

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Bacteriocina de *Lactobacillus sake* 2a: potencial de aplicação em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de *Salmonella* de origem alimentar

*Jane Mary Lafayette Neves Gelinski*

*Tese para obtenção do grau de Doutor*

Orientadora:  
Prof Dr *Bernadette D. Gombossy de Melo Franco*

SÃO PAULO  
2003

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

**G317b** Gelinski, Jane Mary Lafayette Neves  
Bacteriocina de *Lactobacillus sake* 2a: potencial de aplicação em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de *Salmonella* de origem alimentar / Jane Mary Lafayette Neves Gelinski. -- São Paulo, 2003.  
89p

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

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

664.07 CDD

*Jane Mary Lafayette Neves Gelinski*

Bacteriocina de *Lactobacillus sake* 2a: potencial de aplicação em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de *Salmonella* de origem alimentar

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco  
Orientadora/Presidente

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine Cristina Pereira de Martinis  
1<sup>o</sup> Examinador

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Edir Nepomuceno da Silva  
2<sup>o</sup> Examinador

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariza Landgraf  
3<sup>o</sup> Examinador

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Teresa Destro  
4<sup>o</sup> Examinador

São Paulo, 25 de agosto de 2005

## **APOIO FINANCEIRO**

Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica-PICDT da  
Coordenação de Pessoal de Ensino Superior-CAPES

Universidade de São Paulo - Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos

*A Deus, pela força que me faz seguir adiante  
com os meus objetivos.*

*À Natasha e Rebecca, pela paciência e  
compreensão por suportar uma “cara de mãe  
estressada”.*

*A Eduardo, amigo de todas as horas, exemplo  
de perseverança, dignidade, bom senso e  
bom humor!*

*Aos meus pais Manoel e Zélia, pelo apoio  
e incentivos em toda minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, por toda confiança, orientação e apoio recebidos durante o desenvolvimento da tese e pelo muito que aprendi.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Teresa Destro pelo auxílio teórico, disponibilidade e gentileza nas diversas vezes em que pude tirar dúvidas e discutir sobre assuntos relacionados ao trabalho de tese.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariza Landgraf pela preocupação com o andamento dos trabalhos de laboratório orientações recebidas durante a fase de qualificação para doutorado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Susana Marta Saad pelo muito que aprendi em suas aulas e pela preocupação não só no aspecto profissional, mas pessoal também.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. José Paes pelas críticas pertinentes e sugestões dadas.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine De Martinis pelo auxílio teórico e sugestões recebidas.

À Dr<sup>a</sup> Cláudia Moreno Rosa pela orientação durante o processo de extração ácida da bacteriocina 2a, disponibilidade e informações relevantes fornecidas durante nossas conversas informais.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior por disponibilizar o laboratório de fermentações (semi-industrial) e pelas orientações recebidas.

Ao aluno de mestrado Luis Carlos pelo auxílio técnico no laboratório de fermentações (bloco semi-industrial), e a Gledson Guimarães pelo auxílio técnico durante processo de liofilização da amostra de bacteriocina 2a.

À Kátia Leani Oliveira de Souza, do laboratório de microbiologia de alimentos, pelo apoio técnico, organização e amabilidade que garantiram o bom andamento dos trabalhos.

À Lúcia de Fátima da Silva Gomes pelo apoio técnico e amigo sem os quais teria sido mais difícil enfrentar alguns obstáculos.

A Alexandra Pastor C. Spolaori por dividir comigo as apreensões inerentes ao trabalho experimental, pelo exemplo de disciplina e dedicação.

À Alcina M<sup>a</sup> Liserre pela amizade e disposição constante em ajudar.

À Elisa Odebrecht pelo apoio amigo em momento difícil e pelas discussões que enriqueceram nossos conhecimentos.

Aos colegas de curso que direta ou indiretamente me auxiliaram na condução do trabalho experimental e pela agradável convivência: Ângela Fröelich, Cecília, Cristiano Andrigheto, Cristina Cruz, Dory Worcmann-Barninka, Edna Lima, Emilieme, Fábio Sandhon, Flávia Silvestre, Gunnar Martin, Juliana Saito, João Alegro, Kátia Gianni, Lina Aragon, Luciano Bersort, M<sup>a</sup> Luz Moreno, Mariana Mayer, Patrícia, Paula Marques, Ricardo Sakate, Vanessa Tsuhako, Vanessa Vieira, Viviane Colombari, e aos estagiários: Marcelo e Bruno, Mônica e Patrícia.

Aos funcionários da secretaria acadêmica do Deptº de Alimentos e Nutrição Experimental e da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-FCF, por todo empenho e gentileza demonstrados durante o curso.

À Janice Godoi (Danisco ) pela gentileza no fornecimento de Nisaplin®

Às bibliotecárias da FCF, Adriana de A. Barreiros e Leila Aparecida Bonadio, pela gentileza na correção das referências bibliográficas de acordo com as normas da ABNT.

À Universidade do Oeste de Santa Catarina pelo apoio, e aos meus colegas (professores e funcionários) por assumirem minhas responsabilidades durante minha ausência.

A Eduardo Gelinski Júnior, por não ter poupado esforços para que, apesar da distância, conduzíssemos nossa vida da melhor forma possível.



## SUMÁRIO

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Considerações Gerais.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 O gênero <i>Salmonella</i> – Características gerais.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Bactérias ácido láticas - BAL- Características gerais, produção de bacteriocinas e importância na bioconservação de alimentos.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Outras substâncias orgânicas que inibem a multiplicação de microrganismos.....</b>	<b>17</b>
1.4.1 Ácido cítrico .....	18
1.4.2 Lisozima.....	18
1.4.3 EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético.....	18
<b>1.5 Legislação brasileira sobre ácido lático, ácido cítrico, EDTA e bacteriocinas em alimentos.....</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Perspectiva para uso de bacteriocina em combinação com outros antimicrobianos em alimentos.....</b>	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Cepas utilizadas e condições de cultivo.....</b>	<b>25</b>

3.1.1	Cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	25
3.1.2	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A Cm <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> .....	26
3.1.3	<i>Lactobacillus sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	26
3.1.4	<i>Lactobacillus sake</i> 2a bac <sup>-</sup> .....	27
<b>3.2</b>	<b>Obtenção de bacteriocina de <i>L. sake</i> 2a pelo método de extração ácida, Segundo YANG <i>et al.</i> (1992).....</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana de bacteriocina 2a de <i>L. sake</i> 2a.....</b>	<b>28</b>
3.3.1	Avaliação Qualitativa.....	28
3.3.2	Avaliação Quantitativa.....	29
<b>3.4</b>	<b>Determinação do efeito do <i>L. sake</i> 2a sobre a multiplicação de <i>Salmonella</i> em diferentes meios de cultura .....</b>	<b>29</b>
3.4.1	Em co-cultivo com <i>L. sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	29
3.4.2	Em co-cultivo com <i>L. sake</i> 2a bac <sup>-</sup> .....	31
<b>3.5</b>	<b>Determinação do efeito de outras substâncias antimicrobianas sobre a multiplicação de <i>Salmonella</i> em presença do extrato protéico de bacteriocina 2a.....</b>	<b>31</b>
3.5.1	Determinação do efeito do EDTA.....	31
3.5.1.1	Efeito sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis SE3 em cultivo simples.....	33
3.5.1.2	Efeito sobre <i>S. Derby</i> SD2, <i>S. Enteritidis</i> SE3, <i>S. Hadar</i> SH4 , <i>S.</i>	

Panama SP5 e S. Typhimurium ST6 na presença de <i>L. sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	34
3.5.1.3 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> , na presença de <i>L.sake</i> 2a bact <sup>+</sup> .....	35
3.5.1.4 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida.....	35
3.5.1.5 Efeito sobre o pool de “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida, e de lisozima.....	37
3.5.2 Determinação do efeito do ácido cítrico.....	37
3.5.2.1 Efeito sobre S. Derby SD2, S. Enteritidis SE3, S. Hadar SH4. S. Panama SP5 e S. Typhimurium ST6 na presença de <i>L. sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	37
3.5.2.2 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> com <i>L. sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	38
3.5.2.3 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> em presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida.....	39
3.5.3 Determinação do efeito do ácido láctico.....	40
3.5.3.1 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> na presença de de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida.....	41
3.5.3.2 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> em presença extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida mais lisozima.....	42
<b>3.6 Interpretação dos Resultados.....</b>	<b>42</b>

<b>4. RESULTADOS</b> .....	43
<b>4.1 Produção de bacteriocina 2a por <i>Lactobacillus sake</i> 2a em diferentes condições cultivo</b> .....	43
<b>4.2 Obtenção do extrato protéico da bacteriocina 2a</b> .....	44
<b>4.3 Determinação do efeito de <i>L. sake</i> 2a sobre a multiplicação de <i>Salmonella</i> em diferentes meios de cultura</b> .....	45
4.3.1 Em co-cultivo com <i>L. sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	45
4.3.2 Em co-cultivo com <i>L. sake</i> 2a bac <sup>-</sup> .....	49
<b>4.4 Determinação do efeito do EDTA</b> .....	52
4.4.1 Efeito sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis em cultivo simples.....	52
4.4.2 Efeito sobre cepas de <i>Salmonella</i> em co-cultivo com <i>L. sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	52
4.4.3 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> em meio BHI em aerobiose a 37°C, em co-cultivo com <i>L. sake</i> 2a bac <sup>+</sup> .....	54
4.4.4 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida....	55
4.4.5 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> na presença de Extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida e lisozima.....	56
<b>4.5 Determinação do efeito do ácido cítrico</b> .....	57
4.5.1 Efeito sobre cepas de <i>Salmonella</i> em co-cultivo com <i>L. sake</i> 2a	

bac+ em meio BHI contendo ácido cítrico 10 mM ou 20 mM em aerobiose a 37°C.....	57
4.5.2 Efeito sobre “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> em meio BHI contendo ácido cítrico 10mM ou 20 mMM em aerobiose a 37°C.....	60
4.5.3 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> em presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida...	61
<b>4.6 Determinação do efeito do ácido láctico.. .</b>	<b>62</b>
4.6.1 Efeito sobre o “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a, obtido por extração ácida ou em combinação com lisozima.....	62
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Interação de monômeros de bacteriocina (formas ovais) com a membrana citoplasmática através do mecanismo de ação detergente.....14
- FIGURA 2** Mecanismo de formação de poros: (a) Modelo “wedge-like”; (b) Modelo “barrel-stave”. Gradiente de pH ( $\Delta$  pH); potencial de membrana ( $\Delta$   $\Psi$ ) .....15
- FIGURA 3** Estrutura de membranas de bactérias Gram positivas (A) e Gram negativas (B); LPS= lipopolissacarídeo. ....20
- FIGURA 4** Visão esquemática do envelope celular de bactéria Gram negativa. LPS = lipossacarídeo; LP= polissacarídeo; ME= membrana externa, P = porinas.....22
- FIGURA 5** Quantificação de bacteriocina 2a através do método de difusão em ágar usando *L. monocytogenes* Scott A  $Cm^f$   $Em^f$  como indicador. A seta única indica a formação de halo de inibição com a bacteriocina pura (sem diluição). Nos demais poços no sentido anti-horário estão as diluições 1/2; 1/4; 1/8; 1/12; 1/14; 1/16; 1/20. As setas duplas no centro da placa indicam o controle positivo (nisina 100 UI/ml), e à direita, o controle negativo (tampão fosfato 10 mM).....44

**FIGURA 6** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac+ em meios BHI (curvas a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>), TSB com 0,1% de glicose (curvas b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) e MRS (curvas c<sub>1</sub> e c<sub>2</sub>) em anaerobiose a 37°C e a 30°C.....46

**FIGURA 7** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac+ em meios BHI (curvas a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>), TSB com 0,1% de glicose (curvas b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) e MRS (curvas a<sub>1</sub> e c<sub>2</sub>) em aerobiose a 37°C e a 30°C.....47

**FIGURA 8** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac- em meios BHI (curvas a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>), TSB com 0,1% de glicose (b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) e MRS (curvas c<sub>1</sub> e c<sub>2</sub>) em anaerobiose a 37°C e a 30°C..... 50

**FIGURA 9** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac- em meios BHI (curvas a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>), TSB com 0,1% de glicose (curvas b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) e MRS (curvas c<sub>1</sub> e c<sub>2</sub>) em aerobiose a 37°C e a 30°C.....52

**FIGURA 10** Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE3 (Log UFC/ml) em caldo BHI contendo diferentes concentrações de EDTA em aerobiose a 37°C..... 52

<b>FIGURA 11</b> Efeito do EDTA 2,0 mM sobre a de multiplicação de cepas de <i>Salmonella</i> de cinco sorotipos diferentes em meio BHI em aerobiose a 37.....	53
<b>FIGURA 12</b> Efeito do EDTA (10 mM ou 20 mM) sobre a multiplicação de “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> co-cultivadas com <i>Lactobacillus sake</i> 2a bac+ em meio BHI em aerobiose a 37°.....	54
<b>FIGURA 13</b> Efeito combinado de EDTA 1,0 mM e extrato protéico de bacteriocina 2a na sobrevivência de “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> .....	55
<b>FIGURA 14</b> Efeito combinado de EDTA 1,0 mM, extrato protéico de bacteriocina 2a bac+ e lisozima na sobrevivência de “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> . ....	57
<b>FIGURA 15</b> Efeito do ácido cítrico 10 mM sobre a multiplicação de cepas de <i>Salmonella</i> co-cultivada com <i>L. sake</i> 2a bac+ em meio BHI em aerobiose a 37°C.....	58
<b>FIGURA 16</b> Efeito do ácido cítrico 20 mM sobre a multiplicação de cepas de <i>Salmonella</i> co-cultivadas com <i>L. sake</i> 2a bac+ em meio BHI em aerobiose a 37°C.....	59
<b>FIGURA 17</b> Efeito do ácido cítrico (10 mM ou 20 mM) sobre a cinética de multiplicação de “pool” de cepas de <i>Salmonella</i> em co-	



cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac+ em meio BHI em  
aerobiose a 37°C..... 60

**FIGURA 18** Efeito combinado do ácido cítrico 10 mM e extrato protéico  
de bacteriocina 2a (500 UA/ml) na sobrevivência de “pool”  
de cepas de *Salmonella*..... 61

**FIGURA 19** Efeito combinado do ácido láctico 0,1% e extrato protéico de  
bacteriocina 2a (500 UA/ml) na sobrevivência de “pool” de cepas  
de *Salmonella*.....62

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Espécies, subespécies e número de sorotipos do gênero <i>Salmonella</i> de acordo com POPOFF <i>et al.</i> (2001).	05
<b>TABELA 2</b>	Exemplos de produtos fermentados por bactérias ácido lácticas e respectivos substratos.	10
<b>TABELA 3</b>	Exemplos de algumas bactérias ácido lácticas produtoras de bacteriocinas.	11
<b>TABELA 4</b>	Delineamento experimental da avaliação do efeito de substâncias anti- microbianas e do extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida na atividade inibitória de <i>L. sake</i> 2a bac+ sobre <i>Salmonella</i>	32
<b>TABELA 5</b>	Produção de bacteriocina 2a por <i>Lactobacillus sake</i> 2a em meios BHI, MRS e TSB com 0,1% de glicose em aerobiose e em anaerobiose a 30°C e a 37°C.	43

## RESUMO

No presente estudo avaliou-se o potencial de aplicação da bacteriocina 2a produzida pelo *Lactobacillus sake* 2a em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de *Salmonella* isoladas de linguiça: *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6. A partir de cultura de *L. sake* 2a em caldo MRS, obteve-se por extração ácida e concentração em liofilizador, um extrato protéico de bacteriocina de cerca de 500 UA/ml. Verificou-se que esse extrato protéico de bacteriocina 2a tem atividade contra *Listeria monocytogenes* Scott A Cmr Emr nos meios de cultura BHI, MRS e TSB com 0,1% de glicose, independente de temperatura e atmosfera de incubação. O extrato protéico de bacteriocina 2a foi utilizado só e em combinação com EDTA, ácido cítrico, ácido láctico ou lisozima sobre “pool” de cepas de *Salmonella*. Todos os antimicrobianos testados apresentaram efeito inibidor contra *Salmonella*, no entanto, quando combinados à bacteriocina 2a esse efeito foi mais acentuado. Entre os tratamentos realizados, o que apresentou efeito mais potente na eliminação ou inibição de *Salmonella* foi a combinação bacteriocina 2a mais ácido láctico 0,1%. Bacteriocina 2a também se mostrou mais eficiente que a nisina (usada como padrão) em combinações com lisozima e EDTA. O estudo permitiu verificar que existe um bom potencial de uso da bacteriocina 2a ou do *L. sake* 2a bac+ em alimentos em associação com os antimicrobianos ácido láctico, ácido cítrico, EDTA ou lisozima. Entretanto, apenas a combinação de antimicrobianos não é suficiente para eliminar ou inibir a multiplicação de *Salmonella*. As condições de temperatura, concentração e forma de aplicação dos tratamentos combinados podem variar e são pontos importantes quando se visa à ação direta sobre as células do patógeno ou quando este está associado a um substrato.

