caldo MRS foram preparados e ajustados para pHs 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 e 7.0, com HCl 6M ou NaOH 6M. Cada frasco foi inoculado com 2% (v/v) de cada uma das culturas obtidas após 18 horas de incubação a 30°C. As culturas foram incubadas a 30°C por 24 horas em ausência de agitação. Alterações no pH e a atividade dos sobrenadantes das culturas, foram determinados a cada hora. A atividade dos sobrenadantes foi expressa em AU/mL e todos os experimentos foram realizados em triplicada.

4.11 Avaliação da influência da composição do meio de cultura na produção de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi

Para esta avaliação, seguiu-se a metodologia descrita por Todorov e Dicks (2005b). Culturas de cada uma das cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi, obtidas após 18 horas de incubação em caldo MRS a 30°C, foram centrifugadas a 6.000 g por 10 min (centrífuga Hettich Mikro 22R) a 4°C e as células foram ressuspensas em 10 mL de peptona bacteriológica 0,1% estéril. Em seguida, transferiu-se 4 mL de cada suspensão celular para 200 mL dos seguintes meios:

- a) caldo MRS comercial (Difco) sem nenhuma suplementação (TABELA 2).
- b) caldo MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) formulado contendo as seguintes combinações como fonte proteica: somente triptona (10.0g/L); ou somente extrato de carne (10.0g/L); somente extrato de levedura (5.0g/L); somente triptona (10,0g/L) + extrato de carne (10,0g/L); triptona (10,0g/L) + extrato de levedura (5,0g/L); extrato de carne (10.0g/L) + extrato de levedura (5.0g/L); triptona (10.0g/L) + extrato de carne (10.0g/L) + extrato de levedura (5.0g/L);
- c) caldo MRS suplementado com glicose (5.0 a 50.0g/L);
- d) caldo MRS suplementado com lactose (5.0 a 50.0g/L);

- e) caldo MRS suplementado com galactose, manose, L-ramnose ou d-manitol (20.0g/L);
- f) caldo MRS suplementado com K_2HPO_4 (0 a 10.0g/L), e KH_2PO_4 (2.0 a 10.0g/L);
- g) caldo MRS suplementado com glicerol (2.0 a 20.0g/L);
- h) caldo MRS não adicionado de $MgSO_4$ (0,1g/L);
- i) caldo MRS não adicionado de $MnSO_4$ (0,05 g/L);
- j) caldo MRS suplementado com citrato de tri-amônio (2.0g/L);
- l) caldo MRS suplementado com acetato de sódio (3.0g/L);
- m) caldo MRS suplementado com Tween[®] 80 (1,0g/L).

TABELA 2. Composição do caldo MRS comercial (Difco).

Componentes Difco[®] <i>Lactobacilli</i> Caldo MRS	Concentrações
Peptona proteose N° 3	10,0 g/L
Extrato de carne	10,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Dextrose	20,0 g/L
Polisorbato 80 (Tween [®] 80)	1,0 g/L
Citrato de Amônio	2,0 g/L
Acetato de sódio	5,0 g/L
Sulfato de magnésio	0,1 g/L
Sulfato de manganês	0,05 g/L
Fosfato di-potássio	2,0 g/L

Todas as culturas foram incubadas a 30 °C durante 24 horas. Após incubação, a atividade do sobrenadante das culturas foi determinada como descrito no item 4.9. O experimento foi realizado em triplicata.

4.12 Avaliação da lise do microrganismo indicador pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi

Para esta avaliação, seguiu-se a metodologia descrita por Todorov e Dicks (2004). Para os testes, 20 mL dos sobrenadantes livres de células das culturas bacteriocinogênicas DF4Mi (3.200 UA/mL), DF6Mi (800 UA/mL) e DF60Mi (800 UA/mL) (pH 6.0) foram esterilizados por filtração (0.20 µm, Minisart®, Sartorius) e adicionados à 100 mL de uma cultura de *L. monocytogenes* 711 obtida em caldo BHI (Oxoid) incubado a 37°C por 3h, apresentando densidade óptica 0.1 – 0.2 em 600nm. A mistura foi incubada à 37 °C, efetuando-se leituras da densidade óptica em 600nm a cada hora, durante 12h.

Os sobrenadantes contendo as bacteriocinas também foram adicionados à cultura de *L. monocytogenes* 711 obtida em caldo BHI (Oxoid) incubado a 37°C por 18h.

O experimento foi realizado em triplicata.

4.13 Avaliação da adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi às células alvo

O teste de adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi à células alvo foi realizado de acordo com o método descrito por Yildirim; Avşar e Yildirim (2002). Culturas de *L. monocytogenes* 711, *Enterococcus faecium* ATCC 12755 e *L. sakei* ATCC 15521, obtidas em caldo BHI (*L. monocytogenes* 711) ou caldo MRS (*E. faecium* ATCC 12755 e *L. sakei* ATCC 15521) a 37 °C por 24 horas, foram centrifugadas a 6.000 g por 10 min (centrífuga Hettiich Mikro 22R) e as células foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 5mM estéril (pH 6.5) e ressuspensas no mesmo tampão, de forma a obter uma suspensão com densidade óptica igual a 600nm. O pH das suspensões foi ajustado para 6.5 com NaOH 0.1M estéril. Em seguida, cada suspensão celular foi misturada com o mesmo volume de sobrenadante da cultura bacteriocinogênica DF4Mi, incubando-

se a 37°C durante 1 hora. Após incubação, as suspensões foram centrifugadas a 6.000 g por 10 min a 4°C e a atividade dos sobrenadantes foi determinada como descrito no item 4.9.

A porcentagem de adsorção das bacteriocinas DF4Mi às células indicadoras foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ adsorção} = 100 - \frac{\text{UA} / \text{mL}_1}{\text{UA} / \text{mL}_0} \times 100$$

onde: UA/mL₁ refere-se à atividade da bacteriocina após o tratamento; UA/mL₀ refere-se à atividade original do sobrenadante contendo a bacteriocina (antes do tratamento).

O experimento foi realizado em triplicata.

4.14 Avaliação da influência do pH e da temperatura na adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711

A avaliação da influência do pH na adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi foi realizada de acordo com o método descrito por Yildirim; Avşar e Yildirim (2002). Uma cultura de *L. monocytogenes* 711, obtida em caldo BHI a 37 °C por 24 horas, foi centrifugada a 6.000 g por 10 min (centrífuga Hettich Mikro 22R). As células foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 5mM estéril (pH 6.5) e ressuspensas no mesmo tampão, de forma a obter uma suspensão com densidade óptica igual a 600nm. A suspensão foi fracionada em alíquotas de 1 mL e o pH foi ajustado para 4.0, 6.0, 8.0 e 10.0 com HCl 0.1M ou NaOH 0.1M estéril. Em seguida, cada suspensão celular foi misturada com o mesmo volume de sobrenadante da cultura bacteriocinogênica DF4Mi e incubada a 37°C durante 1 hora.

Para avaliar a influência da temperatura na adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi seguiu-se o mesmo tratamento citado acima para a obtenção da suspensão celular de *L. monocytogenes* 711. Em seguida, o pH da

suspensão celular foi ajustado para 7.0 com NaOH 0.1M estéril e alíquotas de 1 mL foram adicionadas à tubos contendo o mesmo volume de sobrenadante da cultura bacteriocinogênica DF4Mi. Os tubos foram incubados por 1 hora a 4, 25, 30 e 37 °C.

Após incubação, as suspensões foram centrifugadas a 6.000 g por 10 min a 4°C e a atividade dos sobrenadantes foi determinada como descrito no item 4.9. O experimento foi realizado em triplicata.

4.15 Avaliação da influência de compostos orgânicos e sais inorgânicos na adsorção das bacteriocinas produzidas cepa DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711

A avaliação da influência de compostos orgânicos e sais inorgânicos na adsorção das bacteriocinas produzidas cepa DF4Mi à células alvo foi realizado de acordo com o método descrito por Albano et al. (2007). Uma cultura de *L. monocytogenes* 711, obtida em caldo BHI a 37 °C por 24 horas, foi centrifugada a 6.000 g por 10 min (centrífuga Hettich Mikro 22R). As células foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 5mM estéril (pH 6.5) e ressuspensas no mesmo tampão, de forma a obter uma suspensão com densidade óptica igual a 600nm. Alíquotas de 1 mL da suspensão celular foram tratadas com 1% (p/v) de Tween® 80, NaCl, glicerol e SDS. O pH de todas as suspensões foi ajustado para 6.5 com NaOH 1M ou HCl 1M. Em seguida, o sobrenadante da cultura DF4Mi foi adicionado às células tratadas e a mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Após incubação, as suspensões foram centrifugadas (6.000 g, 10 min, 4°C) e a atividade dos sobrenadantes foi determinada como descrito no item 4.9. O experimento foi realizado em triplicata.

4.16 Avaliação da atividade das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi em queijo fresco de leite de cabra experimentalmente contaminado com *Listeria monocytogenes*

4.16.1 Preparo do queijo de cabra fresco

O queijo fresco de leite de cabra foi preparado de acordo com Scholz (1995). Para o preparo de 1 Kg de queijo foram empregados 10 L de leite de cabra cru, submetidos à pasteurização lenta (63°C por 30 minutos) e resfriados a 33-35°C. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de solução saturada de CaCl₂, 2,5 mL de ácido láctico concentrado a 85% (Chemco) e 9,0 mL de coalho bovino Bela Vista (Fábrica de Coalhos e Coagulantes Bela Vista Produtos Enzimáticos Indústria e Comércio Ltda.). Após 50 minutos, a massa foi cortada em cubos de cerca de 1,5 cm de aresta e foi realizada a mexedura, durante 30 minutos. Em seguida, realizou-se a etapa de salga da massa, com adição de 2% de sal (Cisne[®]), seguida de dessoragem e enformagem. Os queijos foram deixados em fôrmas plásticas perfuradas, previamente autoclavadas, durante 1 hora a 21°C. Em seguida, os queijos foram transferidos para sacos plásticos estéreis e armazenados sob refrigeração (8-10°C) em aerobiose.

O esquema seguido para esse estudo é mostrado na Figura 1.