**Palavras Chaves:** Bacteriocina, *L. sake* 2a, *Salmonella*, antimicrobianos.

## ABSTRACT

The objective of this study was to analyse the potential of application of bacteriocin 2a produced by *Lactobacillus sake* 2a in combination with other antimicrobials substances on inhibition of strains of *Salmonella* isolated from raw Brazilian sausages (lingüiça): *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 and *S. Typhimurium* ST6. Culture of *L. sake* 2a grown at 30°C in MRS broth was used to obtain a cell-free supernatant after centrifugation. This cell-free supernatant was submitted to acid extraction method for bacteriocin and water reduction by liofilization process. After this, a final fraction was obtained and denominated proteic extract of bacteriocin 2a and had a final concentration of approximately 500 A.U/mL. Proteic extract of bacteriocin 2a obtained from cultures of *L. sake* 2a grown in broths: BHI, MRS, and TSB with 0.1% of glucose showed bactericidal effect against *Listeria monocytogenes* Scott A Cm<sup>r</sup> Em<sup>r</sup>, in any condition of temperature and atmosphere. The proteic extract of bacteriocin 2a was used alone and in combination with EDTA, citric acid, lactic acid or lysozyme on pool of strains of *Salmonella*. All antimicrobials tested showed inhibitory effect against *Salmonella*, but in combination to bacteriocin 2a this effect was more efficient on inhibition or elimination of *Salmonella*. Bacteriocin 2a showed be more efficient than nisin when in association with lysozyme and EDTA. This study was able to verify that exist a great potential of application of bacteriocin 2a and/or *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>, in foods in combination with the antimicrobials: lactic acid, citric acid, EDTA or lysozyme. However, the simple combination of these antimicrobials is not sufficient to eliminate or inhibit the growth of *Salmonella*. Temperature conditions, concentration of antimicrobials and form of application of treatments can change and they are very important points; mainly when the aim of the study is to evaluate the direct action of antimicrobials on cells of pathogen or action of these substances on pathogen into a specific substrate.

**Key Words:** Bacteriocin, *L. sake* 2a, *Salmonella*, antimicrobials,

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

O aumento da demanda de produtos alimentícios de fácil preparo e minimamente processados tem implicações microbiológicas relativas a modificações nas formas de processamento, aos métodos de conservação (químicos e físicos) e de manuseio, etc. (SOFOS, 1993; GOULD, 1996). Essa demanda aumentada também tem estimulado o interesse por agentes antimicrobianos produzidos naturalmente. Neste sentido, a tecnologia dos obstáculos (LEISTNER, GORRIS, 1995), na qual se emprega a combinação de diferentes métodos de conservação para inibir o desenvolvimento de microrganismos em alimentos, está cada vez mais em foco. A redução de patógenos sem a eliminação de microrganismos que têm efeito bioprotetor sobre o alimento é uma grande preocupação da indústria alimentícia. (HOLZAPFEL, 1995; STILES, 1996).

As bactérias ácido lácticas-BAL têm grande potencial de aplicação na conservação de alimentos. Estas bactérias que têm papel fundamental na produção de alimentos fermentados podem inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e de microrganismos causadores de deterioração de alimentos. Esta inibição pode ocorrer através da competição entre os microrganismos ou por ação de produtos liberados durante o metabolismo das BAL, como peróxido de hidrogênio, ácido láctico e bacteriocinas (HELANDER *et al.*, 1997).

As bacteriocinas são compostos antimicrobianos protéicos que possuem efeito bactericida ou bacteriostático contra bactérias taxonomicamente relacionadas ao microrganismo produtor (KLAENHAMMER, 1993). Embora possam ser utilizadas na inibição ou eliminação de patógenos presentes em alimentos, sabe-se que bacteriocinas de bactérias ácido lácticas têm ação limitada sobre bactérias patogênicas Gram negativas. Ainda que o espectro de ação de bacteriocinas sobre bactérias Gram negativas em condições normais seja mínimo, é possível ampliar o efeito inibitório através do uso combinado com agentes quelantes ou outras substâncias antimicrobianas de ação sobre a membrana externa. O ácido etilenodiaminotetracético-EDTA, por exemplo, desestabiliza a membrana externa de bactérias Gram negativas através da quelação de íons, tornando-as permeáveis a determinadas substâncias que podem então atuar sobre a membrana plasmática (CUTTER, SIRAGUSA, 1995a,b; GOULD, 1996; BOZIARIS, ADAMS, 1999; HELANDER, MATTILA-SANDHOLM, 2000).

A nisina produzida por *Lactococcus lactis* ainda é a única bacteriocina de uso permitido em alimentos e com ação inibitória comprovada para *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* sp, *Staphylococcus* sp e esporos de *Clostridium* sp. Inúmeros estudos têm sido realizados no intuito de ampliar o uso desta bacteriocina para que atue também de forma efetiva sobre bactérias Gram negativas (STEVEN *et al.*, 1992; BOZIARIS, ADAMS, 1998; HELANDER, MATTILA-SADOHLN, 2000). Além disso, inúmeras outras bacteriocinas são alvo de pesquisas que visam avaliar o potencial de ação contra patógenos Gram positivos e Gram negativos (GILL, HOLLEY, 2000a, b). Entre estas, podem ser citadas as bacteriocinas pediocina e sakacina, produzidas respectivamente por *Pediococcus* sp e *Lactobacillus sake*, que têm efeito comprovado contra patógenos, como *Listeria* sp e *Staphylococcus aureus* (MCMULLEN, STILES, 1996; DE MARTINIS, FRANCO, 1998).

Em 1998, isolou-se no laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo uma cepa de *Lactobacillus sake* (*L. sake* 2a) capaz de produzir uma bacteriocina ativa contra *Listeria monocytogenes* tanto em meio de cultura quanto em

alimentos (DE MARTINIS, FRANCO, 1998). Posteriormente, essa bacteriocina foi purificada, determinando-se algumas de suas características como o mecanismo de ação e peso molecular de 3-6 KDa (ROSA *et al.*, 2002). Verificou-se ainda que essa bacteriocina, denominada de bacteriocina 2a, pertence à Classe IIa da classificação de KLAENHAMMER (1993), ou seja, é um peptídeo termo-estável.

## 1.2 O Gênero *Salmonella* – Características Gerais

Em muitos países, incluindo o Brasil, *Salmonella* continua sendo uma das causas mais comuns das doenças de origem alimentar de etiologia conhecida. Uma revisão recente sobre os surtos de origem alimentar ocorridos entre 1995 e 2001 mostrou que *Salmonella* foi responsável por 58,1% dos surtos e 66,2% dos casos reportados nos países do sul da América Latina (PANALIMENTOS, 2002; FRANCO *et al.*, 2003). Nos EUA, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2002), informa que naquele país ocorrem cerca de 40.000 casos de salmonelose por ano.

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São microrganismos anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríquios (exceto *Salmonella enterica*, sorotipos Pullorum e Gallinarum).

De acordo com a definição clássica, *Salmonella* deve produzir ácido e gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*), e não utilizar lactose na maior parte dos ágar seletivos existentes para enterobactérias, tais como ágar verde brilhante, ágar xilose lisina desoxicolato e ágar Hektoen. Esses microrganismos são quimiorganotróficos, têm crescimento ótimo à 37°C e podem sobreviver em temperaturas elevadas ( $\leq 54^{\circ}\text{C}$ ) ou baixas ( $2^{\circ}\text{C}$ - $4^{\circ}\text{C}$ ) *Salmonella* é capaz de multiplicar-se em valores de pH de 4,5 a 9,5, porém a faixa ótima para multiplicação é de 6,5 a 7,5 (D'AOUST *et al.*, 2001).

As salmonelas têm ampla distribuição na natureza. Ocorrem em humanos, animais e estão presentes em alimentos e no meio ambiente. O trato intestinal de aves é o mais importante reservatório do patógeno. Na indústria de processamento de carnes, especialmente de aves, *Salmonella* é um microrganismo difícil de ser eliminado (BRYAN, DOYLE, 1995). No Brasil, a legislação vigente para padrões microbiológicos de alimentos, especifica que, com exceção de carne crua de aves, todos os alimentos à base de carne e seus derivados não podem conter *Salmonella* em 25 gramas de produto (Resolução RDC 12 de 02/01/2001, ANVISA, 2001).

Diversos esquemas taxonômicos para *Salmonella* já foram propostos. O primeiro esquema baseado em parâmetros científicos foi o de Kauffmann-White, no qual o gênero foi dividido em tipos sorológicos em função dos antígenos somáticos O, flagelares H e capsulares Vi que apresentam (D'AOUST *et al.*, 2001). A identificação de *Salmonella* baseia-se principalmente em características bioquímicas, tais como fermentação de açúcares, produção de gás etc., mas, características genéticas como a homologia de ácido desoxirribonucléico, características sorológicas e princípios de taxonomia numérica, também são muito importantes (D'AOUST, *et al.*, 2001). Segundo POPOFF *et al.* (2001), o gênero compõe-se apenas de duas espécies, *Salmonella enterica* e *S. bongori*, sendo que a espécie *S. enterica* tem seis subespécies, conforme descrito na Tabela 1.



**TABELA 1**

Espécies, subespécies e número de sorotipos do gênero *Salmonella* de acordo com POPOFF *et al.* (2001).

<b>Espécies e subespécies</b>	<b>n° de sorotipos</b>
<i>Salmonella enterica</i> :	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1.478
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	498
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	94
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	327
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	71
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	12
<i>Salmonella bongori</i>	21
<b>TOTAL</b>	<b>2.501</b>

Segundo D'AOUST *et al.* (2001), *Salmonella* pode causar infecções entéricas, infecções extra-intestinais e infecções sistêmicas. A capacidade de causar infecção depende:

a) Da capacidade de aderir, colonizar e invadir as células do epitélio intestinal e células M das placas de Peyer do hospedeiro. A colonização é mediada pela interação de fímbrias tipo 1 ou tipo 3, adesinas de superfície (proteínas), hemaglutininas ou por polipeptídeos localizados nas microvilosidades ou glicocálice da superfície intestinal. O efeito da bactéria sobre as células hospedeiras é denominado "ruffling" por causa da aparência deformada da membrana celular. O "ruffling" e a internalização do microrganismo são acompanhados por rearranjo de actina e aumento do nível de  $Ca^{++}$  intracelular (SALYERS, WHITT, 1994). Todos esses processos são mediados por um grupo de genes designado *inv* (*inv* A-H) que codifica fatores determinantes (sistema de secreção tipo III e proteínas) para a invasão do microrganismo na célula hospedeira. Os genes *inv* fazem parte de uma ilha de patogenicidade de *Salmonella*, a SPI1. Uma outra ilha de patogenicidade, SPI2, abriga genes que codificam um segundo sistema de secreção tipo III que é importante durante a fase sistêmica da doença (SHEA *et al.*, 1996). Uma terceira ilha, a SPI3, abriga genes que garantem a sobrevivência do patógeno em macrófagos (BLANC-POTARD, GROISMAN, 1997), sob condições limitantes de magnésio, permitindo a multiplicação celular;

b) Da existência de plasmídios de virulência, que são grupos de genes que codificam produtos que permitem a multiplicação de *Salmonella* no tecido retículo endotelial do hospedeiro. Os plasmídios conferem ainda a capacidade de induzir lise de macrófagos;

c) Da existência de sideróforos, que removem os íons férricos dos tecidos e dependem do conteúdo de enteroquelina (enterobactina) que tem afinidade com  $Fe^{3+}$ . O gene regulador da síntese de sideróforos é o *fur* ("ferric uptake regulator");

d) Da capacidade de produção de toxinas, como citotoxina e enterotoxina. A citotoxina é uma proteína termolábil que inibe a síntese protéica e causa lise da célula hospedeira. Isto foi observado inicialmente com os experimentos de KOO *et al.* (1984) durante salmonelose experimental. A enterotoxina, também termolábil, ativa a adenil ciclase presente na membrana da célula epitelial e aumenta a concentração citoplasmática de AMPcíclico na célula hospedeira. Relacionados à produção dessas toxinas estão alguns genes que fazem parte das ilhas de patogenicidade SPI4 e SPI5. A SPI4 abriga genes que codificam um sistema de secreção tipo I que provavelmente está envolvido na apoptose de macrófagos infectados. A SPI5 abriga genes que codificam para proteínas envolvidas na enteropatogenicidade de *Salmonella*, mas não contribuem para salmonelose sistêmica (WOOD *et al.*, 1998);

e) Da resistência a defensinas. As defensinas são peptídeos tóxicos produzidos pelas células do hospedeiro, que podem matar a bactéria. Esses peptídeos têm relação com os genes *oxy* (genes de estresse de oxigênio) que codificam para produção de catalase e superóxido desmutase, e pelo locus *phoP/PhQ*, que controla a expressão das defensinas;

f) Da existência de outros fatores, como resistência ao sistema de complemento, com contribuição dos antígenos "O" do LPS, da proteína de membrana externa RCK ("Resistance to Complement Killing"), de porinas etc..

Conforme UZZAU *et al.* (2000), os sorotipos de *Salmonella* são geralmente agrupados naqueles adaptados ao hospedeiro e naqueles não adaptados ao hospedeiro. Os sorotipos adaptados, como Typhi, Gallinarum e Abortusovis estão geralmente associados com doença sistêmica em humanos, aves e ovinos, respectivamente. Entretanto, também ocorrem casos

de doença em mais de uma espécie de hospedeiro, causados por um determinado sorotipo de *Salmonella*, como é o caso dos sorotipos Dublin e Choleraesuis. Estes sorotipos estão associados com doença sistêmica em bovinos e em suínos respectivamente, mas podem eventualmente causar doenças em outros hospedeiros mamíferos, incluindo humanos.

No homem, a salmonelose é uma doença que pode ser causada por ingestão de células de *Salmonella*. Os sintomas desenvolvem-se em 12-24 horas após o contato com o microrganismo e, consistem de náuseas, vômitos, dor abdominal, dor de cabeça, febre, calafrios e diarreia. A doença dura em média 4-7 dias e nas diarreias severas recomenda-se a hospitalização (JAY, 2000).

Em casos de salmonelose de origem alimentar, a dose infectante pode variar em função do sorotipo: para *S. Pullorum* são necessárias de  $10^9$ - $10^{10}$  células/g para desenvolver a infecção; para *S. Bareilly* e *S. Newport*, o número mínimo registrado capaz de causar gastroenterite ficou entre  $10^5$  e  $10^6$  células/g. Em geral são necessárias cerca de  $10^7$ - $10^9$  células/g de *Salmonella* para causar salmonelose, mas alimentos contendo até 1 célula/g já foram causadores de surtos (JAY, 2000).

### **1.3 Bactérias ácido lácticas - BAL - Características gerais, produção de bacteriocinas e importância na bioconservação de alimentos**

De modo geral, as BAL desempenham papel de suma importância no desenvolvimento das propriedades organolépticas e da acidificação de produtos alimentares. Além disso, a ação combinada de metabólitos antimicrobianos, tais como os ácidos láctico, acético e propiônico, produzidos durante o processo de fermentação, resulta em um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (DE VUYST, VANDAMME, 1993 *apud* HELANDER *et al.*, 1997), como por exemplo, representantes das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* (ALAKOMI *et al.*, 2000) e outras (HOLZAPFEL, 1995; KLAENHAMMER, 1988).

BAL são microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, catalase negativos, microaerofílicos, ácido tolerantes e têm como principal produto de fermentação o ácido láctico (KLANDER, 1983).

O grupo das BAL compõe-se de doze gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Wessella* (JAY, 2000). De acordo com os produtos finais do metabolismo, as BAL são classificadas em dois grandes grupos: as homofermentadoras, cujo principal produto final é o ácido láctico e as heterofermentadoras, que produzem quantidades iguais de ácidos, CO<sub>2</sub> e etanol.

Conforme JAY (2000), o gênero *Lactobacillus* está dividido em três grupos: Grupo 1 - espécies homofermentadoras obrigatórias mas que não fermentam pentoses (*L. acidophilus*; *L. bulgaricus*; *L. delbrueckii* etc); Grupo 2 – heterofermentadoras facultativas, que também fermentam pentoses (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake* etc.) e o Grupo 3 – heterofermentadoras obrigatórias (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. sanfrancisco* e outras).

Com relação às exigências nutricionais do gênero *Lactobacillus*, as espécies representantes necessitam de aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucléicos, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos, ésteres, carboidratos fermentescíveis e ainda, pantotenato e ácido nicotínico. A faixa de pH ótimo para multiplicação das espécies é de 5,5 a 6, 2, mas podem multiplicar-se em pH igual ou menor que 5,0 (HOLT *et al.*, 1994).

Deterioração bacteriana e segurança de alimentos são dois pontos de interesse primário na indústria de alimentos. A procura por alimentos saudáveis, funcionais, minimamente processados, de fácil preparo, com o maior prazo de validade possível e seguros do ponto de vista microbiológico, tem estimulado o interesse em ampliar o uso de BAL na bioconservação de alimentos. A bioconservação de alimentos se dá pelo uso de microrganismos, aproveitando o potencial de fermentação e/ou os produtos antimicrobianos

resultantes de seu metabolismo. O uso de BAL na bioconservação de alimentos pode propiciar uma extensão da vida de prateleira e maior segurança do alimento. Estas bactérias causam acidificação de alimentos, impedindo o desenvolvimento de microrganismos sensíveis ao pH ácido. Além da produção de ácidos orgânicos, as BAL produzem bacteriocinas e peróxido de hidrogênio que também inibem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (HELANDER *et al.*, 1997). A natureza competitiva das BAL em associação às suas bacteriocinas apresenta-se como um potencial que ainda não está totalmente explorado pela indústria de alimentos apesar de já se ter determinado um número significativo de BAL que poderiam ser utilizadas em alimentos. Neste sentido, a Tabela 2 apresenta alguns produtos fermentados obtidos pela ação de bactérias lácticas e a Tabela 3 apresenta uma lista de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas com grande potencial na bioconservação de alimentos.

**TABELA 2**

Exemplos de produtos fermentados por bactérias ácido lácticas e respectivos substratos.

<b>PRODUTO</b>	<b>MICROORGANISMO</b>	<b>SUBSTRATO</b>
Carnes fermentadas	<i>Pediococcus</i> e outras bactérias ácido lácticas	Carne de porco, boi
Chucrute	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus (brevis, plantarum, curvatus, sake)</i>	Repolho
Kefir	<i>Lactococcus</i> , <i>Lb. kefir</i> (e outros)	Leite
Molho de soja	<i>Lactobacillus</i> sp	Semente de soja e trigo
Peixes	<i>Carnobacterium (piscicola, divergens)</i>	Peixes
Queijo tipo suíço	<i>Lactobacillus (delbrueckii, bulgaricus, helveticus)</i>	Leite
Vegetais	<i>Lactococcus cremoris, lactis</i> , <i>Lactobacillus (plantarum, casei)</i>	vegetais
Iogurte	<i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lb. bulgaricus</i>	Leite

Fonte: Modificada de ROSS *et al.* (2002).

TABELA 3

Exemplos de algumas bactérias ácido lácticas produtoras de bacteriocinas.

<b><i>Linhagem produtora</i></b>	<b>Bacteriocina</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisina
<i>Lactobacillus reuterii</i>	Reuterina
<i>Lb. sakei</i> Lb 706	Sakacina A
<i>Lb. sakei</i> 148	Sakacina M
<i>Lb. sakei</i> CTC 494	Sakacina K
<i>Lb. sakei</i> LTH 673	Sakacina P
<i>Lb. sakei</i> Lb 674 e <i>Lb. sakei</i> Lb 16	Sakacina 674
<i>Lb. sakei</i> MN	Sakacina MN
<i>Lb. sakei</i> 251	Sakacina B
<i>Lb. sakei</i> L45, <i>Lb. sakei</i> 148, <i>Lb. sakei</i> V18	Lactocina S
<i>Lb. curvatus</i> LTH 174	Curvacina A
<i>Lb. bavaricus</i>	Bavaricina A
<i>Carnobacterium piscicola</i> KLV17B	Carnobacteriocinas B1 e B2
<b><i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0, JD, H, E, F, M;</b>	Pediocina PA1
<b><i>P. pentosaceus</i> Z102</b>	

Fonte: Modificado de DE MARTINIS *et al.* (2002).

A ação dos metabólitos antimicrobianos produzidos pelas BAL na inibição de microrganismos indesejáveis presentes em alimentos é inquestionável, mas não suficiente para garantir a segurança de produtos alimentícios. Os consumidores exigem que, além de seguros, esses alimentos sejam cada vez mais estáveis, com vida de prateleira longa, sem conservadores químicos, "light", não ácidos, com pouco açúcar, sal e lipídios (GOULD, 1996). O uso de bacteriocinas ou de culturas produtoras de

bacteriocinas em alimentos é um caminho muito promissor da bioconservação que pode atender às exigências dos consumidores.

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos com natureza química, modo de ação e especificidade variáveis. Diferem ainda em relação ao espectro de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos (KLAENHAMMER, 1993). Estas substâncias estão sendo bastante estudadas e muitas informações sobre organização genética, caracterização bioquímica e mecanismo de ação já foram obtidas (KLAENHAMMER, 1993; HELANDER *et al.*, 1997; MOLL *et al.*, 1999; ENNAHAR *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2002).

Segundo KLAENHAMMER (1993), as bacteriocinas estão divididas em quatro classes ou grupos:

Classe I - (Lantibióticos): Os lantibióticos são moléculas produzidas no ribossomo como pré-peptídeos que sofrem modificação pós-tradução para formar peptídeos biologicamente ativos (DE VOS *et al.*, 1995; SAHL, BIERBAUM, 1998). Essas moléculas caracterizam-se pela grande porcentagem de aminoácidos incomuns, normalmente não encontrados na natureza, tais como os aminoácidos modificados: 2,3 deidroalanina-Dha e 2,3 deidrobutirina-Dhb (JACK *et al.*, 1995), resultantes de desidratações seqüência-específicas da serina e da treonina, respectivamente. Estes aminoácidos contêm centros eletrofílicos que podem reagir com grupos nucleofílicos vizinhos (INGRAM, 1969). Outros aminoácidos são o tioéster lantionina (Lan), que se forma quando a dupla ligação da DhA é quebrada pela sulfidril de um resíduo vizinho de cisteína e o  $\beta$ -metil-lantionina (MeLan), que se forma quando a mesma reação acima envolve a DhB (INGRAM, 1969; MCAULIFFE *et al.*, 2001). As conformações em anéis formadas a partir desses grupamentos são importantes para a manutenção da rigidez da molécula (KUIPERS *et al.*, 1992) e resistência à inativação térmica e à degradação protéica (HURST, 1981).

No grupo dos lantibióticos, a representante mais conhecida é a nisina, que tem duas formas: nisina A com uma histidina na posição 27, e nisina Z, com uma asparagina nessa posição. Outros representantes de lantibióticos são a subtilina de *Bacillus subtilis* (5 anéis de lantionina), lacticina S e carnocina (MONTVILLE *et al.*, 2001).

Classe II – Engloba os peptídeos termoestáveis. As bacteriocinas desse grupo, as moléculas possuem uma seqüência líder de consenso contendo Gly-Gly-xaa, constituindo-se em um sítio de clivagem necessário para a exportação da bacteriocina para fora da célula (ENNAHAR *et al.*, 2000). Esse grupo de bacteriocinas divide-se em três sub-grupos: Sub-grupo IIa: bacteriocinas ativas contra *Listeria monocytogenes* e com seqüência consenso aminoterminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-xaa-Cys, tendo como exemplos pediocina PA-1, sakacina A e P, leucocina A, bavaricina MN curvacina A e bacteriocina de *L. sake* 2a; Sub-grupo IIb: bacteriocinas que requerem dois peptídeos diferentes para atividade, como lactocina G, lactocina M, lactocina F e plantaricinas EF e JF (MOLL *et al.*, 1999). Sub-grupo IIc: bacteriocinas que requerem cisteína reduzida para atividade, como lactocina B (NES *et al.*, 1996).

Classe III: É formada por grandes moléculas termolábeis, como por exemplo helvecitina J e V e lactacina A (KLAENHAMMER, 1993; CLEVELAND *et al.*, 2001).

Classe IV – Engloba proteínas complexas. Neste grupo, as moléculas apresentam porções lipídicas ou de carboidratos com funções ainda desconhecidas. São exemplos leucocina, lactocina 27 e pediocina SJ-1 (MONTVILLE *et al.*, 2001).

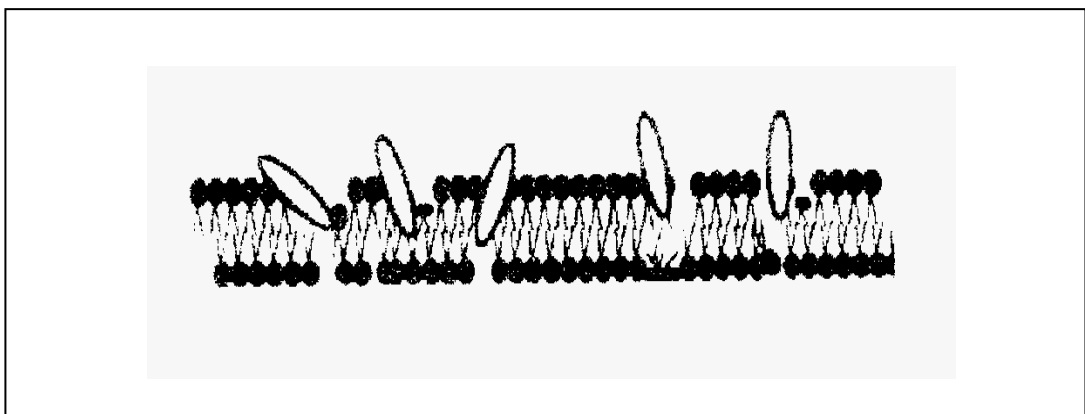
As bacteriocinas melhor estudadas são as das Classes I e II. A classe II é considerada o principal grupo de bacteriocinas de BAL, não apenas por causa do grande número, mas também pelo potencial de aplicação.



As bacteriocinas têm com alvo primário a membrana citoplasmática de células sensíveis. A nisina, por exemplo, atua na dissipação da força próton motriz-PMF, resultando na formação de poros na membrana citoplasmática, com liberação de íons do conteúdo celular (MONTVILLE, BRUNO, 1994; WINKOWSKI *et al.*, 1996).

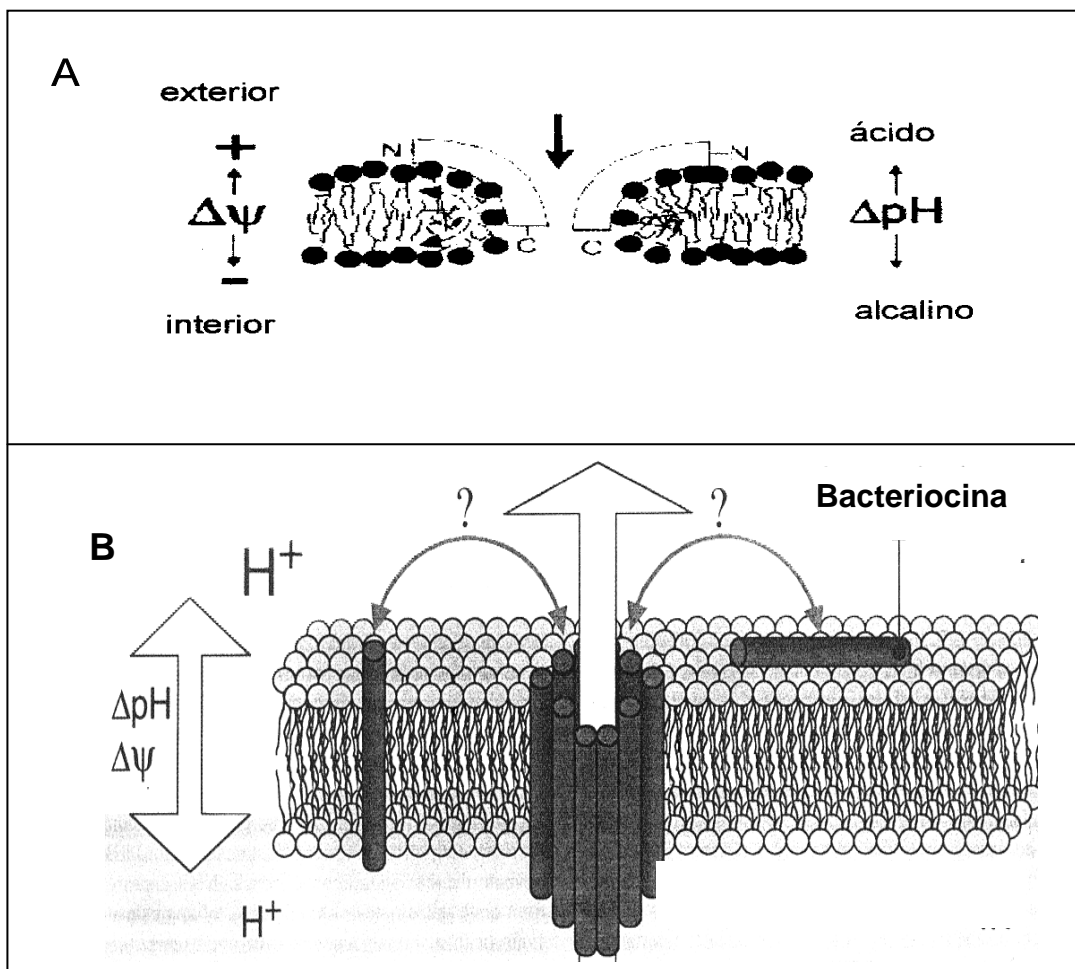
A PMF é formada por um gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) e um componente elétrico, o potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ). Ambos estão relacionados com a síntese de ATP, acúmulo de íons e outros metabólitos através de sistema de transporte na membrana. O colapso da PMF em função da ação da bacteriocina causa morte celular, já que não há energia suficiente para reações metabólicas (MCAULIFFE *et al.*, 2001).

Dois mecanismos foram propostos para explicar o colapso da força próton-motriz: 1º Pela ação detergente (Figura 1); 2º Pela formação de poros, sendo que para este mecanismo há dois modelos propostos: “wedge-like” e “barrel-stave” (Figuras 2-A, 2-B, MONTVILLE *et al.*, 1995). O mecanismo da formação de poros é o mais aceito, uma vez que não é tão drástico para a célula como seria pela solubilização gerada como consequência de uma ação detergente o que levaria à lise total das células (DE MARTINIS *et al.*, 2002b).



**FIGURA 1** Interação de monômeros de bacteriocina (formas ovais) com a Membrana citoplasmática através do mecanismo de ação detergente.

Fonte: MONTVILLE *et al.* (1995).



**FIGURA 2** Mecanismo de formação de poros: (A) modelo "wedge-like";(B)modelo "barrel-stave". Gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ); potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ). Fontes:(A) Adaptado de MOLL *et al.*(1999); (B) Adaptado de MCAULIFFE *et al.* (2001).

Com relação aos métodos para detectar a produção de bacteriocinas por BAL, estes se baseiam na difusão destas substâncias através de um meio de cultura sólido ou semi-sólido contendo um microrganismo sensível (LEWUS, MONTVILLE, 1991). Os métodos mais utilizados são:

"Flip streak " (KEKESY, PIGUET, 1970). A cepa produtora de bacteriocina é semeada em estrias em ágar e, após a incubação adequada, o organismo indicador, sensível à bacteriocina, também é semeado em uma estria perpendicular à cepa produtora de bacteriocina no inverso do ágar.

Difusão em poços ("well diffusion"). O sobrenadante de uma cultura da cepa produtora de bacteriocina é colocado em poços feitos em meio de ágar semi-sólido previamente semeado com a cultura indicadora sensível à bacteriocina (LEWUS, MONTVILLE, 1991; TAGG, MCGIVEN, 1971);

"Spot on the lawn" A cepa produtora de bacteriocina é inoculada em ágar e em seguida o microrganismo indicador é semeado numa sobrecamada de ágar (HARRIS *et al.*, 1989).