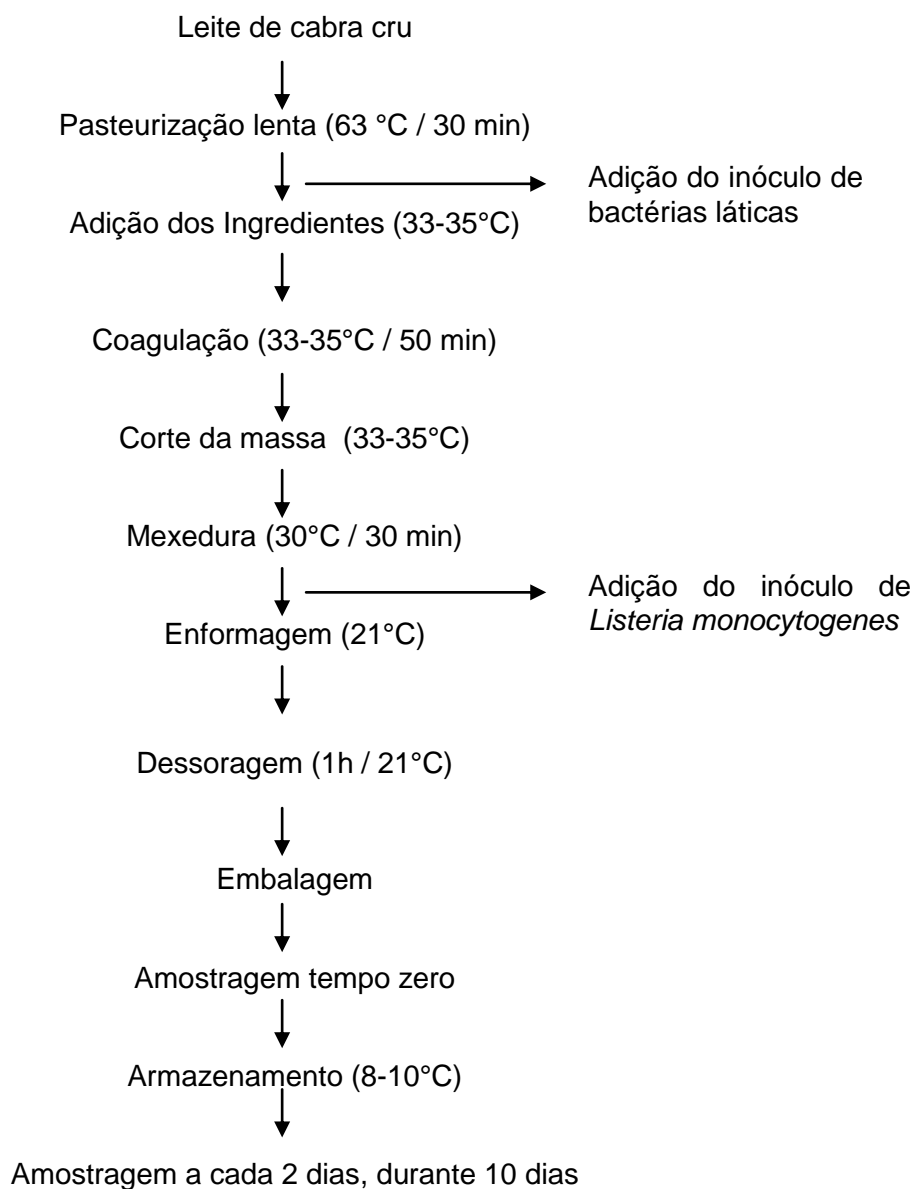


Figura 1. Representação esquemática do preparo dos queijos utilizados nos experimentos de co-inoculação.

4.16.2 Preparo dos inóculos

Com base nos resultados de atividade contra *L. monocytogenes*, a cepa DF4Mi, identificada como *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, foi escolhida para a avaliação da atividade antilisteria em queijo frescal de leite de cabra.

As culturas de *L. monocytogenes* Scott A e de *L. lactis* subsp *lactis* DF4Mi, obtidas em caldo TSB-YE e em caldo MRS, respectivamente, foram centrifugadas a 6.000 g por 10 min (centrífuga Hettich Mikro 22R) a 10°C. Após a remoção dos sobrenadantes, os sedimentos foram ressuspensos em solução salina 0,85% estéril, repetindo-se o processo mais duas vezes. Em seguida, as suspensões lavadas foram submetidas à diluição decimal seriada em solução salina estéril, transferindo-se 0,1 ml de cada diluição para a superfície de placas contendo TSA-YE para contagem de *L. monocytogenes* Scott A e em ágar MRS para contagem da bactéria láctica. As placas foram incubadas à 37°C por 24 horas, e, em seguida, foi realizada a contagem das colônias nas placas contendo de 25 a 250 colônias. O número de UFC/mL foi determinado multiplicando-se o resultado da contagem pelo inverso da diluição correspondente.

A diluição da cultura de *L. monocytogenes* Scott A que continha 10⁵ UFC/ml foi empregada como inóculo de contaminação no queijo de cabra frescal, assim como a diluição contendo 10⁶ UFC/ml da bactéria láctica isolada foi utilizada como inóculo do leite utilizado no preparo dos queijos.

4.16.3 Inoculação dos queijos

A cultura de *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi foi adicionada ao leite de cabra após a etapa da pasteurização, de forma a atingir a concentração de 10⁶ UFC/ml. A cultura de *L. monocytogenes* Scott A (1mL), preparada conforme descrito anteriormente (item 4.9.2), foi então adicionada a 100g da massa do queijo antes da etapa da enformagem, de forma a obter a concentração de 10³ UFC/g. Em seguida, a mistura foi realizada através de massagem manual durante 5 minutos.

Foram preparados os seguintes controles:

- a. queijo contendo somente *L. monocytogenes* Scott A, preparado com leite pasteurizado não inoculado com a cultura DF4Mi;
- b. queijo contendo *L. monocytogenes* Scott A e uma cepa da bactéria láctica não bacteriocinogênica *L. lactis* (sups. *lactis* + *cremoris*) R704 (Chr.Hansen);
- c. queijo contendo somente a cultura de *L. lactis* subsp *lactis* DF4Mi;
- d. queijo não adicionado de nenhuma cultura;
- e. queijo adicionado de 12,5mg/Kg de nisina (Sigma, cod. N5764).

A inoculação da massa e as etapas seguintes (salga na massa, dessoragem, enformagem e embalagem) foram realizadas em uma capela de fluxo laminar vertical, sendo a manipulação realizada com luvas cirúrgicas desinfetadas com etanol 70%.

A cada repetição do experimento, foram preparados seis queijos de 170g.

4.16.4 Enumeração das culturas nos queijos preparados

As análises microbiológicas dos queijos foram realizadas a cada dois dias. Uma porção de 25 g dos queijos preparados foi analisada imediatamente após a preparação, para a determinação do número de *L. monocytogenes* Scott A. Durante dez dias, uma porção de 25 g de cada um dos queijos foi submetida à contagem de *L. monocytogenes* Scott A. Os demais queijos foram armazenados a 8-10°C durante dez dias.

A enumeração de *L. monocytogenes* Scott A foi realizada através do método de Hartman, Hartman e Lanz (1975), com modificações. Para isso, sob condições assépticas, a porção de 25 g do queijo foi homogeneizada com peptona bacteriológica 0,1% (1:10) (Oxoid) empregando-se um stomacher (Seward Medical, Inglaterra). Em seguida, foram preparadas diluições decimais seriadas em peptona bacteriológica 0,1% e 1,0 mL de cada diluição foi semeado por profundidade em placas contendo cerca de 20 mL de TSA-YE (Oxoid). Após a

homogeneização e solidificação do meio, foi adicionada uma sobrecamada de 10 mL de meio para *Listeria* spp. (*Listeria* Selective Agar Base – Oxford Formulation, Oxoid) adicionado de suplemento seletivo (*Listeria* Selective Supplement, Oxoid) e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A contagem da bactéria láctica isolada foi feita em ágar MRS (Oxoid), incubado a 30°C por 24-48 horas.

Com o objetivo de avaliar a microbiota autóctone, foi realizada a enumeração de *Listeria* spp. em meio de cultura seletivo para *Listeria* spp. (*Listeria* Selective Agar Base – Oxford Formulation, Oxoid + *Listeria* Selective Supplement – Oxford Formulation, Oxoid) no leite de cabra após a etapa de pasteurização, assim como a enumeração de bactérias lácticas em ágar MRS (Oxoid) e mesófilos totais em ágar PCA (Plate Count Agar, Oxoid).

A microbiota presente após o preparo dos queijos e durante o tempo de armazenamento também foi enumerada em ágar PCA (Plate Count Agar, Oxoid) e incubada a 37°C por 24 horas.

Todos os experimentos tiveram três repetições genuínas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a avaliação da multiplicação de *L. monocytogenes* em função do tempo foi feita análise de regressão e as diferenças estatísticas foram detectadas através de análise de contraste ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico Assistat (Assistat – Assistência Estatística, Versão 7.5 beta, 2008).

4.16.5 Monitoramento do pH dos queijos

A cada tomada de amostra, mediu-se o pH do queijo utilizando-se um potenciômetro Digimed, modelo DMPH2. Desta forma, cerca de 3g de queijo foram retirados, colocados em um recipiente e macerado com auxílio de um bastão. A medição foi realizada inserindo o eletrodo no queijo macerado após a calibração adequada do potenciômetro.

4.17 Manutenção das culturas bacterianas

As bactérias lácticas foram mantidas em caldo MRS e as culturas de listeria foram mantidas em caldo triptona de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE, Oxoid). Quando necessário, as bactérias eram reativadas em caldo semelhante ao que se encontravam congeladas, exceto pela ausência de glicerol e após eram mantidas em ágar inclinado adequado (MRS, TSA adicionado de 0,6% de extrato de levedura) e mantidas sob refrigeração.

As culturas de bactérias lácticas isoladas e de *Listeria* spp foram mantidas a temperatura de -80°C em caldo adequado contendo 20% de glicerol (Synth).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de leite de cabra cru

No teste inicial para triagem de bactérias lácticas com atividade antimicrobiana a partir das amostras de leite de cabra estudadas, empregando-se o teste de camada tripla descrito por Todorov e Dicks (2004) foi possível obter 60 colônias com atividade contra *L. monocytogenes* Scott A e *L. sakei* ATCC 15521. O teste de antagonismo “spot-on-the-lawn” contra *L. monocytogenes* Scott A comprovou a atividade inibitória dos sobrenadantes de todas as 60 culturas.

Através dos ensaios preliminares de identificação, as 60 culturas foram Gram positivas, reação de KOH negativa e catalase negativas. Desta forma, foi possível classificá-las como bactérias lácticas.

5.2 Sensibilidade das substâncias antagonísticas a proteases

Do total de 60 culturas, os sobrenadantes de seis (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi) apresentaram atividade inibitória após o tratamento com enzimas proteolíticas. Este teste demonstrou que a inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* Scott A e de *L. sakei* ATCC 15521 foi consequência da ação de bacteriocinas presentes nestes sobrenadantes. Essas culturas foram selecionadas para testes adicionais.