Para quantificação da atividade de bacteriocinas utiliza-se o método de diluição crítica. O título da bacteriocina é definido como a recíproca da maior diluição de bacteriocina capaz de causar inibição de uma cepa sensível. Esse título, dividido pelo volume da amostra, dá o resultado final, expresso em Unidades Arbitrárias /ml (MONTVILLE, WINSKOWSKI, 1997).

Em produtos cárneos, o principal foco das pesquisas com BAL e bacteriocinas é a inibição do desenvolvimento de patógenos como *Listeria monocytogenes* e da germinação de esporos de *Clostridium botulinum* (MURIANA, 1996; KNIGHT *et al.*, 1999). Entretanto, sabe-se hoje que o uso de BAL por si só não é suficiente para garantir segurança ao produto alimentício. As tecnologias para inibição de microrganismos indesejáveis, antes aplicadas individualmente, estão cada vez mais sendo usadas em combinação com outros processos de conservação, como redução do pH do produto final e redução de atividade de água, seguindo-se estocagem sob refrigeração em embalagem com atmosfera modificada (GOULD, 1996; HUGAS, 1998)

Processos combinados formam, de fato, a base da tecnologia dos obstáculos (LEISTNER, GORRIS, 1995). A combinação de processos de conservação com agentes antimicrobianos possibilita maior segurança e qualidade microbiológica dos produtos e, neste sentido, bacteriocinas de BAL

constituem-se em agentes antimicrobianos com grandes perspectivas de uso. Entretanto, apesar de estudos evidenciarem o potencial de bacteriocinas como bioconservadoras (SCHILLINGER *et al.*, 1996; DE MARTINIS *et al.*, 2002a), o uso dessas substâncias ainda é bastante restrito. Por isso, desde a determinação da estrutura química da nisina, feita em 1971 (GROSS, MORELL, 1971), essa bacteriocina ainda é a única que possui o "status GRAS" (Generally Recognized As Safe), outorgado pelo "Food and Drug Administration"- FDA dos Estados Unidos da América, ou seja é a única considerada segura para uso em alimentos (CLEVELAND *et al.*,2001).

O fato de uma substância ter recebido o "status" "GRAS" pela FDA (E.U.A) e ser regulamentada como ingrediente alimentar pelo "Federal Food, Drug, and Cosmetic" Act-FFDCA significa que essa substância foi avaliada por um comitê de "experts" que se basearam em princípios científicos e no histórico de segurança em alimentos. Conforme FIELDS (1996), a regulamentação do uso de uma bacteriocina em alimentos depende do alimento em que será usada e da intenção de uso. Além disso, caracterização bioquímica, estabilidade, custo, propriedades organolépticas e atividade em alimentos são alguns dos aspectos que precisam ser analisados para aprovação do uso e obtenção do "status GRAS".

O potencial de aplicação de bacteriocinas como agentes antimicrobianos está claro, porém, fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento podem influenciar sua atividade (ABEE *et al.*,1995; CLEVELAND *et al.*, 2001). Como já visto, a nisina é mais ativa em faixas mais baixas de pH, sendo cerca de 228 vezes mais solúvel em pH 2,0 que em pH 8,0 (LIU, HANSEN, 1990). Dessa forma, o efeito esperado sobre a microbiota contaminante em alimentos com baixo pH é maior.

O ácido láctico produzido pelas BAL é reconhecido como o bioconservante principal em produtos fermentados naturalmente. Ainda que esse ácido tenha dificuldade de atravessar o periplasma através das porinas da membrana externa, ele é capaz de inibir a multiplicação de muitos tipos de

bactérias deteriorantes e espécies de representantes das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* (NIKAIDO, 1996).

ALAKOMI *et al.* (2000) estudaram o efeito do ácido láctico sobre a permeabilidade da membrana externa de *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Estes autores verificaram que o ácido láctico é um potente agente desintegrador da membrana externa, como evidenciado pela sua habilidade de liberar LPS e sensibilizar a bactéria a outras substâncias, como por exemplo, detergentes ou lisozima.

Os ácidos orgânicos não são bactericidas, mas têm um efeito pronunciado sobre a inibição da multiplicação de microrganismos. A mistura de ácidos orgânicos parece ter efeito antimicrobiano mais pronunciado que um ácido sozinho. Isto foi verificado por ADAMS e HALL (1988) quando utilizaram uma mistura de ácido láctico e ácido acético e obtiveram maior inibição da multiplicação de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* em comparação ao uso isolado de cada ácido.

#### **1.4 Algumas substâncias orgânicas que inibem a multiplicação de microrganismos**

##### **1.4.1 Ácido cítrico**

O ácido cítrico é produzido tanto por vegetais quanto por animais durante o metabolismo. Ele é bastante empregado em alimentos, fármacos e cosméticos. É uma substância considerada “GRAS” e exerce atividade antimicrobiana através do abaixamento do pH e quelação de íons metálicos (SHARMA, 2000).

### 1.4.2 Lisozima

Lisozima é uma proteína de 14,6 kDa constituída de 129 resíduos de aminoácidos. Tem atividade hidrolítica nas ligações  $\beta$ -1,4 entre ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina presentes no peptidoglicano da parede celular bacteriana (PROCTOR, CUNNINGHAM, 1988).

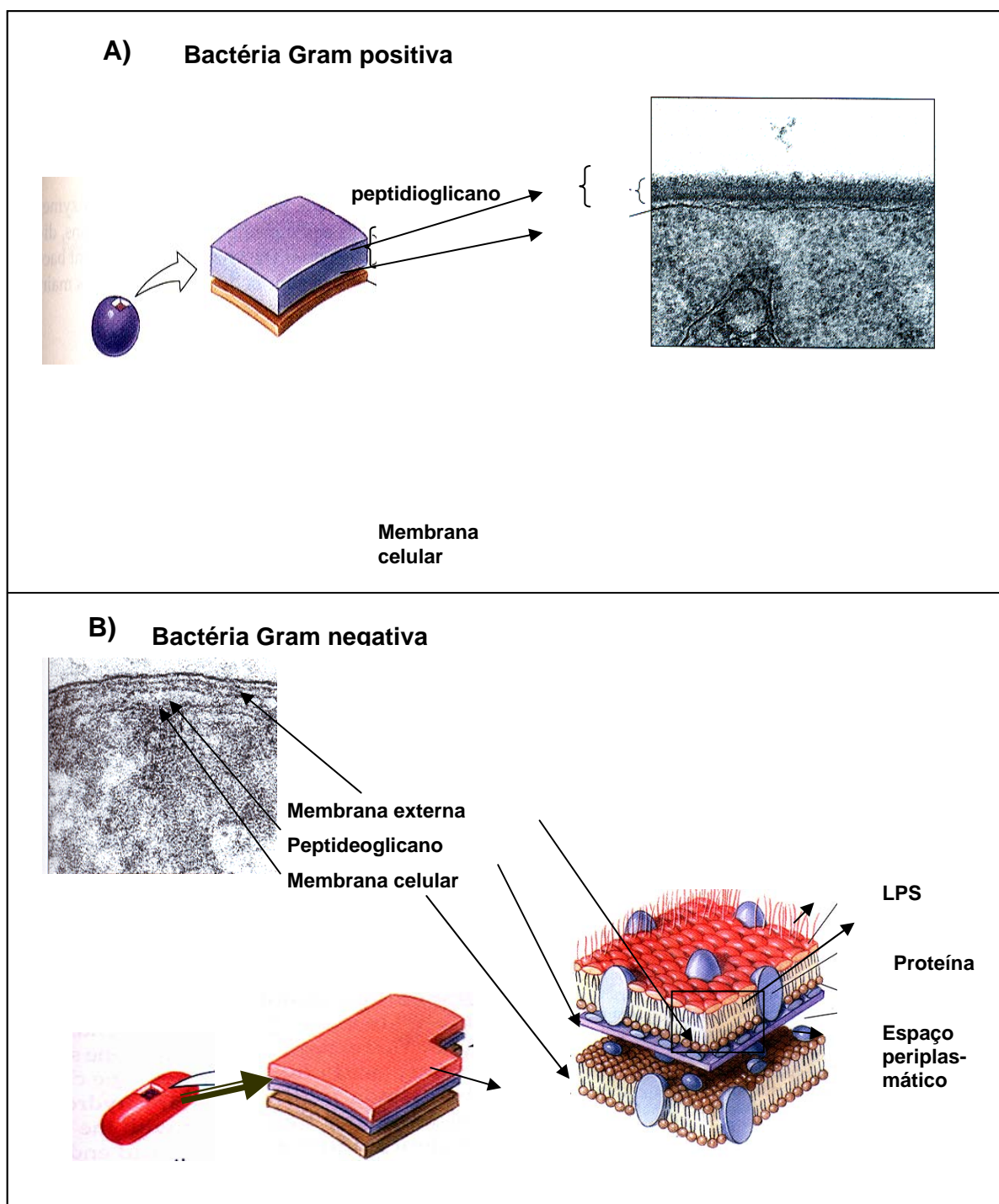
O uso de lisozima como conservante natural de alimentos é bastante aceito por sua inocuidade para humanos, estabilidade frente às condições de pH do alimento e por não causar alterações organolépticas e efeitos químicos adversos nos alimentos (LOSSO *et al.*, 2000).

A lisozima é ineficaz contra bactérias Gram negativas em virtude da barreira da membrana externa que protege o peptidoglicano. Sua principal aplicação na indústria de alimentos é a prevenção da germinação de esporos de *Clostridium tyrobutyricum* em queijos duros (WASSERFALL, TEUBER, 1979). Entretanto, bactérias Gram negativas podem se tornar sensíveis à lisozima quando previamente tratadas com quelantes de íons de membrana externa, como o EDTA, ácidos orgânicos ou pela conjugação de lisozima a carboidratos (PELLEGRINI *et al.*, 1992). Alguns estudos já foram conduzidos com lisozima em combinação a agentes antimicrobianos para avaliar o potencial de ação da combinação dessas substâncias sobre microrganismos patogênicos (FACON, SKURA, 1996; GILL, HOLLEY, 2000a,b).

### 1.4.3 EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

A membrana externa das bactérias Gram negativas, como *Salmonella*, é uma bicamada de membranas que se forma externamente à parede celular e está unida ao peptidoglicano por uma camada semicontínua de pequenas moléculas lipoprotéicas. Em sua face interna a membrana externa contém glicerofosfolipídeos e, em sua face externa, moléculas de lipopolissacarídeo-LPS (Figura 3-A, 3-B). O LPS é composto de uma parte lipídica (lipídeo A) e de

um heteropolissacarídeo complexo, com caráter parcialmente aniônico. O LPS une-se à superfície hidrofílica da parede celular constituindo-se numa barreira para substâncias hidrofóbicas e macromoléculas (NIKAIDO, 1996).



**FIGURA 3** Estrutura de membranas de bactérias Gram positivas (A) e Gram negativas (B); LPS= lipopolissacarídeo.  
Fonte: Adaptado de BLACK (1996).

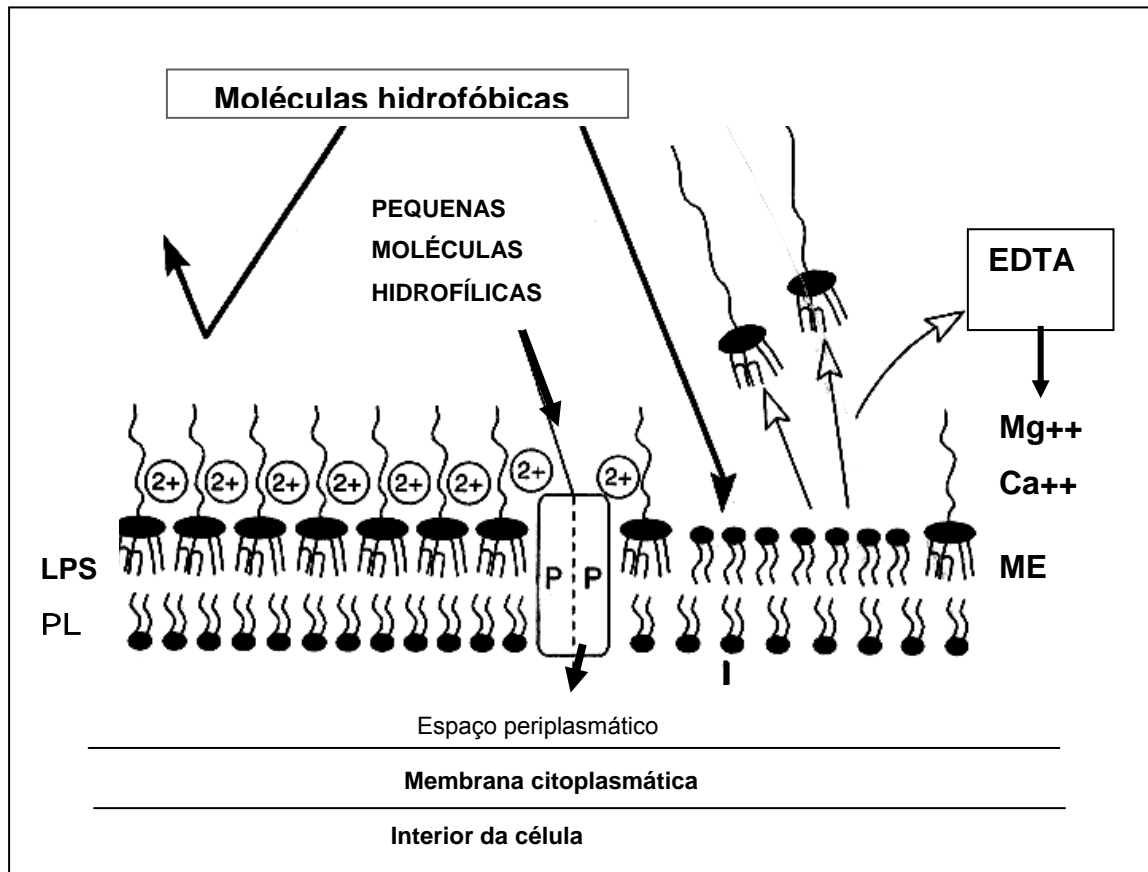
De acordo com HANCOCK (1997), o lipídeo A insere-se na membrana e em muitos Gram negativos compõe-se de difosfato de diglucosamina com 5 a 7 ácidos graxos ligados a uma região de 8 a 12 açúcares e 3 a 8 resíduos de fosfato associados com o antígeno "O", que consiste de 3 a 5 unidades repetidas de açúcar. Mutantes para o antígeno "O" formam colônias de aparência rugosa. Para bactérias que não contém o antígeno "O", o LPS é chamado lipo-oligossacarídeo.

Em resumo, os componentes mais importantes da estrutura da membrana externa de bactérias Gram negativas são as porinas e o LPS, este possui cargas negativas e superfície externa poliônica, parcialmente neutralizada por cátions divalentes de  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  (HANCOCK,1997).

A presença de quelantes altera a estrutura da membrana externa pois esses compostos são capazes de seqüestrar íons metálicos divalentes da membrana externa de bactérias Gram negativas e formar complexos estáveis. Como consequência, ocorre alteração da permeabilidade (VAARA, 1992), tornando a célula sensível a determinadas substâncias, como bacteriocinas (STEVENS *et al*, 1992; CUTTER, SIRAGUSA, 1995a,b; FACON, SKURA, 1996; BOZIARIS, ADAMS, 1999; HELANDER, MATTILA-SANDHOLM, 2000; GILL, HOLLEY, 2000a,b).

O EDTA é um agente quelante que faz a remoção de íons divalentes a partir de sítios de ligação no lipopolissacarídeo-LPS (Figura 4). Cerca de 30-50% de LPS e outros lipídeos e proteínas são liberados da membrana externa, após tratamento com EDTA (VAARA, 1985,1992). Como consequência, fosfolipídeos presentes na face interna da membrana externa ocupam parcialmente a face externa, tornando-a permeável a compostos hidrofóbicos (HELANDER *et al.*, 1997).





**FIGURA 4** Visão esquemática do envelope celular de bactéria Gram negativa. LPS=lipopolissacarídeo; PL = polissacarídeo; ME = membrana externa P= porinas.  
Fonte: HELANDER *et al.* (1997).

### 1.5 Legislação brasileira sobre o uso de ácido lático, ácido cítrico, EDTA e bacteriocinas em alimentos

A legislação brasileira referente ao uso de aditivos em alimentos baseia-se nas recomendações de um comitê de especialistas (“Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA”), do “Codex Alimentarius” da FAO/WHO. O “Codex Alimentarius” tem a função de estabelecer normas gerais e específicas com o objetivo de harmonizar as legislações dos países membros, proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio de alimentos. Estas normas originam-se dentro de comitês formados por representantes dos governos de

cada país membro que têm o direito de se manifestar e, somente após acordo, as normas são aprovadas.

Inúmeras substâncias são normalmente utilizadas como aditivos alimentares ou coadjuvantes tecnológicos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, Brasil, considera-se como aditivo alimentar “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento”. E, considera-se como coadjuvante de tecnologia de fabricação “toda substância, excluindo os equipamentos e os utensílios utilizados na elaboração e/ou conservação de um produto, que não se consome por si só como ingrediente alimentar e que se emprega intencionalmente na elaboração de matérias-primas, alimentos ou seus ingredientes, para obter uma finalidade tecnológica durante o tratamento ou fabricação. Deverá ser eliminada do alimento ou inativada, podendo admitir-se no produto final a presença de traços de substância, ou seus derivados” (ANVISA, 1997).

Dentre os aditivos alimentares ou coadjuvantes tecnológicos permitidos nos alimentos no Brasil, têm interesse para o presente trabalho os ácidos láctico e cítrico, o EDTA e a nisina.

Os ácidos láctico, cítrico e acético podem ser empregados como conservantes, e também como “acidulantes”, “antioxidantes” (ácido cítrico), “reguladores de acidez” (ácido láctico, acético e cítrico) ou “seqüestrantes” (ácido acético e ácido cítrico) (ANVISA, 1999a,b,c). O ácido láctico pode também ser empregado como coadjuvante tecnológico: a Resolução RDC nº 7 de 02/01/2001 “aprova a extensão de uso de ácido láctico como coadjuvante de tecnologia na função de agente de controle de microrganismos na lavagem de ovos, carcaças ou partes de animais de abate e açougue, em quantidade suficiente para obter o efeito desejado” (ANVISA, 2001).

Com relação ao EDTA, esta substância pode ser utilizada como sequestrante na forma de EDTA cálcio dissódico, no limite máximo de 0,0075g/100g em produtos como molhos emulsionados e não emulsionados, molhos desidratados, cremosos, ketchup, coberturas para salada e maionese (ANVISA, 1999a).

A nisina é uma bacteriocina aprovada para uso em alguns alimentos como queijos, no limite máximo de 12,5 mg/Kg (Portarias nº 6/1990; nº 34/1992 e nº 29/1996) tem aprovação para aplicação na superfície externa de diferentes tipos de salsicha, utilizando-se para tal, uma solução comercial a 0,02% de nisina em solução de ácido fosfórico grau alimentício (ABIA, 1996).

### **1.6 Perspectiva para o uso de bacteriocina em combinação com outros antimicrobianos em alimentos**

Estudos realizados até o presente indicam que as bacteriocinas não são ativas contra bactérias Gram negativas (STEVES *et al.*, 1991; GOULD, 1996; McALIFFE *et al.*, 2001). No entanto, alguns autores demonstraram que na presença de substâncias causadoras de danos à membrana celular, como ácidos, agentes sequestrantes de íons e lisozima, a atividade antimicrobiana pode ser potencializada (GILL, HOLLEY, 2000; HELANDER, MATTILA-SANDHOLM, 2000; CLEVELAND *et al.*, 2001; MAGALHÃES *et al.*, 2001; GILL, HOLLEY, 2002).

No presente estudo enfoca-se a possibilidade de a bacteriocina 2a produzida por *L. sake* 2a, agir contra *Salmonella* na presença de alguns ácidos orgânicos e de EDTA, de uso permitido em alimentos. Pretende-se dessa forma dar continuidade aos estudos com a bacteriocina produzida por *L. sake* 2a isolado de alimentos na FCF/USP.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de aplicação da bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a (bacteriocina 2a) na inibição de cepas de *Salmonella* de origem alimentar pertencentes aos sorotipos S. Derby, S. Enteritidis, S. Hadar, S. Panama e S. Typhimurium.

#### 2.1.1 Objetivos Específicos

Utilizando S. Enteritidis como modelo, avaliar a cinética de multiplicação de *Salmonella* em co-cultivo com uma cepa de *Lactobacillus sake* 2a produtora de bacteriocina 2a e com uma cepa não produtora de bacteriocina 2a.

Determinadas as melhores condições para o cultivo de *Salmonella* e *L. sake* 2a, avaliar a ação competitiva de *L. sake* 2a produtor de bacteriocina 2a sobre cinco sorotipos de *Salmonella* na presença de EDTA ou de ácido cítrico.

Verificar o potencial de ação de bacteriocina 2a produzida por *L. sake* 2a na inibição da multiplicação de cepas de *Salmonella* pertencentes aos cinco sorotipos citados, em combinação com EDTA, com ácido cítrico e com ácido láctico, isoladamente ou em combinação com lisozima.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas utilizadas e condições de cultivo

##### 3.1.1 Cepas de *Salmonella* spp.

Foram utilizadas as seguintes cepas de *Salmonella*, isoladas de lingüiça frescal (GELINSKI *et al.*, 2002): *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6. As culturas foram mantidas em meio ágar conservação (fórmula em anexo) a 4°C e reativadas sempre que necessário em caldo BHI (OXOID, Basingstoke, Inglaterra) por 18-24 h sob agitação com 140 rpm a 37°C (Shaker New Brunswick Scientific, E.U.A). As cepas foram utilizadas individualmente ou em conjunto na forma de um “pool” dos cinco sorotipos de *Salmonella*. Para obtenção do “pool” fez-se o cultivo de cada cepa isoladamente em caldo BHI a 37°C por 18 h, mediu-se a densidade óptica em espectrofotômetro (Pharmacia, Inglaterra) até obter absorvância de 0,1 a 600 nm. O número de UFC/ml dessa cultura foi confirmado através da enumeração em placas de ágar BHI com incubação a 37°C por 48 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2.810xg (centrífuga Hettich Mikro 22 R, Alemanha) por 10 minutos e ressuspensas em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2.

### 3.1.2 *Listeria monocytogenes* Scott A Cm<sup>r</sup>Em<sup>r</sup>

Foi utilizada uma cepa de *L. monocytogenes* Scott A resistente aos antibióticos eritromicina e cloranfenicol (FOEGEDING *et al.*, 1992). Essa cepa foi utilizada como cultura indicadora da atividade de bacteriocina nos testes de difusão em placa (item 3.2). A cultura foi conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$  em TSBYE-caldo trípico de soja (OXOID) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (DIFCO Laboratories, Detroit, E.U.A) e contendo 5  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol e 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de eritromicina (ambos SIGMA-ALDRICH Chemical Co., Berlim, Alemanha) e 20% de glicerol (SYNTH, São Paulo, Brasil). Antes do uso, a cultura foi reativada por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  em TSBYE, e em seguida, semeada em TSA-ágar trípico de soja contendo os antibióticos citados na mesma concentração para manutenção das culturas sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ) ou para uso imediato ( $37^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.1.3 *Lactobacillus sake* 2a bac<sup>+</sup>

A cultura de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> isolada de lingüiça frescal (DE MARTINIS, FRANCO, 1998) foi mantida a  $-70^{\circ}\text{C}$  em caldo MRS-De Man, Rogosa e Sharpe (OXOID) adicionado de 0,5% de glicose (em anexo), e de 20% de glicerol. Para utilização, as culturas foram descongeladas e reativadas em caldo MRS incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  por 18h, empregando-se o sistema AnaeroGen<sup>®</sup> (OXOID) e indicador de anaerobiose Anaerocult<sup>®</sup> (OXOID).

#### 3.1.4 *Lactobacillus sake* 2a bac<sup>-</sup>

Essa cepa é uma variante não produtora de bacteriocina da cepa de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>. A forma de acondicionamento da cultura foi a mesma empregada para a cepa de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>.

### 3.2 Obtenção de bacteriocina de *L. sake* 2a pelo método de extração ácida, segundo YANG *et al.* (1992)

Três litros e meio de caldo MRS foram inoculados com 1% (v/v) de uma cultura de 18 h de *L. sake* 2a obtida em caldo MRS. Após 36 h de cultivo em sistema de aerobiose com 140 rpm, a 30°C (fermentador New Brunswick Scientific, E.U.A), a cultura foi aquecida à 70°C por 30 min para inativar as proteases e células. O pH foi ajustado para 5,5 com solução de NaOH 2M (SYNTH, São Paulo, Brasil). A cultura foi centrifugada sob refrigeração a 10.800 xg por 40 min (centrífuga Sorvall®, Du Pont, EUA), retirando-se do sobrenadante obtido alíquota de 1 ml para quantificação de bacteriocina não adsorvida às células. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão 2-N-morfolinoetanosulfonato-MES 5 mM pH 6,5, ressuspendido em seguida com 300 ml de solução de NaCl 100 mM (SYNTH) ajustado a pH 2 com solução de ácido fosfórico 5%. Após 24 h a 4°C sob agitação, a suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições e o sobrenadante foi dialisado contra tampão fosfato 10 mM (SYNTH) pH 7,0 durante 24 h, utilizando-se membranas de diálise para moléculas acima de 2kDa. Ajustou-se o pH da solução contendo bacteriocina para 5,5, retirando-se uma alíquota de 1 ml para testar quantificação da bacteriocina 2a. Em seguida, o sobrenadante foi concentrado em liofilizador (LSL Secfoid, Suíça) sob vácuo por 48 h com temperatura de condensação de -80°C, subdividido em alíquotas de 1 ml e estocado a -70°C. Esse material foi denominado “extrato protéico de bacteriocina 2a”.

### 3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de bacteriocina 2a de *L. sake* 2a

#### 3.3.1 Avaliação Qualitativa

Para confirmar a capacidade da cultura de *L. sake* 2a em produzir bacteriocina 2a, inibidora da multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A Cm<sup>r</sup> Em<sup>r</sup>, utilizou-se a técnica de difusão em ágar, conforme HARRIS *et al.* (1989). Os testes foram realizados tanto com sobrenadantes de cultura de *L. sake* 2a quanto com as amostras submetidas ao processo de extração ácida (item 3.2).

Uma cultura de *L. sake* 2a obtida em caldo MRS a 30°C em anaerobiose por 18 h foi submetida à centrifugação a 2.810xg (centrífuga Hettich Mikro 22R) e o pH do sobrenadante foi ajustado para 6.0 com NaOH 10N (SYNTH). Quarenta microlitros de sobrenadante esterilizado por filtração em membrana de 0,45 µm (MILLIPORE, E.U. A) foram adicionados a um dos orifícios de 3 mm de diâmetro em placas de Petri contendo TSBYE preparado com 1% de ágar mais 5 µg/ml de cloranfenicol e 0,5 µg/ml de eritromicina e adicionado de 1% de uma cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A Cm<sup>r</sup> Em<sup>r</sup>, obtida por cultivo durante 24 h em caldo TSB (OXOID). Ao orifício correspondente ao controle positivo foram adicionados 40 µl de uma solução de nisina (Nisaplin®, Danisco, Inglaterra) contendo 100 UI/ml. O controle negativo correspondeu a um orifício contendo apenas 40µl de caldo MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 h e a presença da bacteriocina foi confirmada pela formação de um halo de inibição de crescimento da cultura indicadora ao redor do orifício onde foi inoculado o sobrenadante.

Esse procedimento foi repetido com a cultura de *L. sake* 2a obtida nos meios BHI e TSB com 0,1% de glicose.



Para confirmação da presença de bacteriocina nas amostras submetidas à extração ácida, seguiu-se o mesmo procedimento, utilizando-se uma solução de tampão fosfato 10 mM como controle negativo.

### 3.3.2 Avaliação Quantitativa

Para quantificação da bacteriocina 2a de sobrenadante obtido após centrifugação da cultura de *L. sake* 2a a 2.810xg por 10 min (centrífuga Hettich Mikro 22R) ou na solução contendo a bacteriocina concentrada obtida por extração ácida, utilizou-se o método da diluição crítica (MAYR-HARTING *et al.*, 1972 *apud* ROSA, 2001). O sobrenadante da cultura de *L. sake* 2a foi diluído 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, em solução de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7.0. Em seguida, foram adicionados 40 µl de cada diluição aos orifícios perfurados no meio TSBYE adicionado de 50 ppm de eritromicina, 500 ppm de cloranfenicol, contendo 1% de ágar acrescentado de 1% de cultura 24 h em caldo TSB de *Listeria monocytogenes* Scott A Cm<sup>r</sup> Em<sup>r</sup> (cultura indicadora). Após incubação a 37°C por 24 h, examinaram-se as placas quanto a formação de halos de inibição. O título da bacteriocina no sobrenadante da cultura de *L. sake* 2a, foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição corrigido pelo volume aplicado.

## 3.4 Determinação do efeito do *L. sake* 2a sobre a multiplicação de *Salmonella* em diferentes meios de cultura

### 3.4.1 Em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>

A cepa de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> foi co-cultivada com *Salmonella* Enteritidis em caldo MRS, em TSB (DIFCO) adicionado de 0,1% de glicose (MERCK) e

em caldo BHI. A incubação foi realizada em duas temperaturas (30°C e 37°C) em aerobiose e em anaerobiose. Para anaerobiose empregou-se o sistema AnaeroGen® (OXOID) e indicador de anaerobiose Anaerocult® (OXOID, Basingstoke, Inglaterra). Como controles, empregaram-se culturas contendo somente uma das bactérias (*S. Enteritidis* ou *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>), preparadas nas mesmas condições de incubação.

Cultivos de *Salmonella* obtidos em caldo BHI por 24 h e de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> obtidos em caldo MRS por 24 h foram diluídos separadamente em solução de NaCl 0,85% estéril até obtenção de uma suspensão com concentração aproximada de 10<sup>6</sup> UFC/ml de cada microrganismo, determinada previamente através de ensaios de curvas de multiplicação dos microrganismos e confirmados por semeadura em placas com agar BHI e XLD-xilose, lisina deoxicolato (Oxoid) para *Salmonella* e agar MRS para *L. sake* 2a. Alíquotas de 1 ml de cultura de *S. Enteritidis* foram transferidas para erlenmeyers (em duplicatas) contendo 100 ml de cada um dos seguintes meios de cultura: MRS, TSB adicionado de 0,1% de glicose e caldo BHI, resultando em uma concentração final de *S. Enteritidis* de 10<sup>4</sup> UFC/ml. A um dos frascos de cada um dos três meios, adicionou-se 1 ml de cultura de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>, resultando também em uma concentração final de 10<sup>4</sup> UFC/ml. As culturas foram incubadas a 37°C em aerobiose com agitação a 140 rpm (Shaker New Brunswick Scientific, EUA) por 12 h, com retirada de alíquotas a cada 3 h para leitura da densidade óptica (600 nM) e diluição decimal seriada em solução de NaCl 0,85%. Estas diluições foram semeadas em placas de ágar XLD (OXOID) e ágar BHI, em duplicatas para as culturas que continham *S. Enteritidis* e em ágar MRS para as culturas que continham *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>. As placas de ágar BHI foram incubadas a 37°C em aerobiose e as de ágar MRS a 30°C usando-se AnaeroGen® (OXOID, Basingstoke, Inglaterra) e indicador de anaerobiose Anaerocult® (OXOID, Basingstoke, Inglaterra). Após 24 h, efetuou-se a contagem de *Salmonella* e de *L. sake* 2a, calculando-se a média aritmética das duas duplicatas. Os resultados foram expressos em UFC/ml. Cada experimento foi repetido quatro vezes.

### 3.4.2 Em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>-</sup>

Para avaliação do efeito do co-cultivo de *S. Enteritidis* com *L. sake* 2a bac<sup>-</sup> empregou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para a cepa de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>.

## **3.5 Determinação do efeito de outras substâncias antimicrobianas sobre a multiplicação de *Salmonella* em presença do extrato protéico de bacteriocina 2a**

A Tabela 4 apresenta o delineamento experimental empregado na avaliação do efeito de substâncias antimicrobianas em combinação com o extrato protéico da bacteriocina 2a obtida por extração ácida, na inibição da multiplicação de *Salmonella* em meio de cultura. Foram realizados experimentos com a cepa de *Salmonella* Enteritidis SE3 isoladamente e em combinação com um “pool” das cepas: *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6 .