5.3 Teste para a produção das bacteriocinas a 8-10°C

O método “spot-on-the-lawn” indicou que culturas DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi foram capazes de produzir bacteriocina após cinco dias de incubação em caldo MRS a 8–10°C, o que demonstra que tais cepas são promissoras para o controle de *L. monocytogenes* em alimentos refrigerados.

5.4 Espectro de atividade dos sobrenadantes das culturas

Em relação à inibição de patógenos importantes para área de alimentos, as bacteriocinas produzidas pelas cepas DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi foram capazes de inibir diferentes cepas de *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (TABELA 3).

TABELA 3. Espectro de ação das cepas de bactérias lácticas DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi, DF60Mi.

Microrganismos indicadores	Atividade dos sobrenadantes das culturas isoladas*					
	DF2Mi	DF3Mi	DF4Mi	DF5Mi	DF6Mi	DF60Mi
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	11	10	20	-	-	20
<i>L. monocytogenes</i> :						
Grupo sorológico 4b						
101	9	8	15	12	11	13
211	9	9	17	16	12	14
302	9	11	15	11	14	15
620	8	7	14	10	11	12
703	10	9	17	9	11	13
724	11	10	17	12	12	13
Grupo sorológico 1/2a						
103	9	-	15	10	13	14
104	12	11	19	12	13	15
106	8	7	15	9	12	12
409	8	7	21	11	12	14
506	10	10	20	10	12	14
709	10	10	15	13	12	15
Grupo sorológico 1/2b						
426	5	7	17	16	14	17
603	11	-	16	15	13	18
607	10	-	20	11	13	17
Grupo sorológico 1/2c						
408	-	10	20	15	15	16
422	9	7	17	8	13	15
637	9	5	15	14	12	13
711	10	10	20	-	16	18
712	7	-	20	7	11	12
<i>L. innocua</i>	10	10	-	10	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	20	20	18	20	10	13
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> LaC4	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> La14	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus. paracasei</i> LbC82	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> (sups. <i>lactis</i> + <i>cremoris</i>) R704	12	8	15	10	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10	10	10	10	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	7	8	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 12755	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 4157	-	-	-	-	-	-

*Diâmetro das zonas de inibição (mm);

- : zonas de inibição com diâmetro inferior a 2mm

Verificou-se que estas cepas não foram ativas contra cepas de bactérias lácticas de aplicação tecnológica, como *Lactobacillus acidophilus* La5, *L. acidophilus* LaC4, *L. acidophilus* La14 e *Lactobacillus. paracasei* LbC82, com exceção de *L. lactis* (subsp. *lactis* + *cremoris*) R704, que foi inibida pelas cepas DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi e DF5Mi. Da mesma forma, nenhuma das cepas testadas apresentou atividade contra *Enterococcus faecium* ATCC 12755, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 4157.

A cepa DF4Mi apresentou maiores halos de inibição contra a maioria dos sorotipos de listeria testados e por esta razão foi selecionada para os testes em queijos.

5.5 Influência do pH, temperatura e agentes químicos na atividade das bacteriocinas

Todos os sobrenadantes das seis culturas isoladas apresentaram capacidade de inibir *L. monocytogenes* após 2 horas de incubação em pH de 2,0 a 12,0 e em pH 6.5 após tratamento por 120 minutos a 100°C ou por 20 minutos a 121°C.

A resistência térmica das bacteriocinas produzidas pelas cepas isoladas de leite de cabra diferiu daquela reportada por outros autores para outras bacteriocinas. Um estudo realizado por Noonpakdee et al. (2003) revelou que a nisina, produzida por *Lactococcus lactis* WNC20, foi inativada após tratamento a 121°C por 15 min em pH 7.0, e permaneceu estável nesta temperatura quando tratada em pH 3.0. A bozacina B14, estudada por Ivanova et al. (2000), também perdeu a atividade antimicrobiana após tratamento a 90 - 121°C por 10 minutos.

Da mesma forma, todos os sobrenadantes apresentaram atividade antimicrobiana após 2 horas de incubação a 30°C com os agentes químicos Tween[®] 20 (Synth) 1% (v/v), Tween[®] 80 (Synth) 1% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) 1% (p/v), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma) 1% (p/v), tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (Sigma) 1% (p/v) e NaCl 1% (p/v).

Resultados semelhantes foram observados para a bacteriocina ST15, produzida por *Enterococcus mundtii* ST15. Esta bacteriocina permaneceu ativa após os tratamentos com Tween[®] 20 1% (v/v), Tween[®] 80 1% (v/v), SDS 1% (p/v), EDTA 1% (p/v), Tris 1% (p/v) e uréia 1% (p/v) durante 5 h de incubação a 37°C (KWAADSTENIET et al., 2005).

A estabilidade das bacteriocinas DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi frente a agentes químicos possui grande importância do ponto de vista tecnológico, uma vez que diversos compostos orgânicos e inorgânicos são utilizados tanto no processamento de alimentos, através da incorporação de ingredientes, como em ensaios laboratoriais que requerem a aplicação desses agentes, como eletroforese em gel de poliacrilamida, entre outros.

5.6 Identificação das cepas bacteriocinogênicas

De acordo com as reações de fermentação de carboidratos pelo sistema API[®] 50 CHL e o seqüenciamento do gene 16S do rDNA, as cepas DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi e DF5Mi foram identificadas a nível de subespécie como *L. lactis* subsp. *lactis*. A cepa DF6Mi foi identificada como *Leuconostoc lactis* e a cepa DF60Mi foi identificada como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

5.7 Avaliação da produção de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi em meios de cultura de diferentes composições e pH inicial

A multiplicação das cepas *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi, *L. lactis* DF6Mi e *L. paracasei* subsp. *paracasei* DF60Mi em caldo BHI (Oxoid) foi semelhante à multiplicação desses microrganismos em caldo MRS (Difco). A densidade óptica das culturas das cepas após 24h a 30°C, determinada a 600nm (DO_{600nm}), foi de aproximadamente 2,17 para *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi, 2,6 para *L. lactis* DF6Mi e 1,46 para *L. paracasei* subsp. *paracasei* DF60Mi. No entanto, não houve produção de bacteriocinas quando as cepas foram cultivadas em caldo BHI. Da

mesma forma, não foi observada produção de bacteriocinas em leite desnatado Molico (10% p/v).

A produção ótima de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi (3.200 AU/mL), DF6Mi (800 UA/mL) e DF60Mi (800 UA/mL) foi observada quando foram cultivadas em caldo MRS em pH inicial igual a 6.0 (TABELA 4). As cepas *L. lactis* DF6Mi e *L. paracasei* subsp. *paracasei* DF60Mi não produziram bacteriocinas quando cultivadas em caldo MRS em pH iniciais de 3.0, 4.0 e 5.0. Esses resultados demonstram que a produção de bacteriocinas é dependente do o valor inicial do pH do meio de cultura.

Resultados semelhantes foram obtidos por Todorov, Reenen e Dicks (2004b) quando estudaram o efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de bacteriocinas por *Lactobacillus plantarum* ST13BR. Este estudo também apresentou baixa produção de bacteriocinas quando a cepa *L. plantarum* ST13BR foi cultivada em caldo MRS com pH inicial de 4,5.

Após incubação das culturas em caldo MRS com pH inicial igual a 6.0, por 24h a 30°C, o pH final atingiu 4.39 para *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi, 4.33 para *Leuconostoc lactis* DF6Mi e 3.77 para *L. paracasei* subsp. *paracasei* DF60Mi. De acordo com esses resultados, a estabilidade de bacteriocinas por estas culturas não é influenciada pelo abaixamento do pH do meio de cultura.

Esses resultados confirmam a estabilidade das bacteriocinas frente à pH mais ácido, o que demonstra a aplicação potencial desses peptídeos ou de suas cepas bacteriocinogênicas como bioconservadores em alimentos fermentados, tais como queijos e outros derivados lácteos.

TABELA 4. Influência do pH inicial do meio de cultura na produção de bacteriocinas pelas cepas *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi, *Leuconostoc lactis* DF6Mi e *L. paracasei* subsp. *paracasei* DF60Mi em caldo MRS.

	pH inicial do caldo MRS				
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DF4Mi					
pH da cultura após 24h de incubação	3.38	4,39	4.31	4.39	3.38
Atividade da bacteriocina (UA/mL)	0	800	400	3.200	200
Produção ótima (100%) de bacteriocina	3.200 UA/mL				
<i>Leuconostoc lactis</i> DF6Mi					
pH da cultura após 24h de incubação	3.72	4.79	4.40	4.33	4.32
Atividade da bacteriocina (UA/mL)	0	0	0	800	0
Produção ótima (100%) de bacteriocina	800 UA/mL				
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DF60Mi					
pH da cultura após 24h de incubação	3.25	3.60	3.72	3.77	3.85
Atividade da bacteriocina (UA/mL)	0	0	0	800	400
Produção ótima (100%) de bacteriocina	800 UA/mL				

5.8 Avaliação da influência da composição do meio de cultura na produção de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 5, a multiplicação e a produção de bacteriocinas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi é dependente da presença de nutrientes específicos no meio de cultura. Este fenômeno foi também observado para as bacteriocinas ST194BZ, ST414BZ e ST664BZ produzidas por diferentes cepas de *L. plantarum* (TODOROV; DICKS, 2005c).

Na presença de extrato de carne (10g/L) ou de uma combinação de extrato de carne e de levedura (1,0 : 0,5) no meio MRS formulado, a produção de bacteriocinas foi de 800 UA/mL para a cepa DF4Mi e 400 UA/mL para a cepa DF6Mi, enquanto que a cepa DF60Mi não produziu bacteriocina nessas condições. Na presença de extrato de levedura somente, as três cepas produziram bacteriocinas, nas quantidades de 800 UA/mL (DF4Mi) e 400 UA/mL (DF6Mi e DF60Mi). No caldo MRS acrescentado de triptona, além de extrato de levedura ou de carne, a produção de bacteriocinas foi similar, indicando que a triptona como fonte de nitrogênio no meio MRS formulado não foi essencial para a produção de bacteriocinas.

A importância da triptona no meio de cultura para a produção de bacteriocinas parece ser cepa-dependente. De acordo com Van Reenen et al. (2002), a produção ótima de plantaricina 423 foi observada em caldo MRS suplementado com peptona bacteriológica, triptona e extrato de levedura, sendo a triptona essencial para produção desta plantaricina. Já a produção de outra bacteriocina, a helveticina J, foi estimulada pela combinação de extrato de carne e extrato de levedura, não sendo necessária a adição de triptona (JOERGER; KLAENHAMMER, 1986).