TABELA 4

**Delineamento experimental da avaliação do efeito de substâncias antimicrobianas e do extrato protéico de bactéria 2a, obtido por extração ácida, na atividade inibitória de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> sobre *Salmonella*.**

<i>Salmonella</i> SE3 apenas ou SD2, SE3, SH4, SP5 e ST6 (isoladamente)	<i>Salmonella</i> "pool" (*)	<i>L.sake</i> 2a	Bacteriocina 2a (500 UA/ml)	EDTA 0,1mM ; 0,2mM; 10mM ou 20 mM.	EDTA 1,0mM	EDTA 2,0mM	Lisozima 10 µg/ml.	Ácido Cítrico 10 mM ou 20mM	Ácido láctico 0,1%	Nisina 100 UI/ml (controle)	Ítem
+		+									3.4
+				+	+	+					3.5.1.1
	+	+				+					3.5.1.2
	+	+				+					3.5.1.3
	+		+		+					+	3.5.1.4
	+		+	+			+			+	3.5.1.5
	+	+						+			3.5.2.1
	+	+						+			3.5.2.2
	+		+					+		+	3.5.2.3
	+		+						+	+	3.5.3.1
	+		+				+		+	+	3.5.3.2

\* Pool= S. Derby SD2; S. Enteritidis SE3; S. Hadar SH4; S. Panama SP5 e S. Typhimurium ST6.

### 3.5.1 Determinação do efeito do EDTA

O efeito do EDTA foi avaliado nas seguintes condições:

- Sobre *S. Enteritidis* SE3 isoladamente;
- Sobre *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama*
- SP5 e *S. Typhimurium* ST6 na presença de *L. sake* 2a ;
- Sobre “pool” de *Salmonella* na presença de *L. sake* 2a;
- Sobre “pool” de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a;
- Sobre “pool” de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a e lisozima.

#### 3.5.1.1 Efeito sobre *Salmonella* Enteritidis SE3 em cultivo simples

Para verificar o efeito do EDTA sobre a multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE3, foram preparados frascos erlenmeyers contendo 100 ml de caldo BHI adicionado de EDTA (SIGMA-ALDRICH Chemical Co., Berlim, Alemanha) nas seguintes concentrações finais: 0,1 mM, 0,2 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 10 mM e 20 mM. Cultura de *S. Enteritidis* SE3 obtida em meio BHI a 37°C por 24 h em aerobiose, foi diluída em solução de NaCl 0,85% estéril, até obtenção de uma suspensão com concentração aproximada de  $10^7$  UFC/ml. Alíquotas de 1 ml foram transferidas para os frascos erlenmeyer (em duplicata), obtendo-se uma concentração final de *S. Enteritidis*  $10^5$  UFC/ml. Também foram preparados frascos contendo meio BHI sem EDTA que serviram como controles. Os frascos foram incubados a 37°C em aerobiose sob agitação a

140 rpm. Em intervalos regulares, até o limite de 7 h, foram retiradas alíquotas de cada frasco para leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, diluição decimal seriada (conforme grau de turvação do meio) e semeadura em placas de Petri com ágar XLD ou ágar BHI, em duplicatas. As placas foram incubadas por 24-48 h a 37°C. Efetuou-se a contagem das colônias nessas placas e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em UFC/ml. O experimento foi repetido quatro vezes.

### 3.5.1.2 Efeito sobre *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6 isoladamente na presença de *L. sake* 2a bac+

Foram preparadas culturas de 24 h em meio BHI de cada uma das cepas de *Salmonella* (*S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6) e em meio MRS para *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>. Essas culturas foram diluídas, separadamente, em solução de NaCl 0,85% estéril, até obtenção de uma suspensão com concentração aproximada de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Alíquotas de 1 ml da cultura de *L. sake* 2a foram transferidas para frascos erlenmeyers contendo 100 ml de caldo BHI contendo EDTA 2 mM. A cada 2 desses frascos, adicionou-se 1 ml de uma das 5 culturas de *Salmonella*. Frascos contendo as culturas individuais de cada microrganismo em meio BHI, com e sem EDTA, também foram preparados e serviram como controles. Todos os frascos foram incubados a 37°C em aerobiose sob agitação a 140 rpm. Em intervalos regulares, até o limite de 12 h, foram retiradas alíquotas do meio de cultura de cada frasco para leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, diluição decimal seriada conforme grau de turvação do meio e semeadura em placas de Petri com ágar XLD para *Salmonella* e em ágar MRS para *L. sake* 2a, em duplicatas. As placas foram incubadas por 24-48 h a 37°C. Efetuou-se a contagem das colônias nessas placas e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em UFC/ml. O experimento foi repetido quatro vezes.

### 3.5.1.3 Efeito sobre “pool” de cepas de *Salmonella*, na presença de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>

Foram preparadas culturas de 24 h em meio BHI de cada umas das cepas de *Salmonella* (*S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6) e em meio MRS para *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>. Essas culturas foram diluídas, separadamente, em solução de NaCl 0,85% estéril até obtenção de uma suspensão com concentração aproximada de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Alíquotas de 1 ml de cada uma das culturas de *Salmonella* foram reunidas para formar um “pool” que foi transferido para erlenmeyers contendo 100 ml de meio BHI contendo EDTA 2,0 mM, em duplicata. A concentração final do “pool” no meio BHI em cada frasco foi de 5 x 10<sup>4</sup> UFC/ml. Frascos contendo apenas meio BHI (sem EDTA) e o “pool” de cepas de *Salmonella* ou *L. sake* 2a também foram preparados e serviram como controles. Todos os frascos foram incubados a 37°C em aerobiose sob agitação a 140 rpm. Em intervalos regulares, até o limite de 12 h, foram retiradas alíquotas de cada frasco para leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, diluição decimal seriada (conforme grau de turvação do meio) e semeadura em placas de Petri com ágar XLD para o “pool” de cepas de *Salmonella* e ágar MRS para *L. sake* 2a, em duplicata. As placas foram incubadas por 24-48 h a 37°C. Efetuou-se a contagem das colônias nessas placas e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se o resultado em UFC/ml. O experimento foi repetido quatro vezes.

### 3.5.1.4 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida

Foram preparadas culturas de 24 h em meio BHI de cada umas das cepas de *Salmonella* (*S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6). Cada cultura foi centrifugada a 2.810xg

por 10 min e o sedimento ressuspenso em solução de NaCl 0,85% estéril, ajustando-se por diluição decimal seriada, até uma concentração final de  $10^7$  UFC/ml. Essa concentração de células sempre foi confirmada por enumeração em placas de Petri com ágar BHI e XLD incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, volumes iguais de cada cultura foram reunidos em tubos e centrifugados a 2.810xg por 10 min (centrífuga Herttich Mikro 22 R, Alemanha). O sedimento foi ressuspenso em igual volume de solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 para obtenção de uma suspensão contendo um “pool” de cepas de *Salmonella* contendo aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/ml. Alíquotas de 1 ml desta solução foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas a 3.800xg (centrífuga Eppendorf 5417C, Alemanha) durante 10 min. O sedimento obtido em cada tubo eppendorf foi ressuspenso em 1 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 contendo as seguintes substâncias:

- a) EDTA 1,0 mM;
- b) nisina (100 U.I/ml);
- c) nisina (100 U.I/ml) e EDTA 1,0 mM;
- d) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml);
- e) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) e EDTA 1,0 mM.

O pH final de cada suspensão foi ajustado para 6,0.

Os tubos eppendorf foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 min, e em seguida centrifugados a 3.800xg por 10 min. O sedimento de cada tubo foi ressuspenso em 1ml de solução de NaCl 0,85% estéril, novamente centrifugado nas mesmas condições e ressuspenso em 1ml de solução de NaCl 0,85% estéril. Essa suspensão foi submetida à diluição decimal seriada para semeadura em placas de Petri com ágar BHI e XLD, em duplicata. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Os resultados da contagem de colônias nas placas foram obtidos calculando-se a média aritmética das duas duplicatas, expressa em UFC/ml. O efeito das diferentes substâncias testadas foi avaliado através da diferença entre as contagens de *Salmonella* obtidas na suspensão em tampão Tris 0,05 M pH 7,2 apenas e na suspensão em tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,2 adicionado da substância testada. O experimento foi repetido 4 vezes.



### 3.5.1.5 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida, e de lisozima

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 3.5.1.4, ampliando-se os testes de forma a incluir:

- a) lisozima 10 µg/ml;
- b) nisina (100 U.I/ml), EDTA 1,0 mM e lisozima 10 µg/ml;
- c) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml), EDTA 1,0 mM e lisozima 10 µg/ml.

O pH final de cada suspensão foi ajustado para 6,0. As condições de incubação e leitura dos dados foram realizadas conforme descrito no item anterior.

### 3.5.2 Determinação do efeito do ácido cítrico

O efeito do ácido cítrico foi avaliado nas seguintes condições:

- Sobre *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 ou *S. Typhimurium* em co-cultivo com *L. sake* 2a ;
- Sobre “pool” de *Salmonella* em co-cultivo com *L. sake* 2a;
- Sobre “pool” de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a.

### 3.5.2.1 Efeito sobre *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 ou *S. Typhimurium* ST6 em co-cultivo com *L. sake* 2a bac+

Foram preparadas culturas de 24 h em meio BHI de cada umas das cepas de *Salmonella* (*S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6) e em meio MRS para *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>. Essas culturas foram diluídas separadamente em solução de NaCl 0,85% estéril até obtenção de uma suspensão com concentração aproximada de 10<sup>7</sup> UFC/ml. Alíquotas de 1 ml de cada uma das culturas acima foram reunidas para formar um “pool” que foi transferido para erlenmeyers contendo 100 ml de meio BHI (em duplicata) obtendo-se uma concentração final de 10<sup>5</sup> UFC/ml. Frascos contendo as culturas individuais de cada microrganismo em meio BHI com ácido cítrico 10 mM ou 20 mM também foram preparados e serviram como controles. Todos os frascos foram incubados a 37°C em aerobiose sob agitação a 140 rpm durante 12 h. Em intervalos regulares, até o limite de 12h, foram retiradas alíquotas do meio de cultura de cada frasco para leitura da densidade óptica a 600 nm, diluição decimal seriada conforme grau de turvação do meio e semeadura em placas de Petri com ágar XLD para *Salmonella* e ágar MRS para *L. sake* 2a, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C. Efetuou-se a contagem das colônias nessas placas e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em UFC/ml. O experimento foi repetido quatro vezes.

### 3.5.2.2 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>.

Foram preparadas culturas de 24 h em meio BHI de cada umas das cepas de *Salmonella* (*S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6) e em meio MRS para *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>. Essas culturas foram diluídas separadamente em solução de NaCl 0,85% estéril até obtenção de uma suspensão com concentração aproximada de 10<sup>6</sup>

UFC/ml. Alíquotas de 1 ml de cada uma das culturas de *Salmonella* foram reunidas para formar um “pool” que foi transferido para erlenmeyers com 100 ml de meio BHI contendo ácido cítrico 10 mM ou 20 mM, em duplicata. A concentração final do “pool” no meio BHI em cada frasco foi de  $5 \times 10^4$  UFC/ml. Frascos contendo apenas o “pool” de cepas de *Salmonella* ou *L. sake 2a* em meio BHI com ácido cítrico 10 mM e 20 mM sem o ácido cítrico também foram preparados e serviram como controles. Todos os frascos foram incubados a 37°C em aerobiose sob agitação a 140 rpm. Em intervalos regulares, até o limite de 12 h, foram retiradas alíquotas do meio de cultura de cada frasco para leitura da absorvância em espectrofotômetro a 600 nm, diluição decimal seriada conforme grau de turvação do meio e semeadura em placas de Petri com ágar XLD para *Salmonella* e ágar MRS para *L. sake 2a*, em duplicata. As placas foram incubadas por 24-48 h a 37°C. Efetuou-se a contagem das colônias nessas placas e calculou-se a média aritmética das duplicatas, expressando-se os resultados em UFC/ml. O experimento foi repetido quatro vezes.

### 3.5.2.3 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtida por extração ácida.

Foram preparadas culturas de 24 h em meio BHI de cada uma das cepas de *Salmonella* (*S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6). Cada cultura foi centrifugada a 2.810xg por 10 min e o sedimento ressuspense em solução de NaCl 0,85% estéril, ajustando-se por diluição decimal seriada, até uma concentração final de  $10^8$  UFC/ml. Essa concentração de células sempre foi confirmada por enumeração em placas de Petri com ágar BHI e XLD incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, volumes iguais de cada cultura foram reunidos em tubos e centrifugados a 2.810xg por 10 min (centrífuga Herttich Mikro 22 R, Alemanha). O sedimento foi ressuspense em solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 para obtenção de uma suspensão contendo um “pool” de cepas de *Salmonella* de aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/ml. Alíquotas de 1 ml desta solução foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas a 3.800xg (centrífuga

Eppendorf 5417C, Alemanha) durante 10 min. O sedimento obtido em cada tubo eppendorf foi ressuspenso em 1 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 apenas e também em tampão Tris 0,05 M pH 7,2 contendo as seguintes substâncias:

- a) ácido cítrico 10 mM;
- b) nisina (100 U.I/ml);
- c) nisina (100 U.I/ml) e ácido cítrico 10 mM;
- d) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml);
- e) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) e ácido cítrico 10 mM.

O pH final de cada suspensão foi ajustado para 6,0.

Os tubos eppendorf foram incubados a 37°C por 30 min, em seguida centrifugados a 3.800xg por 5 min. O sedimento foi ressuspenso em solução de NaCl 0,85% estéril. A suspensão foi então submetida à semeadura em placas de Petri com ágar BHI e XLD, em duplicatas. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. O efeito das diferentes substâncias testadas foi avaliado através da diferença entre as contagens de *Salmonella* obtidas na suspensão em tampão Tris 0,05 M pH 7,2 apenas e na suspensão em tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,2 adicionado da substância testada. O experimento foi repetido 4 vezes.

### 3.5.3 Determinação do efeito do ácido láctico

O efeito do ácido láctico foi avaliado nas seguintes condições:

- Sobre “pool” de cepas de *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6 na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a;
- Sobre *S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6 na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a mais lisozima.

### 3.5.3.1 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida.

Foram preparadas culturas de 24 h em meio BHI de cada umas das cepas de *Salmonella* (*S. Derby* SD2, *S. Enteritidis* SE3, *S. Hadar* SH4, *S. Panama* SP5 e *S. Typhimurium* ST6). Cada cultura foi centrifugada a 2.810xg por 10 min e o sedimento ressuspense em solução de NaCl 0,85% estéril, ajustando-se por diluição decimal seriada, até uma concentração final de  $10^8$  UFC/ml. Essa concentração de células sempre foi confirmada por enumeração em placas de Petri com ágar BHI e XLD incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, volumes iguais de cada cultura foram reunidos em tubos e centrifugados a 2.810xg por 10 min (centrífuga Hertich Mikro 22 R, Alemanha). O sedimento foi ressuspense em igual volume de solução tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 para obtenção de uma suspensão contendo um “pool” de cepas de *Salmonella* contendo aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/ml. Alíquotas de 1 ml desta solução foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas a 3.800xg (centrífuga Eppendorf 5417C, Alemanha) durante 10 min. O sedimento obtido em cada tubo eppendorf foi ressuspense em 1 ml de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2 apenas e também em tampão Tris 0,05 M pH 7,2 contendo as seguintes substâncias:

- a) ácido láctico 0,1%;
- b) nisina (100 U.I/ml);
- c) nisina (100 U.I/ml) e ácido láctico 0,1%;
- d) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml);
- e) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) e ácido láctico 0,1%.

Os tubos eppendorf foram incubados a 37°C por 30 min, e em seguida foram centrifugados a 3.800xg por 5 min. As células foram então lavadas com NaCl 0,85%, novamente centrifugadas nas mesmas condições e ressuspensas em NaCl 0,85% para diluição decimal seriada de cada tratamento e semeadura em placas de Petri com ágar XLD, em duplicata. Em seguida, as

placas foram incubadas a 37°C por 24h. Nisina foi usada como bacteriocina padrão. A contagem de colônias nas placas foi realizada calculando-se a média aritmética das duas duplicatas, expressa em UFC/ml. O experimento foi repetido 4 vezes.