Conforme indica a TABELA 5, comprovou-se que a multiplicação dos microrganismos e a produção de bacteriocinas são influenciadas pela presença de glicose no meio MRS, uma vez que não foi observada multiplicação dos microrganismos no caldo MRS formulado acrescido deste açúcar em concentração superior a 30 g/L. Quantidades mais elevadas de glicose podem ter

induzido a produção de ácido, o que por sua vez, pode ter ocasionado a inibição da multiplicação dos mesmos. Por outro lado, a influência da presença de lactose variou conforme a cepa estudada.

A produção de bacteriocinas foi afetada pela adição de diferentes concentrações de K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 ao caldo MRS. A maior produção de bacteriocinas para as cepas DF4Mi (800 UA/mL), DF6Mi (800 UA/mL) e DF60Mi (400 UA/mL) foi observada em concentrações de 5,0 e 10,0 g/L de K_2HPO_4 . Concentrações mais elevadas desse componente apresentaram um efeito negativo na produção de bacteriocina pela cepa DF6Mi.

Os maiores níveis de atividade das bacteriocinas produzidas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi foram observados em baixas concentração (2,0 g/L a 5,0 g/L) de glicerol. O aumento da concentração de glicerol para 8,0, 10,0 e 20,0 g/L, influenciou negativamente a atividade das bacteriocinas produzidas por estas cepas. O aumento da concentração de glicerol no meio de cultura ocasiona a diminuição da atividade de água. Assim, a produção das bacteriocinas pode ter sido influenciada pelo estresse osmótico ou pela ligação das bacteriocinas às membranas celulares e/ou outras moléculas, induzidas pela ação do glicerol.

Em relação ao efeito do Tween[®] 80, verificou-se que a atividade ótima das bacteriocinas produzidas pelas três cepas foi observada na presença de 2,0 g/L de Tween[®] 80 no caldo MRS. Concentrações superiores influenciaram negativamente a produção de bacteriocinas pelas cepas DF6Mi e DF60Mi.

A adição de sulfato de magnésio e sulfato de manganês ao meio MRS formulado não foi essencial para a produção de bacteriocinas pelas cepas testadas, ao contrário do que ocorreu com o citrato de amônio. Normalmente, este componente está presente no meio MRS comercial na concentração de 2,0 g/L, sendo que nesta concentração no meio formulado foram registradas atividades de 400 UA/mL para as três cepas testadas. No entanto, a produção de bacteriocinas no meio formulado contendo citrato de amônio não foi reproduzida no meio formulado.

TABELA 5. Influência dos componentes do caldo MRS na atividade das bacteriocinas produzidas pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi.

Componentes	Concentração	DF4Mi		DF6Mi		DF60Mi	
		pH	Atividade (UA/mL)	pH	Atividade (UA/mL)	pH	Atividade (UA/mL)
Caldo MRS	controle	4,48	3200	4.33	800	3.80	800
Glicose	5 g/L	5.00	800	5.30	0	4.70	0
Glicose	10 g/L	4.70	400	6.10	-	4.30	0
Glicose	20 g/L	6.10	3200	6.00	-	4.00	0
Glicose	30 g/L	6.10	-*	6.00	-	4.00	0
Glicose	50 g/L	5.00	-	5.00	-	4.00	0
Lactose	5 g/L	5.80	1600	5.00	-	6.10	-
Lactose	10 g/L	5.60	800	4.70	-	5.50	-
Lactose	20 g/L	5.50	800	5.00	0	5.00	-
Lactose	30 g/L	5.52	1600	5.00	0	4.70	0
Lactose	50 g/L	5.50	800	5.00	0	4.70	0
L-ramnose	20 g/L	6.10	-	6.10	-	6.10	-
d-manitol	20 g/L	5.30	400	4.00	0	4.00	0
Manose	20 g/L	5.10	400	4.40	0	4.00	0
Galactose	20 g/L	6.10	-	4.00	0	4.00	0
K ₂ HPO ₄	0,0 g/L	4.30	0	4.23	800	3.75	0
K ₂ HPO ₄	5,0 g/L	4.29	800	4.27	800	3.94	400
K ₂ HPO ₄	10,0 g/L	4.34	800	4.17	800	4.06	0
KH ₂ PO ₄	2,0 g/L	4.21	400	4.30	0	3.70	800
K ₂ HPO ₄	5,0 g/L	4.23	400	4.22	800	3.67	800
K ₂ HPO ₄	10,0 g/L	4.22	400	4.24	800	3,71	800
Tween 80	2,0 g/L	4.48	3200	4,3	800	3,68	800
Tween [®] 80	5,0 g/L	4.50	3200	4,26	0	3,69	0
Tween [®] 80	10,0 g/L	4.48	3200	4,27	0	3,6	0
MgSO ₄	0	4.11	400	4.13	800	3.71	800
MnSO ₄	0	4.16	800	4.17	800	4.00	800

Citrato de amônio	0	4.72	0	4,69	0	4.42	0
Citrato de amônio	2,0 g/L	4.72	400	4,69	400	4.42	400
Acetato de sódio	0 g/L	4.03	800	3.97	800	3.51	0
Acetato de sódio	2,0 g/L	4.48	400	4.54	400	3.93	0
Triptona	10,0 g/L	4.32	800	4.21	800	3.82	400
Extrato de carne	10,0 g/L	4.14	400	4.18	800	4.36	0
Extrato de levedura	10,0 g/L	4.26	800	4.23	400	3.79	400
Triptona + extrato de carne	10,0 g/L + 10,0 g/L	4.18	400	4.21	400	3.70	0
Triptona + extrato de levedura	10,0 g/L+ 5,0 g/L	4.11	800	4.15	400	3.76	0
Extrato de carne + extrato de levedura	10,0 g/L+ 5,0 g/L	4.00	800	4.12	400	3.70	0
Glicerol	2,0 g/L	4.47	3200	4.38	800	3.75	800
Glicerol	5,0 g/L	4.47	3200	4.29	800	3.70	400
Glicerol	8,0 g/L	4.49	1600	4.32	400	3.73	0
Glicerol	10,0 g/L	4.47	1600	4.58	0	4.02	0
Glicerol	20,0 g/L	4.47	800	4.62	0	4.10	0

* - Ausência de crescimento das cepas testadas.

5.9 Avaliação da lise do microrganismo indicador pelas cepas DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi

A adição dos sobrenadantes das culturas DF4Mi (3.200 UA/mL), DF6Mi (800 UA/ml) e DF60Mi (800 UA/mL) à cultura de *L. monocytogenes* 711 ($DO_{600nm} = 0.1$) resultou na inibição da multiplicação deste patógeno por diferentes períodos. O sobrenadante da cultura DF4Mi foi capaz de inibir completamente a multiplicação do patógeno pelas 12h estudadas, enquanto os sobrenadante das outras duas cepas foram menos eficientes no controle dessa multiplicação (FIGURA 2).

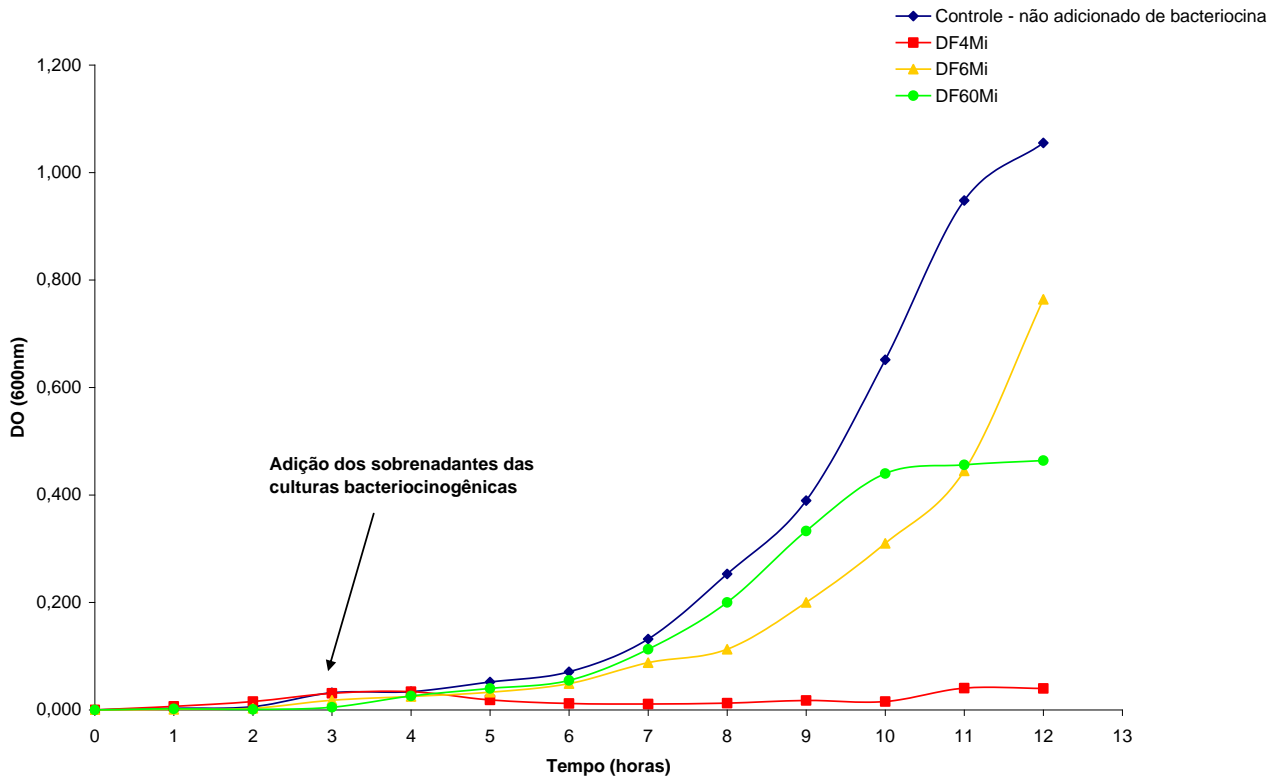


FIGURA 2. Efeito da adição do sobrenadante das culturas bacteriocinogênicas *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi (3.200 UA/mL), *L. lactis* DF6Mi (800 UA/mL) e *L. paracasei* subsp. *paracasei* DF60Mi (800 UA/mL) na multiplicação de *L. monocytogenes* 711.

5.10 Avaliação da adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi às células alvo

As bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi foram adsorvidas à diferentes células alvo em porcentagens variáveis, sendo maior para *L. monocytogenes* 711 e *L. sakei* ATCC 15521 (TABELA 6).

TABELA 6. Adsorção da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi à diferentes células alvo

célula alvo	% Adsorção
<i>L. monocytogenes</i> 711	50
<i>E. faecium</i> ATCC 12755	25
<i>L. sakei</i> ATCC 15521	50

O conhecimento do grau de adsorção das bacteriocinas às células alvo é importante nos estudos sobre sensibilidade e mecanismo de ação dessas bacteriocinas (YILDIRIM; AVŞAR; YILDIRIM, 2002). Diferentes células alvo apresentam diferentes porcentagens de adsorção. Nadra et al., 1998, reportaram adsorção de 100% às células de *Oenococcus oeni* X2L, 80% à células de *Lactobacillus hilgardii* e *O. oeni* L10, e 70% à *L. hilgardii* 6D, enquanto a adsorção da pediocina N5p às cepas de bactérias não sensíveis foi inferior a 20%. Da mesma forma, Todorov e Dicks (2006c) reportaram que a adsorção da plantaricina 423 variou de 17% para *Streptococcus caprinus* ATCC 700066 à 67% para *L. plantarum* LMG 13556, *L. curvatus* DF38, *L. innocua* LMG 13568 e *L. sakei* DSM 20017, enquanto que as cepas sensíveis à plantaricina 423 foram capazes de adsorver a bacteriocina em proporções ainda mais altas (TODOROV; DICKS, 2006c).

5.11 Avaliação da influência do pH e da temperatura na adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 7, a porcentagem de adsorção das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711 foi dependente das condições do teste, sendo maior nas temperaturas e pH mais baixos.

TABELA 7. Efeito da temperatura e pH na adsorção da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi à *L. monocytogenes* 711.

Temperatura:	% Adsorção
4 °C	75
25 °C	75
30 °C	50
37 °C	50

pH:	% Adsorção
4,0	50
6,0	50
8,0	25
10,0	0

A adsorção de bacteriocinas às células alvo demonstra a capacidade das mesmas de atuarem na membrana dos microrganismos e ocasionarem a lise celular.

A adsorção ótima (50%) da bacteriocina produzida pela cepa DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711 foi registrada em pH 4.0 e 6.0. Esses resultados demonstram o potencial de aplicação desta bacteriocina em alimentos moderadamente ácidos.

Em um estudo semelhante, Todorov e Dicks (2006c) observaram que a adsorção ótima da plantaricina 423 à *E. faecium* HKLHS foi registrada entre pH 8.0 e 10.0 e, à *L. sakei* DSM20017, entre pH 2.0 e 6.0.

Temperaturas diferentes também influenciaram na adsorção da bacteriocina DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711 (TABELA 7). À 4 °C foram registrados níveis de adsorção de 75% às células alvo. Já um aumento na temperatura de 25 °C para 37°C apresentou um efeito negativo na adsorção dessa bacteriocina ao patógeno.

Resultados semelhantes já foram observados em estudos com outras bacteriocinas. A elevação da temperatura afetou a adsorção da plantaricina 423 à células de *E. faecium* HKLHS (TODOROV; DICKS, 2006c). Da mesma forma, a adsorção da buchnericina LB às células de *L. plantarum*, estudada por Yildirim; Avşar e Yildirim (2002), foi menor com o aumento da temperatura.

De acordo com os resultados registrados neste experimento, a bacteriocina produzida pela cepa DF4Mi possui potencial para uso como bioconservante em alimentos refrigerados, sendo capaz de agir com maior eficácia contra *L. monocytogenes* em baixas temperaturas.

5.12 Avaliação da influência de compostos orgânicos e sais inorgânicos na adsorção das bacteriocinas produzidas cepa DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711

Conforme pode ser visto na TABELA 8, o efeito dos agentes químicos na adsorção da bacteriocina produzida pela cepa DF4Mi à células de *L. monocytogenes* 711 foi variável, sendo mais baixa na presença de 1% (v/v) de Tween[®] 80 ou de glicerol. A adição de 1% (p/v) de NaCl aumentou para 75% a adsorção dessa bacteriocina às células de *L. monocytogenes* 711. Ainda, a adição de 1% de SDS ao caldo MRS não influenciou na adsorção (50%) da bacteriocina produzida por DF4Mi quando comparada à adsorção em caldo MRS não adicionado de nenhum agente químico.

TABELA 8. Efeito de agentes químicos na adsorção da bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi à *L. monocytogenes* 711.

Agente químico	% Adsorção
NaCl (1%)	75
Tween [®] 80 (1%) (v/v)	25
Glicerol (1%) (v/v)	25
SDS (1%) (p/v)	50

Todorov e Dicks (2006c) também estudaram a influência de diversos agentes químicos orgânicos e inorgânicos na adsorção da plantaricina 423 à células de *E. faecium* HKLHS e verificaram um aumento na adsorção dessa bacteriocina na presença de 1% (v/v) de Triton[®] X-100, Triton[®] X-114 e de clorofórmio. Ainda, células de *L. sakei* DSM tratadas com 1% de NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgCl₂, KCl, KI, TRIS, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgCl₂, citrato de amônio, Na₂CO₃, SDS, β-mercapto-etanol, etanol e metanol apresentaram redução na adsorção da plantaricina 423. Nenhuma alteração na adsorção dessa bacteriocina foi observada na presença de acetato de sódio (1%) (p/v) e de EDTA (1%) (p/v).

O estudo da influência de agentes químicos na adsorção de bacteriocinas é de grande relevância, uma vez que estes compostos estão, com frequência, presentes em alimentos, e podem ter papel importante na atividade das bacteriocinas utilizadas como agentes de bioconservação.

5.13 Avaliação da atividade das bacteriocinas produzidas pela cepa DF4Mi em queijo fresco de leite de cabra experimentalmente contaminado com *Listeria monocytogenes*

A TABELA 9 apresenta os resultados de enumeração de bactérias lácticas, *L. monocytogenes* e bactérias aeróbias mesófilas em leite de cabra após a pasteurização realizada no laboratório conforme descrito no item 4.16.1.

TABELA 9. Contagens microbianas no leite de cabra após a pasteurização lenta do leite (63°C durante 30 minutos).

Microrganismos	UFC/mL
Mesófilos totais	2,5 x10 ¹
<i>L. monocytogenes</i>	< 10 ¹
Bactérias lácticas	<10 ¹

Os resultados indicam que a pasteurização lenta, feita a 63°C durante 30 minutos, permitiu a obtenção de matéria-prima de boa qualidade microbiológica. O baixo nível de contaminação permaneceu constante nos queijos não adicionados de microrganismos durante todos os experimentos.

Conforme a TABELA 10, é possível verificar que a contagem média de *L. monocytogenes* nos queijos contendo a cultura DF4Mi no 2º dia de análise foi inferior à contagem inicial de 3,52 UFC/g ($p < 0,05$). As contagens médias observadas nos 4º e 6º dia de análise não diferiram daquelas observadas no 2º dia ($p > 0,05$). A partir do 8º dia, a população de *L. monocytogenes* aumentou ligeiramente, atingindo contagem média de 3,76 log UFC/g no último dia de análise.

Nos queijos preparados com leite inoculado com *L. lactis* subsp. *lactis* não produtora de bacteriocinas, aconteceu fenômeno semelhante, ou seja, houve uma queda na contagem média no 2º dia em relação à contagem média inicial, e essa contagem se manteve até o 10º dia.

Os resultados exibidos na TABELA 10 e FIGURA 3 mostram que, nos queijos controle inoculados apenas com *L. monocytogenes*, houve um aumento na contagem média desse microrganismo de 3,91 log UFC/g para 6,32 log UFC/g em 10 dias de armazenamento a 8-10°C ($p < 0,05$). Assim, é possível concluir que ambas as bactérias lácticas, produtoras e não produtoras de bacteriocinas, foram capazes de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* nos queijos durante o armazenamento a 8-10°C.

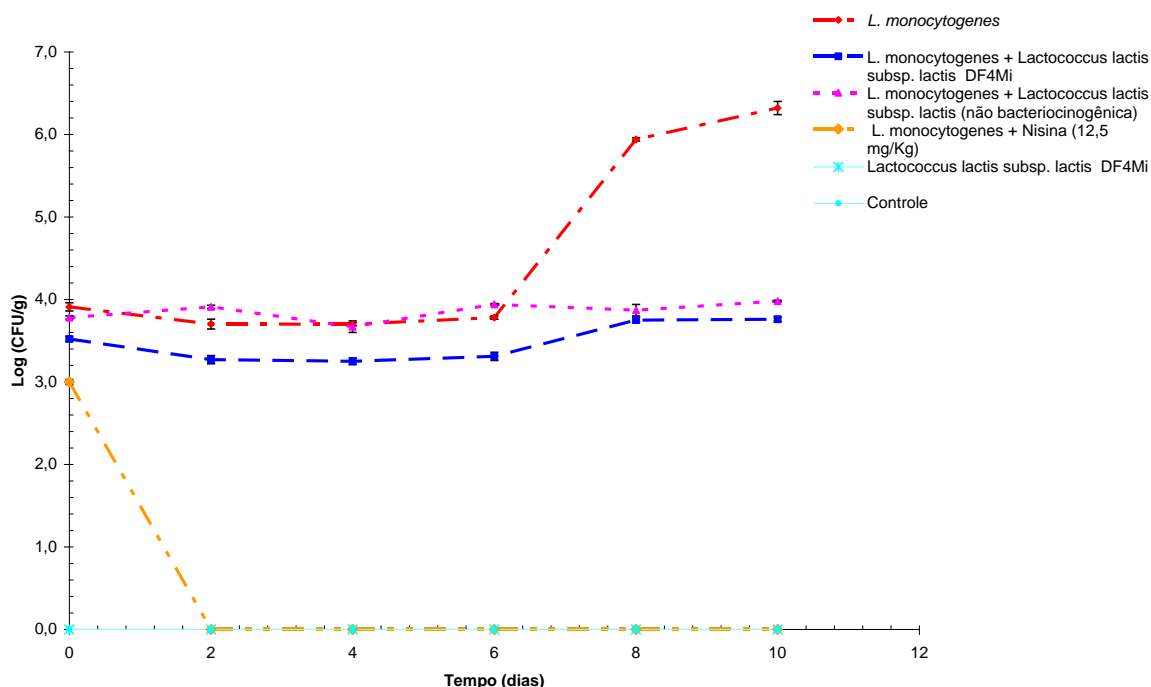


FIGURA 3. Enumeração de *L. monocytogenes* Scott A em queijos de cabra frescal submetidos a diferentes condições de tratamento.