### 3.5.3.2 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* em presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida mais lisozima

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito no 3.5.3.1, acrescentando-se ainda:

- a) lisozima 10 µg/ml;
- b) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml);
- c) extrato protéico de bacteriocina 2a e ácido láctico 0,1%;
- d) extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) e ácido láctico 0,1% e lisozima 10 µg/ml.

O pH final de cada suspensão foi ajustado para 6,0. As condições de incubação e avaliação dos resultados foram realizadas conforme descrito no item anterior.

## 3.6 Interpretação dos resultados

Para cada leitura de resultado, calculou-se a média aritmética das quatro repetições efetuadas. As médias assim obtidas foram transformadas em log UFC/ml. Para avaliação do efeito das diferentes substâncias testadas, foram construídas curvas de crescimento, plotando-se os dados de cada experimento na forma de log UFC/ml x tempo. O efeito das diferentes substâncias sobre *Salmonella* após 30 minutos de tratamento foi apresentado na forma de gráficos de barras.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Produção de bacteriocina 2a por *Lactobacillus sake* 2a em diferentes condições de cultivo

A TABELA 5 resume os resultados obtidos para a produção de bacteriocina 2a nos meios de cultivo BHI, MRS e TSB com 0,1% de glicose, nas diferentes condições de incubação testadas.

**TABELA 5**

**Produção de bacteriocina 2a por *Lactobacillus sake* 2a em meios BHI, MRS e TSB com 0,1% de glicose em aerobiose e em anaerobiose a 30°C e a 37°C**

Meio de Cultura	Temperatura (°C)	Atmosfera	Teste de Atividade*	Halo de Inibição
<b>BHI</b>	30	AEROBIOSE	POSITIVO	2 a 3 mm
		ANAEROBIOSE	POSITIVO	2 a 3 mm
	37	AEROBIOSE	POSITIVO	2 a 3 mm
		ANAEROBIOSE	POSITIVO	2 a 3 mm
<b>MRS</b>	30	AEROBIOSE	POSITIVO	4 mm
		ANAEROBIOSE	POSITIVO	4 mm
	37	AEROBIOSE	POSITIVO	4 mm
		ANAEROBIOSE	POSITIVO	4 mm
<b>TSB**</b>	30	AEROBIOSE	POSITIVO	1 mm
		ANAEROBIOSE	POSITIVO	1 mm
	37	AEROBIOSE	POSITIVO	1 mm
		ANAEROBIOSE	POSITIVO	1 mm

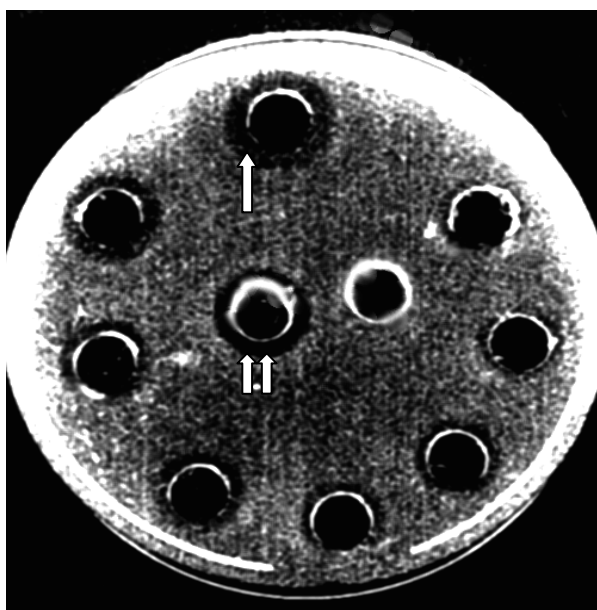
\*Positivo = Formação de halo de inibição contra *Listeria monocytogenes* Scott A *Cm<sup>r</sup> Em<sup>f</sup>*;

\*\*TSB = Formulado com 0,1% de glicose.

## 4.2 Obtenção do extrato protéico da bacteriocina 2a

O tamanho médio dos halos de inibição de *L. monocytogenes* Scott A  $Cm^r$   $Em^r$ , resultantes da atividade dos sobrenadantes das culturas de 24 horas de *L. sake* 2a obtidos em meio MRS a 30°C em anaerobiose foi de 2mm, correspondendo a 350 unidades arbitrárias de bacteriocina 2a/ml (UA/ml).

O concentrado protéico, obtido a partir de 3,5 litros de sobrenadante de cultura de *L. sake* 2a e submetido à extração ácida, diálise e concentração parcial em liofilizador, mostrou-se eficaz até a diluição de 1:20 (Figura 5). A quantidade de bacteriocina nesse concentrado foi de 500 UA/ml.



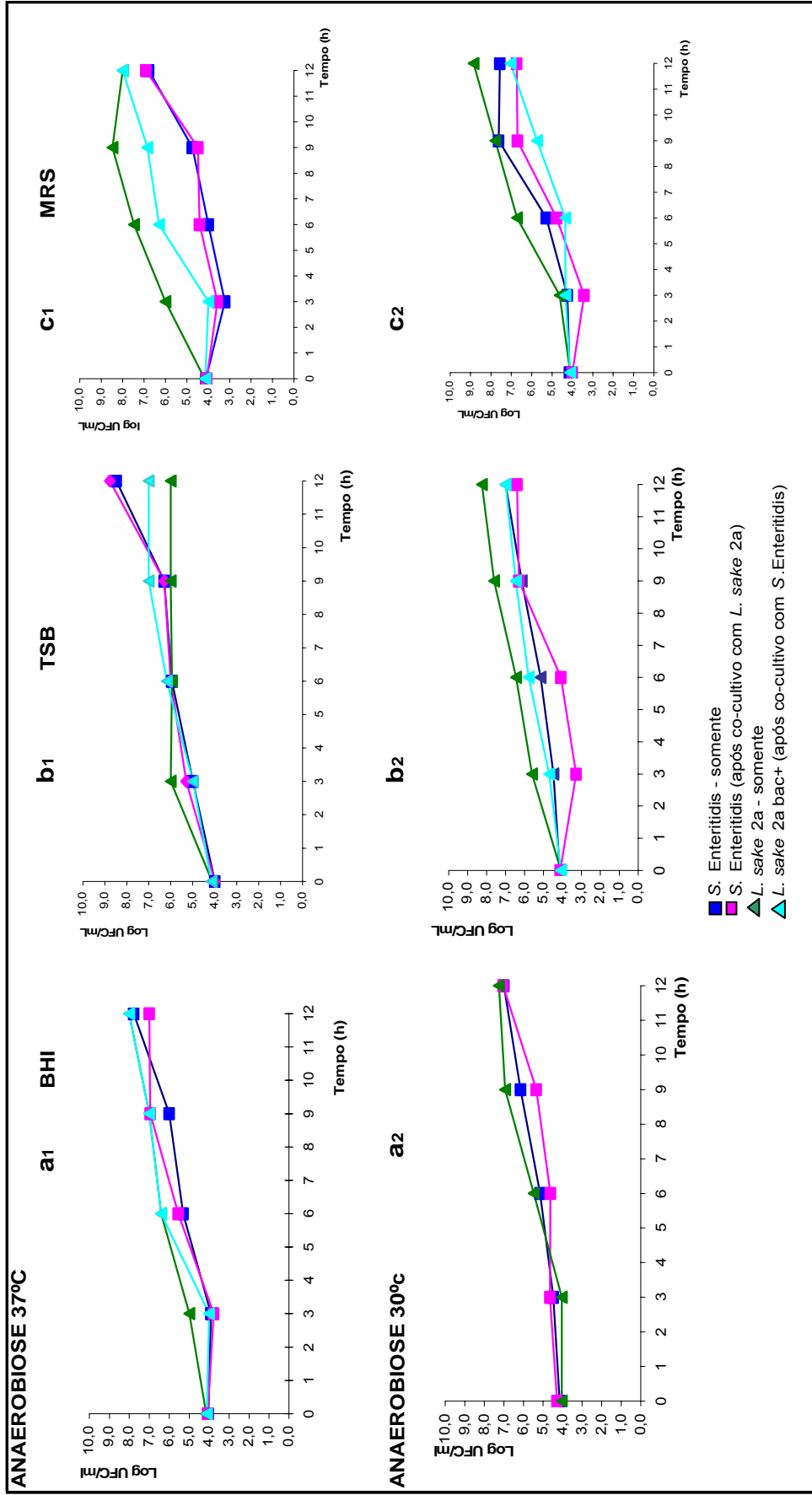
**FIGURA 5** Quantificação de bacteriocina 2a através do método de difusão em ágar. Usou-se *L. monocytogenes* Scott A  $Cm^r$   $Em^r$  como indicador. A seta única indica a formação de halo de inibição com a bacteriocina pura (sem diluição). Nos demais poços no sentido anti-horário estão as diluições 1:2; 1:4; 1:8; 1:12; 1/4; 1:16 e 1:20. As setas duplas indicam o controle positivo (nisina 100 UI/ml), e à direita, o controle negativo (tampão fosfato 10 mM).



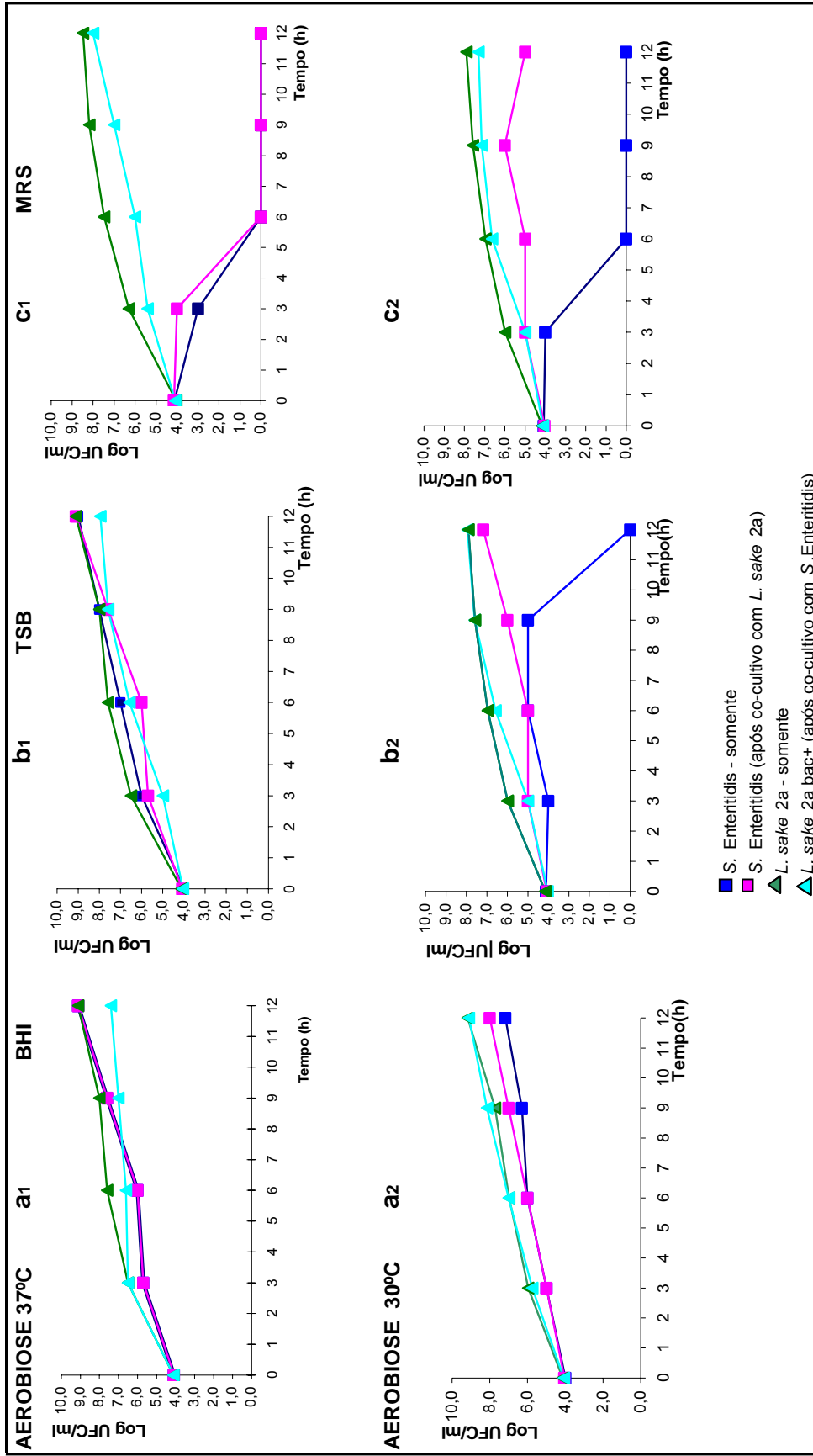
### **4.3 Determinação do efeito do efeito de *L. sake* 2a sobre a multiplicação de *Salmonella* em diferentes meios de cultura**

#### **4.3.1 Em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>**

Os resultados da multiplicação de *S. Enteritidis* SE3 em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>, nos meios de cultura BHI, TSB com 0,1% de glicose e MRS, em anaerobiose a 37°C e a 30°C podem ser visualizados na Figura 6. Os resultados referentes à multiplicação nos mesmos meios, porém em aerobiose, estão apresentados na Figura 7.



**FIGURA 6** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac<sup>+</sup> em meios BHI (a), TSB com 0,1% de glicose (b) e MRS (c) em anaerobiose a 37°C e a 30°C.



**FIGURA 7** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac<sup>+</sup> em meios BHI (a), TSB com 0,1% de glicose (b) e MRS (c) em aerobiose a 37°C e a 30°C.

Os resultados apresentados na Figura 6 indicam que em caldo BHI a 37°C e em anaerobiose (curva  $a_1$ ), os dois microrganismos multiplicaram-se bem, porém *S. Enteritidis* SE3, quando co-cultivada com *L. sake* 2a atingiu a fase estacionária em menor tempo do que em cultivo simples. *L. sake* 2a quando cultivado junto com *S. Enteritidis* não sofreu nenhuma interferência do patógeno. Em caldo BHI a 30°C em anaerobiose (curva  $a_2$ ), o desempenho de *L. sake* 2a cultivado sozinho foi aparentemente melhor do que o de *S. Enteritidis* SE3.

Em meio TSB com 0,1% de glicose, em anaerobiose a 37°C (curva  $b_1$ ) *L. sake* 2a atingiu a concentração de  $10^6$  UFC/ml em 3 horas de cultivo, mantendo-se estável em seguida. Não houve inibição de *S. Enteritidis* por *L. sake* 2a em co-cultivo com *L. sake* 2a. No mesmo meio de cultura a 30°C em anaerobiose (curva  $b_2$ ), o patógeno multiplicou-se bem quando em cultivo simples, porém foi inibido quando co-cultivado com *L. sake* 2a.

Para os cultivos feitos em caldo MRS (curvas  $c_1$  e  $c_2$ ) tanto *L. sake* 2a com *S. Enteritidis*, em cultivo simples ou em cultivo com *L. sake* 2a tiveram boa multiplicação à 30°C e a 37°C, embora *S. Enteritidis* tenha apresentado menor desenvolvimento.

De acordo com os dados apresentados na Figura 7, observa-se que em caldo BHI a 37°C e em aerobiose (curva  $a_1$ ), *S. Enteritidis* não foi inibida por *L. sake* 2a. Já a 30°C em aerobiose (curva  $a_2$ ), o co-cultivo com *L. sake* 2a foi favorável ao patógeno, que após 9 horas de cultivo, atingiu a concentração de 2 ciclos logarítmicos superior ao obtido em cultivo simples.