Conforme indicado na TABELA 11 e FIGURA 4, as duas bactérias lácticas apresentaram boa multiplicação nos queijos estudados durante o período de armazenamento. As contagens médias de DF4Mi passaram de 6,61 UFC/g para 7,13 UFC/g nos queijos contendo *L. monocytogenes* e de 6,73 UFC/g para 7,30 UFC/g nos queijos contendo somente esta bactéria. A contagem média da cepa *L. lactis* subsp. *lactis* não produtora de bacteriocina aumentou de 6,51 UFC/g para 7,98 UFC/g no final do armazenamento. Todos esses aumentos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Verificou-se que nos queijos contendo as culturas de *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi, assim como naqueles contendo a cultura não produtora de bacteriocina, o pH baixou de 5,8 para 5,2 após dez dias de armazenamento. Assim, a atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* apresentada por ambas as cepas não foi decorrente somente da acidificação do

produto, já que essa bactéria é capaz multiplicar-se em pH 5,0, mesmo a 8-10°C (LITTLE et al., 2008).

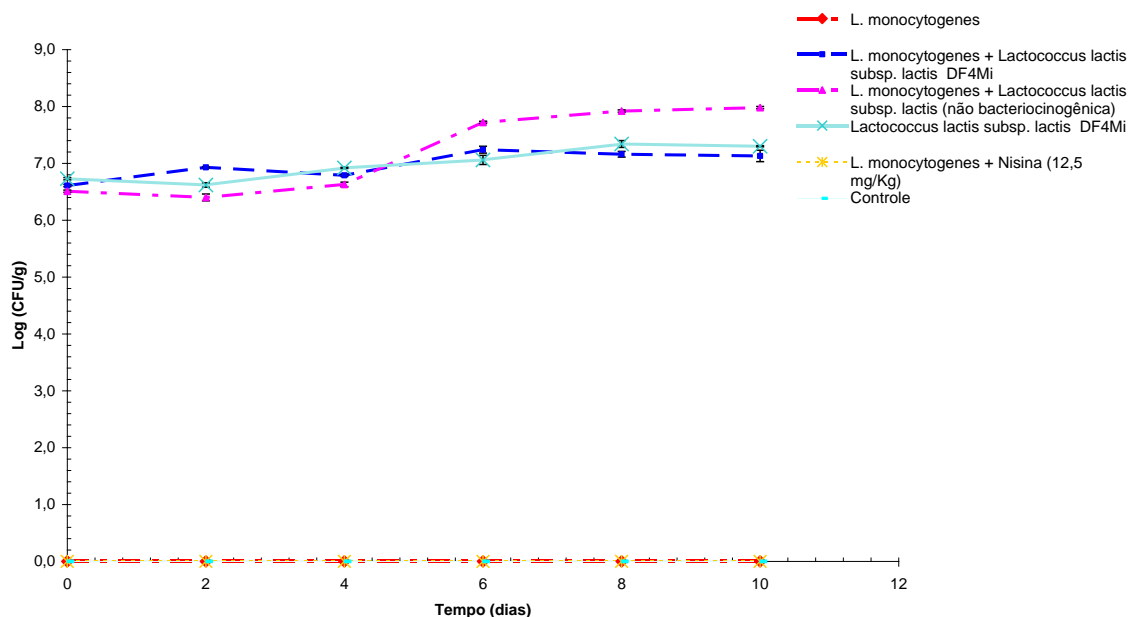


FIGURA 4. Enumeração de bactéria láctica em queijos de cabra frescal submetidos a diferentes condições de tratamento.

Os resultados obtidos neste estudo comprovam que a eficácia da aplicação de culturas bacteriocinogênicas na inibição de microrganismos patogênicos nos alimentos é significativamente menor do que a aplicação destas em meio de cultura. De acordo com Gálvez et al. (2007), a produção de bacteriocina “in situ” depende de diversos fatores físico-químicos como pH, temperatura, atividade de água, presença de CO₂ e O₂, potencial redox, etc., assim como de fatores relacionados à estrutura do alimento, como capacidade tamponante, disponibilidade de nutrientes, presença de aditivos, fluidez, partículas em suspensão, etc, e as condições de processamento, como pressão na homogeneização e outros procedimentos que possam danificar indiretamente as células bacterianas (tratamento térmico, congelamento e descongelamento) (GÁLVEZ et al., 2007). Além disso, a interação da cepa bacteriocinogênica com os

demais microrganismos presentes no alimento também pode interferir na capacidade de produção da bacteriocina (SCHILLINGER et al. 1996).

Alguns estudos avaliaram a capacidade de um consórcio de bactérias lácticas inibir *L. monocytogenes* “in situ” (VALDES-STAUBER et al., 1991; RYSER et al. 1994; CARNIO et al., 1999). No entanto, nenhum destes estudos comprovou claramente a ação de bacteriocinas na inibição desse patógeno. Por outro lado, O’Sullivan et al. (2006) aplicaram *Lactococcus lactis* DPC 3147 produtor de lactacina na superfície de queijos maturados para o controle de *L. monocytogenes*. Embora a cultura láctica não tenha eliminado completamente o patógeno, foi capaz de reduzir a população desse microrganismo em queijos contendo baixos níveis de contaminação.

Uma alternativa tecnológica para a inibição de *L. monocytogenes* em queijos é a adição das bacteriocinas purificadas ao invés da adição de culturas produtoras de bacteriocinas. Esta possibilidade foi avaliada no presente trabalho, verificando-se que nos queijos de leite de cabra contendo nisina (12,5 mg/Kg) as contagens de *L. monocytogenes* caíram para níveis não detectáveis logo no 2º dia de análise, mantendo-se em níveis não detectáveis até o final dos experimentos, indicando um efeito bactericida sobre esse patógeno (TABELA 10).

Entretanto, esses resultados devem ser analisados com cautela, pois diversos fatores intrínsecos relacionados ao próprio alimento limitam a ação das bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2007). Na maioria das vezes, ocorrem interações entre as bacteriocinas e componentes do alimento, tais como lipídeos e proteínas, e em outras, é possível ocorrer precipitação, inativação, baixa solubilidade ou uma distribuição desigual da bacteriocina na matriz alimentar (GÁLVEZ et al., 2007).

Chollet et al. (2008) estudaram o efeito de lipídeos, sal e enzimas proteolíticas na ação da nisina em um sistema modelo e em queijo Emmental. A atividade da bacteriocina diminuiu significativamente com o aumento de lipídeos no sistema modelo. No entanto, o aumento da concentração de sal resultou em um aumento na atividade da bacteriocina. Esse estudo indicou que a nisina interagiu com os glóbulos de gordura, mas não foi degradada pelas proteases do queijo.

BIZANI et al. (2008) avaliaram a capacidade da cereína 8A inibir *L. monocytogenes* em queijos tipo Minas frescal produzido a partir de leite de vaca. Esse estudo comparou o potencial de inibição da bacteriocina purificada quando aplicada na superfície dos queijos prontos. Os autores não obtiveram bons resultados, e concluíram que uma das possíveis causas da ineficácia do processo é a provável interação dessa bacteriocina com os componentes do queijo.

Outros estudos também examinaram o efeito inibitório decorrente da adição de bacteriocinas puras ou semi-purificadas em vários tipos de queijos, como por exemplo, a pediocina em queijo Cheddar (BUYONG et al., 1998), queijo tipo ricota (DAVIES et al., 1997) e queijo Manchego (RODRIGUES et al., 1998), a piscicolina 126 em queijo Camembert (WAN et al., 1997) e enterocina 4 em queijo Manchego (GARCIA et al. 1997; NUÑEZ et al. 1997), com resultados que comprovam a interferência de diferentes fatores intrínsecos relacionados ao próprio alimento na ação das bacteriocinas.

Muitas vezes, é necessário adicionar concentrações bem mais elevadas de bacteriocina no alimento para se obter o mesmo efeito inibidor que se obtém em meio de cultura (GÁLVEZ et al., 2007), podendo ocorrer problemas legais. No Brasil, a legislação para queijos com alta umidade e muito alta umidade (46 a 55% de umidade, com bactérias lácticas viáveis, incluindo o queijo Minas Frescal) exige ausência de *L. monocytogenes* em 25g de queijo (Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, ANVISA). Quanto às bacteriocinas produzidas pelas cepas isoladas de leite de cabra, mais estudos são necessários para verificar seu potencial de aplicação em queijos, que certamente passam por etapas de purificação ou de outras formas de obtenção destas bacteriocinas purificadas, como a otimização da produção.

TABELA 10. Enumeração de *L. monocytogenes* em queijos submetidos a diferentes tratamentos e mantidos a 8-10°C durante 10 dias.

Queijos	Log UFC/g					
	Tempo 0	2° dia	4° dia	6° dia	8° dia	10° dia
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A	3,91 ± 0,05 ^{c*}	3,70 ± 0,06 ^e	3,70 ± 0,02 ^{de}	3,78 ± 0,02 ^{cd}	5,94 ± 0,02 ^b	6,32 ± 0,08 ^a
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DF4Mi	3,52 ± 0,03 ^b	3,27 ± 0,05 ^c	3,25 ± 0,04 ^c	3,31 ± 0,05 ^c	3,75 ± 0,03 ^a	3,76 ± 0,03 ^a
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (não bacteriocinogênica)	3,78 ± 0,02 ^b	3,91 ± 0,02 ^a	3,90 ± 0,07 ^a	3,94 ± 0,01 ^a	3,87 ± 0,07 ^{ab}	3,98 ± 0,01 ^a
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A + Nisina (12,5 mg/Kg)	3,00 ± 0,03	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹
com <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DF4Mi	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹
sem inóculo	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹

* Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias de um mesmo tratamento durante a estocagem.

TABELA 11. Enumeração das bactérias lácticas em queijos submetidos a diferentes tratamentos e mantidos a 8-10°C durante 10 dias.

Queijos	Log UFC/g					
	Dias de tratamento					
	Tempo 0	2° dia	4° dia	6° dia	8° dia	10° dia
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DF4Mi	6,61 ± 0,02 ^c	6,93 ± 0,01 ^b	6,79 ± 0,02 ^b	7,24 ± 0,06 ^a	7,16 ± 0,05 ^a	7,13 ± 0,10 ^a
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (não bacteriocinogênica)	6,51 ± 0,02 ^d	6,40 ± 0,06 ^e	6,63 ± 0,04 ^c	7,72 ± 0,02 ^b	7,92 ± 0,02 ^a	7,98 ± 0,02 ^a
com <i>L. monocytogenes</i> Scott A + Nisina (12,5 mg/Kg)	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹
com <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DF4Mi	6,73 ± 0,02 ^c	6,62 ± 0,04 ^c	6,92 ± 0,01 ^b	7,06 ± 0,08 ^b	7,34 ± 0,06 ^a	7,30 ± 0,10 ^a
sem inóculo	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹	< 10 ⁻¹

* Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias de um mesmo tratamento durante a estocagem.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que:

1. Das 60 colônias isoladas de leite de cabra na triagem de cepas de bactérias lácticas capazes de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, comprovou-se que seis cepas (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi) eram produtoras de bacteriocinas; As cepas foram identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi e DF5Mi), *Leuconostoc lactis* (DF6Mi) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (DF60Mi); O resultado do tratamento dos sobrenadantes das seis culturas com enzimas proteolíticas confirmou a natureza protéica dos compostos inibidores de *L. monocytogenes* produzidos por estas cepas, confirmando tratar-se de bacteriocinas;
2. A caracterização físico-química e biológica das bacteriocinas produzidas por três das seis cepas isoladas (DF4Mi, DF6Mi e DF60Mi) indicou que estas cepas produziam bacteriocinas resistentes ao calor e extremos de pH, e apresentavam características diferentes em relação ao espectro de ação, sensibilidade a agentes químicos, adsorção à células-alvo e lise das células de *L. monocytogenes*. O efeito do pH, temperatura e composição do meio de cultura na produção das bacteriocinas também foi cepa-dependente.
3. A cepa DF4Mi, selecionada para o estudo de inibição de *L. monocytogenes* em queijo frescal preparado com leite de cabra experimentalmente inoculado com este patógeno, foi capaz de impedir a multiplicação de *L. monocytogenes* nos queijos a partir do 6º dia de armazenamento a 8-10°C. No entanto, essa inibição foi semelhante à obtida em queijos preparados com uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* não produtora de bacteriocinas, indicando que a atividade inibitória não pode ser creditada à presença de bacteriocinas.

4. A bacteriocina produzida pela cepa DF4Mi apresenta potencial de uso como bioconservante em queijos refrigerados, sendo capaz de agir com eficácia contra *Listeria monocytogenes* em baixas temperaturas.
5. A inibição de *L. monocytogenes* nos queijos contendo nisina foi mais evidente do que nos queijos adicionados da cepa DF4Mi, sugerindo que são ainda necessários futuros estudos com a bacteriocina purificada da cepa DF4Mi para se avaliar sua aplicação como bioconservante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, W.M; ABRAHÃO, P.R.S; MONTEIRO, C.L.B; PONTAROLO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Braz. J. Pharmac. Sienc.** v. 44 (2), p. 289-296, 2008.

ACHEMCHAM, F.; MARTINEZ-BUENO, M.; ABRINI, J.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. Enterococcus faecium F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Marocco. **J. Appl. Microbiol.**, v.99, p.141-150, 2005.

ADRIÃO, A.; VIEIRA, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; TENREIRO, M.S.R.P.; CHAMBEL, L; BARATA, B, ZILHAO, I., SHAMA, G.; PERNI, S.; JORDAN, S.J.; ANDREW, P.W.; FALEIRO, M.L. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. **Int. J. Food Microbiol.** v. 123, n. 1-2, p.142–150, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria DETEN/MS nº 29 de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão de uso da NISINA com a função de conservador para queijos pasteurizados. Diretor: Marcelo Azalim. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_96.htm#. Acesso em: 10 jan. 2010.

ALBANO, H.; TODOROV, S.D.; REENEN, C.A.; HOGG, T.; DICKS, L.M.T; TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **Int. J. Food Microbiol.** v. 116, p.239-247, 2007.

ATTAIE, R.; RICHTER, R.L. Size distribution of fat globules in goat milk. **J. Dairy Sci.**, v.83, p. 940-944, 2000.

ÁVILA, M.; GARDE, S.; MEDINA, M., NUÑEZ, M. Effect of milk inoculation with bacteriocin producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. **J. Food Prot.**, v.68, p. 1026-1033, 2005.

AXELSSON, L.TL. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (eds.) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 1-66.

BAREFOOT, S.F.; NETTLES, C.G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starters cultures. **J. Dairy Sci.**, v.76, p. 2366-2379, 1993.

BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; PEDROCHE, J.; MÉTRO, F.; PRÉVOST, H; CHOBERT, J.M.; HAERTLÉ, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. **J. Appl. Microbiol.** v. 101, p. 837–848, 2006.

BENECH, R.O.; KHEADR, E.E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced "in situ" by mixed culture during cheddar cheese ripening. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, n. 11, p. 5607-5619, 2002.

BERNARD, L.; SHINGFIELD, K.J.; ROUEL, J.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage. **Br. J. Nutr.** V. 101, n. 2, p. 213-224, 2009.

BIZANI, D; MORRISSY, J.A.; DOMINGUEZ, A.P.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **J. Food Microbiol.**, v. 121, n. 2, p. 229-33, 2008.

BORGES, M.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.; FIGUEIREDO, E.A.T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Bol. Cent.Pesqui. Process. Aliment.**, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

BRANCO, M.A.A.C; FIGUEIREDO, E.A.T.; BORGES, M.F.; SILVA, M.C.D; DESTRO, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.**, v.21, n.2, p.393-408, 2003.

BRITO, J.R.; SANTOS, E.M.; ARCURI, E.F.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.; SOUZA, G.N.; CERQUEIRA, M.M.; BELTRAN, J.M.; CALL, J.E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A.C.; LUCHANSKY, J.B. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** v.74, n.15, p. 4954-4961, 2008.

BUYONG, N.; KOK, J.; LUCHANSKY, J.B. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p.4842–4845, 1998.

CARMO, G.M.I.; OLIVEIRA, A.A.; DIMECH, C.P., SANTOS, D.A.; ALMEIDA, M.G.; BERTO, L.H.; ALVES, R.M.S.; CARMO, E.H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Bol. Eletrôn. Epidemiol.** v.5 (6), p.1-7, 2005.

CARNIO, M.C.; EPPERT, I.; SCHERER, S. Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. **Int. J. Food Microbiol.** v. 47, p.89–97, 1999.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, p.281-370, 2002.

CASLA, D.; REQUENA, T.; GÓMEZ, R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105. **J. Appl. Bacteriol.**, v 81, p.35-41, 1996.

CHANDA, R. The partition of carotenoids and vitamin A in the milk of cows and goats throughout lactation. **Biochem. J.**, v 52, ii, 1952.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety.**, v. 2, p. 82-10, 2003.

CHOLLET, E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982-989, 2008.

COSSART, P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. **Microbes and Infection.**, v.9, p. 1143-1146, 2007.

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

DAVIES, E.A.; BEVIS, H.E.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Let. Appl. Microbiol.** v. 24, p. 343-346, 1997.

DE MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control.**, v. 14, n. 3, p. 197-200, 2003.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Rev. Int.**, v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pork product by *Lactobacillus sake* strain. **Int. J. Food Microbiol.**, v 42, p. 119-126, 1998.

DE MARTINIS, E.C.P. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal.** São Paulo, 1997. 18-19 p. [Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

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

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DE SÁ, F.R.; SZTAJNBOK, J.; DE ALMEIDA, J.F.; TROSTER, E.J.; VAZ, F.A. *Listeria monocytogenes* pneumonia in a cirrhotic child. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 58, n. 5, p. 536-8, 2004.

DREVETS, D.A.; BRONZE, M.S. *Listeria monocytogenes* : epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.53, p. 151–165, 2008.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L.M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class II bacteriocins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v 70, p. 564-582, 2006.

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.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **MAJOR FOOD AND AGRICULTURAL COMMODITIES AND PRODUCERS**. Disponível em: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?item=1020&lang=en&year=2005>. Acesso em: 05.abr.2010.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F., MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 162-165, 2003.

FELSKE, A.; RHEIMS, H., WOLTERINK, A., STACKEBRANDT, E., AKKERMANS, A.D. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. **Microbiology**. v. 143, p. 2983-2989, 1997.

FOULQUIÉ MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST L. The role and application of enterococci in food and health. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 106, n. 1, p.1-24, 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu. 2008. p. 46-50.

FREITAG, N.E.; PORT, G.C.; MINER, M.D. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 9, p. 623-628, 2009.

FUNDAÇÃO IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal 2007**. Rio de Janeiro, RJ, 2007.

-
- FURTADO, M.M. Leite de cabra: características especiais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.**, v.36, n.214, p. 31-37, 1981.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v 120, p. 51-70, 2007.
- GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N.B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.28, n.2, p. 125-152, 2008.
- GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **Int. J. Food Microbiol.**, v 113, p. 1-15, 2007.
- GARCIA, E., DE PAZ, M., GAYA, P., MEDINA, M. AND NUNEZ, M. Inhibition of *Listeria innocua* in Manchego cheese by bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* INIA 4. **Milkwissenschaft.**, v.52, p.667–670, 1997.
- GARDE, S.; AVILA, M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis of Hispanico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. **J. Dairy Sci.**, v. 89, n. 3, p. 840-849, 2006.
- GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 45, p; 473-483, 2005.
- GIRAFFA, G; NEVIANI, E.; VERONI, A. A use of conductance to detect bacteriocin activity. **J. Food Prot.**, Ames, v 53, p. 772-776, 1990.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **Int. J. Food Microbiol.**, v 88, p. 215-222, 2003.
- GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, n. 6, p. 1316-1325, 2005.
- HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Rumin.Res.**, v. 51, p. 155-163, 2004.
- HAIN, T.; STEINWEG, C.; CHAKRABORTY, T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. **J. Biotechnol.**, v.126, n. 1, p. 37-51, 2006.
- HARTMAN, P.A.; HARTMAN, P.S.; LANZ, W.W. Violet Red Bile 2 Agar for stressed coliforms. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 537-539, 1975.
- HENG, N.C.K.; WESCOMBRE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In: RILEY, M.A.; CHAVAN, M.A. **Bacteriocins: ecology and evolution**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. p. 45-83.

-
- HITCHINS, A.D. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: **Bacteriological Analytical Manual**. 8th Ed., 1998. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html#authors>. Acesso em: 29.out.2009, 20:40:00.
- HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Serovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Rev. Bras. Med. Trop.**, v. 39, 32-37, 2006.
- HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 95, n. 5, p. 615-20, 2000.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 365S-373S, 2001.
- INFANTE-PINA, D.; TORMO-CARNICE, R.; CONDE-ZANDUETA. Empleo de leche de cabra en pacientes con alergia a las proteínas de la leche de vaca. **An. Pediatr.**, v. 59, n. 2, p. 138-142, 2003.
- IVANOVA, I.; KABADJOVA, P.; PANTEV, A.; DANOVA, S.; DOUSSET, X. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* susp. lactis B14 isolated from boza-Bulgarian traditional cereal beverage. **Biocatal. Vestn. Mosk. Univ. Kimia.** v.41, p. 47– 53, 2000.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n.2, p. 171-200, 1995.
- JOERGER, M.C.; KLAENHAMMER, T.R. Characterization and purification of helveticin J and evidence for chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacteriol.**, v. 167, p. 439-446, 1986.
- KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **J. Dairy Sci.**, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, 2004.
- KWAADSTENIET, M.D., TODOROV, S.D.; KNOETZE, H.; DICKS, L.M.T. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 105, p. 433-444, 2005.
- LEEDOM, J.M. Milk of nonhuman origin and infectious diseases in humans. **Clin Infect Dis.**, v. 43, n.5, p. 610-615, 2006.
- LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **J. Microbiol. Methods**, v.13, p. 145-150, 1991.

LEWUS, C.B.; KAISER, A. ; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.

LIANOU, A.; SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **J. Food. Prot.**, v.70, n.9, p. 2172-2198, 2007.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S., STEFFAN, S.; SCHERER, S. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n.3, 1854-1857, 2003.

LUCEY, J.A.; JOHNSON, M.E.; HORNE, D.S. Perspectives on the basis of rheology and texture properties of cheese. **J. Dairy Sci.**, Illinois, v. 86, n. 9, p. 2725-2743, 2003.

LUNA, P.; JUÁREZ, M.; LA FUENTE, M. A. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 3377-3381, 2005.

MAKINO, S.I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **Int. J. Food Microbiol.**, v 104, p. 189-196, 2005.

MARTÍNEZ-CUESTA, M.; PELÁEZ, C.; JUÁREZ, M.; REQUENA, T. Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei* cell lysis induced by a crude bacteriocin. **Int. J. Food Microbiol.**, v 38, p. 125-131, 1997.

MACDONALD, P.D.; WHITWAM, R.E.; BOGGS, J.D.; MACCORMACK, J.N.; ANDERSON, K.L.; REARDON, J.W.; SAAH, J.R.; GRAVES, L.M.; HUNTER, S.B., SOBEL, J. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clin Infect Dis.**, v. 40, n.5, p. 677-682, 2005.

MCLAUCHLIN, J.; GREENWOOD, M.H.; PINI, P.N. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. **Int. J. Food Microbiol.**, v 10, p. 255-262, 1990.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **J Dig Dis.** v.9, n.4, p. 190-198, 2008.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., ed. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 557-577.

- MONTVILLE, T.J.; KAISER, A. Antimicrobial proteins : classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: HOOVER, D.G., STEENSON, L.R., ed. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. New York: Academic Press, 1993, p 1-22.
- MORA-GUTIERREZ, A.; KUMOSINSKI, T.F.; FARRELL JUNIOR, H.M. Quantification of α_{s1} -caseins in goat milk from French-Alpine and Anglo Nubian breeds using reversed-phase high performance liquid chromatography. **J Dairy Sci.**, v. 74, p. 3303-3307, 1990.
- MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M-P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **Int. J. Food Microbiol.**, v 64, p. 217-221, 2001.
- MÜLLER, D.M.; CARRASCO, M.S.; TONARELLI, G.G.; SIMONETTA, A.C. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. **J. Appl. Microbiol.** v. 106, p. 2031–2040, 2009.
- NAGAO, J.; ASADUZZAMAN, S.M., ASO, Y, OKUDA, K.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 102, n. 3, p. 139-149, 2006
- MANCA DE NADRA, M.C.; SANDINO DE LAMELAS, D.; STRASSER DE SAAD, A.M. Pediocin N5p from *Pediococcus pentosaceus*: Adsorption on bacterial strains. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 39, p. 79-85, 1998.
- NOONPAKDEE, W.; SANTIVARANGKNA, C.; JUMRIANGRIT, P.; SONOMOTO, K., PANYIM, S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** v. 81, p. 137– 145, 2003.
- NUNEZ, M., RODRIGUEZ, J.L., GARCIA, E., GAYA, P. AND MEDINA, M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. **J. Appl. Microbiol.**, v.83, p.671–677, 1997.
- O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P., HILL; C. A lacticin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, n.6, p.1235-1241, 2003.
- PAPAGIANNI, M.; AVRAMIDIS, N.; FILIOUSSIS, G. ; DASIOU, D. ; AMBROSIADIS, I. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor “indicator microorganism”. **Microb. Cell Fact.**, v. 5., p. 1-14, 2006.
- PFEILER, E.A.; KLAENHAMMER, T.R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiol.**, v.15, p. 546–553, 2007.

PRATA, L.F.; RIBEIRO, A.C.; REZENDE, K.T.; CARVALHO, M.R.B.; RIBEIRO, S.D.A.; COSTA, R.G. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen), região Sudeste, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 4, p. 428-432, 1998.

PSONI, L.; KOTZAMANIDIS, C.; YIANGOU, M.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. **Int. J. Food Microbiol.**, v 114, p. 211-220, 2007.

QUEIROGA, R. C. R. E.; GUERRA, N.B.; BISCONTINI, T.M.B; COSTA, R.G. A caprinocultura leiteira no contexto da segurança alimentar e nutricional. **Revista Conceitos**, v. 5, p. 9, 89-94, 2003.

RAMOS, S.N.M.; COSTA, C. A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus- AM, Brasil. **Acta Amazônica**, v.33, n.4, p.613-618, 2003.

REBAGLIATI, V.; PHILIPPI, R.; ROSSI, M.; TRONCOSO, A. Prevention of foodborne listeriosis. **Ind. J. Path. and Microbiol.**, v. 52, n.2, p. 145-149, 2009.

RHOADES, J.R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiol.**, v.26, n.4, p. 357-376, 2009.

RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. São Paulo: Nobel. 1997. p.19-22, 249-265.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; BARROS, R.R, KOMMERS, G.D.; LANGOHR, I.M.; PIEREZAN, F.; BARROS, C.S.L. Forma nervosa de listeriose em caprinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 1, p. 14-20, 2006.

RODRÍGUES, E.; ARQUÉS, J.L.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **J. Dairy Res.**, v. 68, p. 131-137, 2001.

RODRIGUEZ, E.; GAYA, P.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. **Int J. Food Microbiol.**, v.39, p.129–132, 1998.

ROSSI, M.L.; PAIVA, A.; TORNESE, M.; CHIANELLI, S.; TRONCOSO, A. *Listeria monocytogenes* outbreaks: a review of the routes that favor bacterial presence. **Rev. Chilena Infectol.**, v.5, p. 328-335, 2008.

RYAN, S.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.65, p. 67-91, 2008.

-
- RYSER, E.T.; MAISNIER-PATIN, S.; GRATADOUX, J.J.; RICHARD, J. Isolation and identification of cheese-smear bacteria inhibitory to *Listeria* spp. **Int J Food Microbiol.**, v. 21, p.237– 246, 1994.
- SALLEN, B.; RAJOHARISON, A.; DESVARENNE, S.; WUINN, F.; MABILAT, C. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, n.3, p. 669-674, 1996.
- SAMELIS, J.; LIANOU, A.; KAKOURI, A.; DELBÈS, C.; ROGELJ, I.; BOGOVIC-MATIJASIĆ, B.; MONTEL, M.C. Changes in the microbial composition of raw milk induced by thermization treatments applied prior to traditional Greek hard cheese processing. **J. Food Prot.**, v. 72, n. 4, p. 783-790, 2009.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes Infect.**, v. 9, n.10, p. 1236-43, 2007.
- SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W.H. Potencial of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Scien. and Technol.**, v.71, p. 58-64, 1996.
- SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.292, p. 1–6, 2009.
- SCHLECH, W. Foodborne listeriosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, n. 3, p. 770-775, 2000.
- SILVA, I.M.; ALMEIDA, R.C.; ALVES, M.A., ALMEIDA, P.F.; Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **Int. J. Food Microbiol.**, v 81, n. 3, p. 241-248, 2003.
- SILVA, M.C.D.; HOFER, E. ; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Prot.**, v.61, n.3, p.354-356, 1998.
- SWAMINATHAN, B., GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes Infect.**, v.9, p. 1236-1243, 2007.
- TOMOTAKE, H.; OKUYAMA, R., KATAGIRI, M.; FUZITA, M.; YAMATO, M.; OTA, F. Comparison between Holstein cow's milk and japanese-Saanen goat's milk in fatty acid composition, lipid digestibility and protein profile. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 70, n. 11, p. 2771-2774, 2006.
- TOPISIROVIC, L.; KOJIE, M.; FIRA, D., GOLIC, N., STRAHINIC, I. ; LOZO, J. Potencial of lactic acid bacteria isolated from natural niches in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v 112, n. 3, p. 230-235, 2006.
- TORII, M.S.; DAMASCENO, J.C.; RIBEIRO, L.R.; SAKAGUTI, E.S.; SANTOS, G.T.; MATSUSHITA, M.; FUKUMOTO, M.N. Physical-chemical characteristics

and fatty acids composition in dairy goat milk in response to roughage diet. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 47, n. 6, p. 903-909, 2004.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38; p.166-172, 2007.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. **Process Biochem.**, v. 41, p. 11-19, 2006a.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. **Biologia**, v. 61, p. 269-274, 2006b.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Medium Parameters affecting the adsorption of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423 isolated from sorghum beer. **Biotechnol. J.**, v. 1, p. 405-409, 2006c.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 36, p. 318-326, 2005a.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. **The J. of Microbiol.**, v. 43, n. 4, p.370-374, 2005b.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 43, p. 165-173, 2005c.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. **Folia Microbiol.**, v. 49, p.406–10, 2004a.

TODOROV, S.D.; REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 50, p. 149–157, 2004b.

TOYOSHIMA, M.T.; APANAVICIUS, A.; DE MATOS SOEIRO, A.; DE ALMEIDA, G.M.; ARAI, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.48, n.5, p. 291-3, 2006.

VALDES-STAUER, N.; GOTZ, H.; BUSSE, M. Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. **Int J Food Microbiol.**, v. 13, p.119–130, 1991.

VAN REENEN, C.A.; VAN ZYL, W.H.; CHIKINDAS, M.L.; DICKS, L.M.T. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 81, p. 29-40, 2002.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin Microbiol Rev.**, v. 14, n. 3, p. 584-640.

VERDALET-GUZMAN, I. Characteristic, composition, and cheese-making behavior of goat's milk. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 42, n. 2, p. 192-200, 1992.

VESTERLUND, S.; PALTTA, J.; LAUKOVA, A.; KARP, M.; OUWEHAND, A.C. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. **J. Microbiol. Methods.**, v. 57, n. 1, p. 23-31, 2004.

YILDIRIM, Z.; AVŞAR, Y.K.; Yildirim, M. Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri*. **Microbiol. Res.**, v.157, p. 103-107, 2002.

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

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 argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir 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 argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição 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 argüição.

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