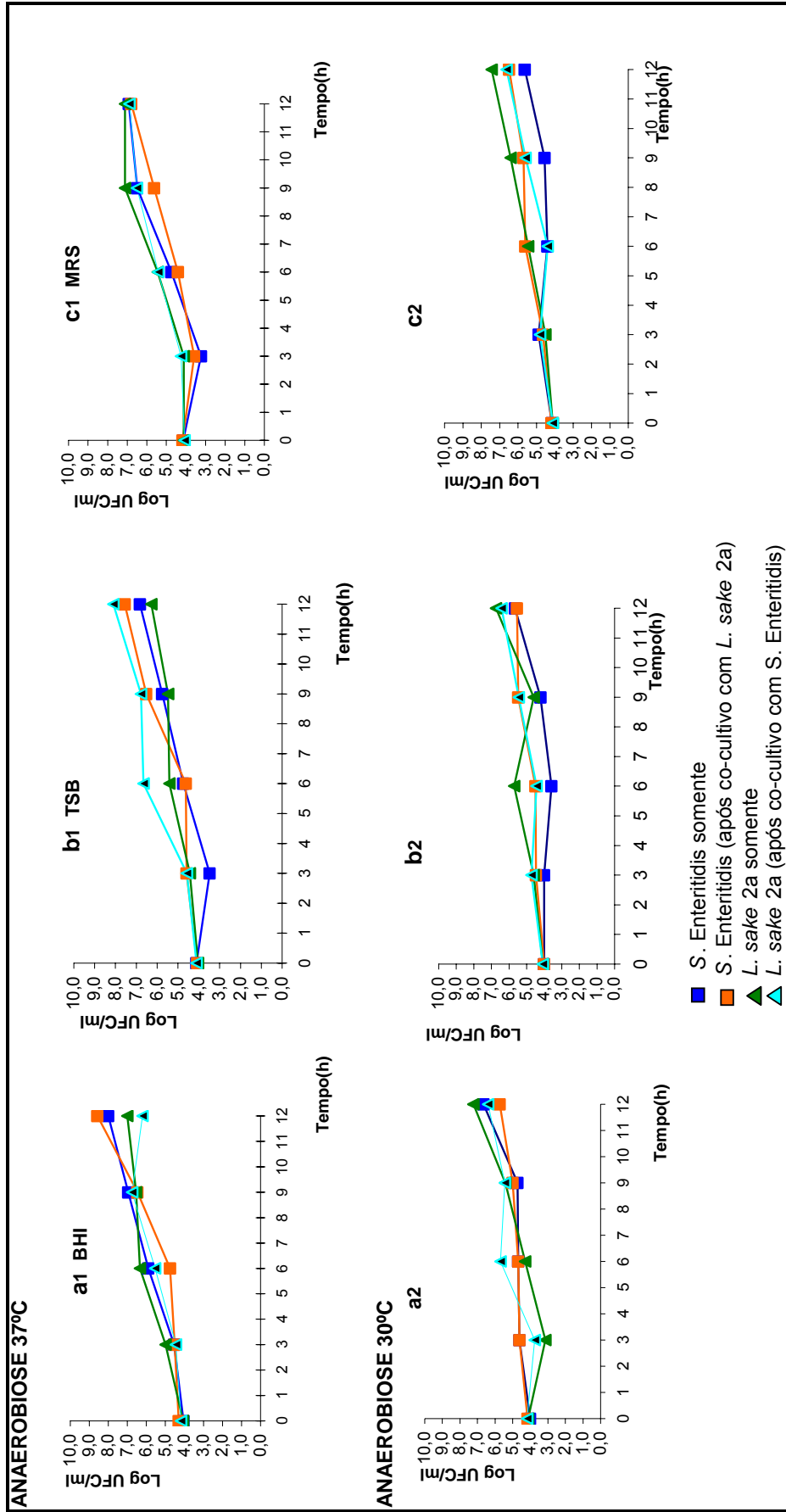
Quando cultivado em caldo TSB com 0,1% de glicose a 37°C (curva  $b_1$ ), *L. sake* 2a multiplicou-se bem, atingindo a concentração de  $10^9$  UFC/ml em 12 horas de cultivo. Para os cultivos feitos a 30°C em aerobiose nesse meio de cultura (curva  $b_2$ ), *S. Enteritidis* SE3 atingiu o máximo da fase logarítmica em 6 horas de cultivo, atingindo a concentração de  $10^5$  UFC/ml, iniciando então a fase estacionária e sem células viáveis após 12 horas de

cultivo. Entretanto na presença de *L. sake* 2a, a fase logarítmica de *Salmonella* estendeu-se até 9 horas de cultivo.

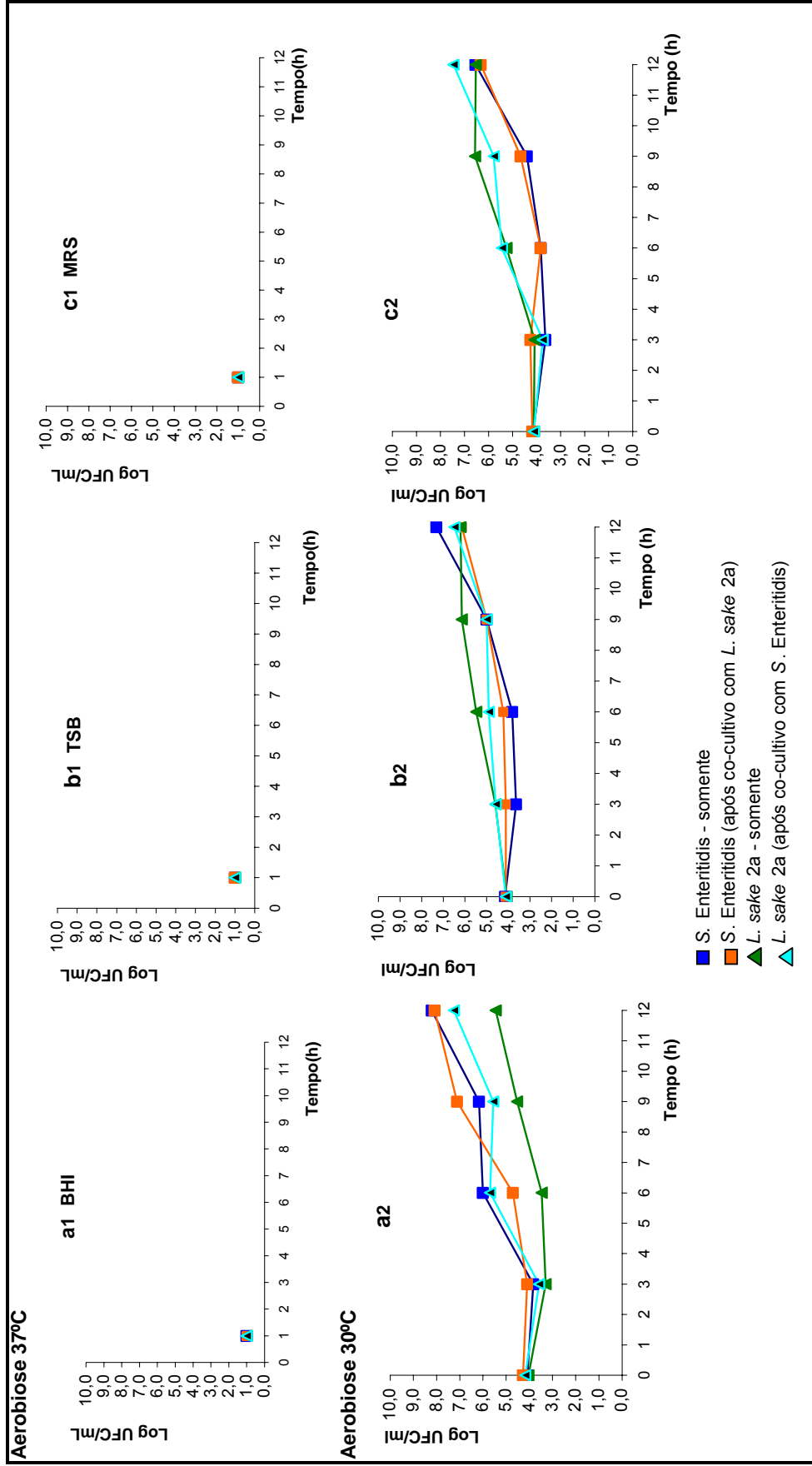
Em caldo MRS (curvas  $c_1$  e  $c_2$ ), não houve multiplicação de *S. Enteritidis* SE3, em cultivo simples ou em co-cultivo com *L. sake* 2a a 37°C. Após 3 horas não foi mais possível detectar a presença de células viáveis do patógeno. Em relação à de multiplicação de *L. sake* 2a nesse meio, a concentração de *L. sake* quando em presença do patógeno foi de cerca de 2 ciclos logarítmicos mais baixa do que quando cultivo simples. Na temperatura de 30°C em aerobiose *S. Enteritidis* SE3 manteve-se em  $10^4$  UFC/ml nas 3 primeiras horas de cultivo e depois declinou.

#### 4.3.2 Em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>-</sup>

Os resultados obtidos com os co-cultivos de *S. Enteritidis* e *L. sake* 2a bac<sup>-</sup>, realizados nos meios BHI, TSB com 0,1% de glicose e MRS em anaerobiose e em aerobiose a 37°C ou 30°C, mostraram que o poder inibitório de *L. sake* 2a não produtor de bacteriocina, sobre *S. Enteritidis* SE3 foi menor do que o observado com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>. Os dados podem ser visualizados nos gráficos das Figuras 8 e 9.



**FIGURA 8** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac- em meios BHI (curvas a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>), TSB com 0,1% de glicose (curvas b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) e MRS (curvas c<sub>1</sub> e c<sub>2</sub>) em anaerobiose a 37°C e a 30°C.

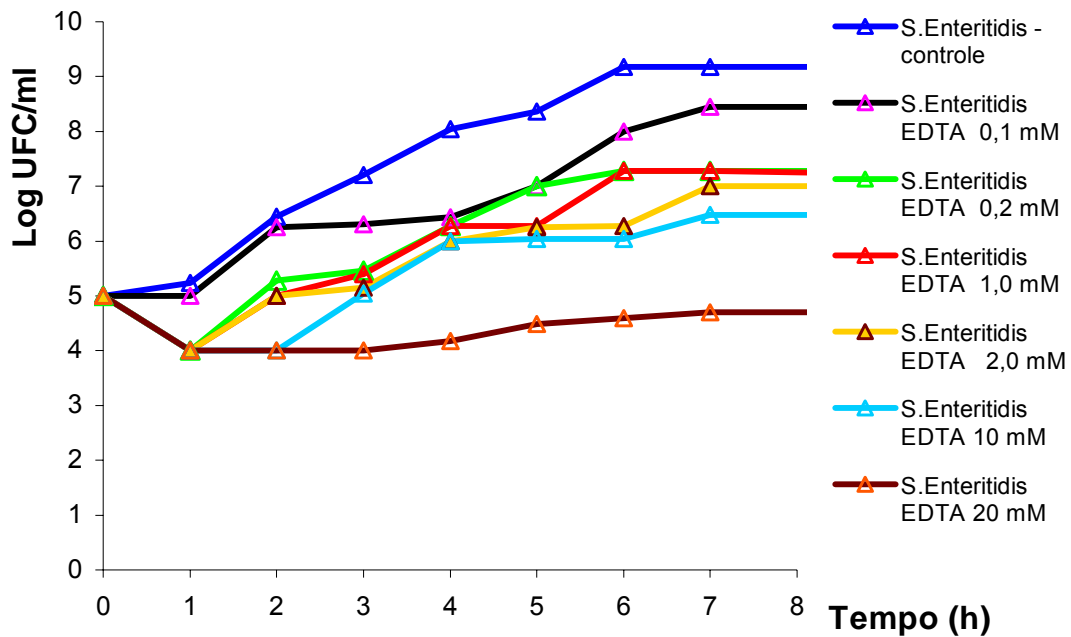


**FIGURA 9** Cinética de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis em co-cultivo com *Lactobacillus sake* 2a bac- em meios BHI (curvas a<sub>1</sub> e a<sub>2</sub>), TSB com 0,1% de glicose (curvas b<sub>1</sub> e b<sub>2</sub>) e MRS (curvas c<sub>1</sub> e c<sub>2</sub>) em aerobiose a 37°C e a 30°C.

#### 4.4 Determinação do efeito do EDTA

##### 4.4.1 Efeito sobre *Salmonella* Enteritidis SE3 em cultivo simples

O cultivo de *S. Enteritidis* SE3 em caldo BHI com diferentes concentrações de EDTA revelou que este composto inibiu a multiplicação do patógeno desde as primeiras horas de cultivo (Figura 10).

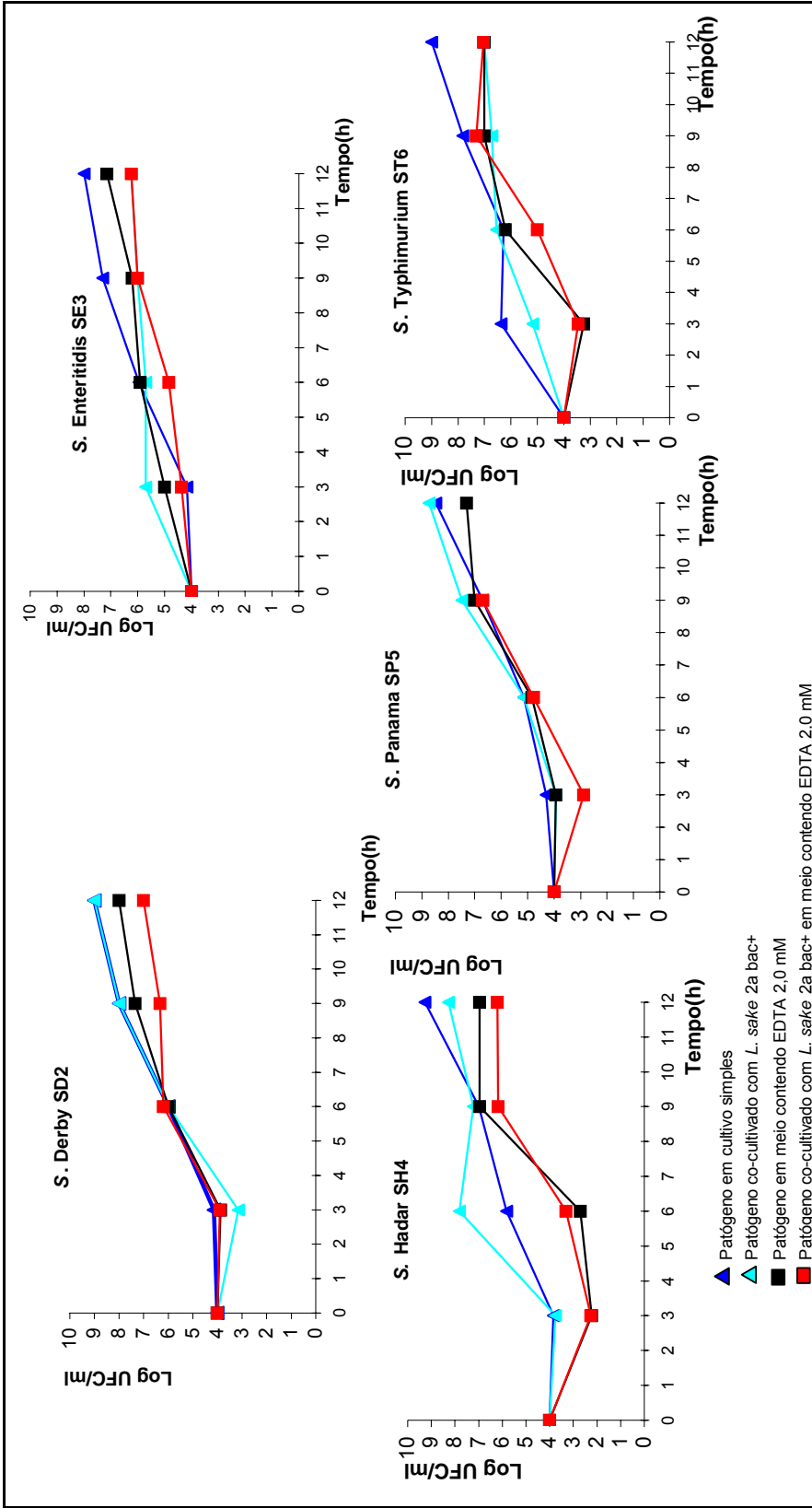


**FIGURA 10** Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE3 (Log UFC/ml) em caldo BHI contendo diferentes concentrações de EDTA em aerobiose a 37°C

##### 4.4.2 Efeito sobre cepas de *Salmonella* em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>

A Figura 11 mostra as curvas de multiplicação de cepas de *Salmonella* pertencentes aos cinco sorotipos estudados, co-cultivadas com *L. sake* 2a em meio BHI contendo EDTA 2,0 mM em aerobiose a 37°C. A multiplicação do patógeno na presença do quelante e em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> teve uma média de inibição de 2 a 3 ciclos logarítmicos em relação ao seu cultivo simples ou em co-cultivo com *L. sake* 2a sem o quelante, ao longo das 12 horas de cultivo.

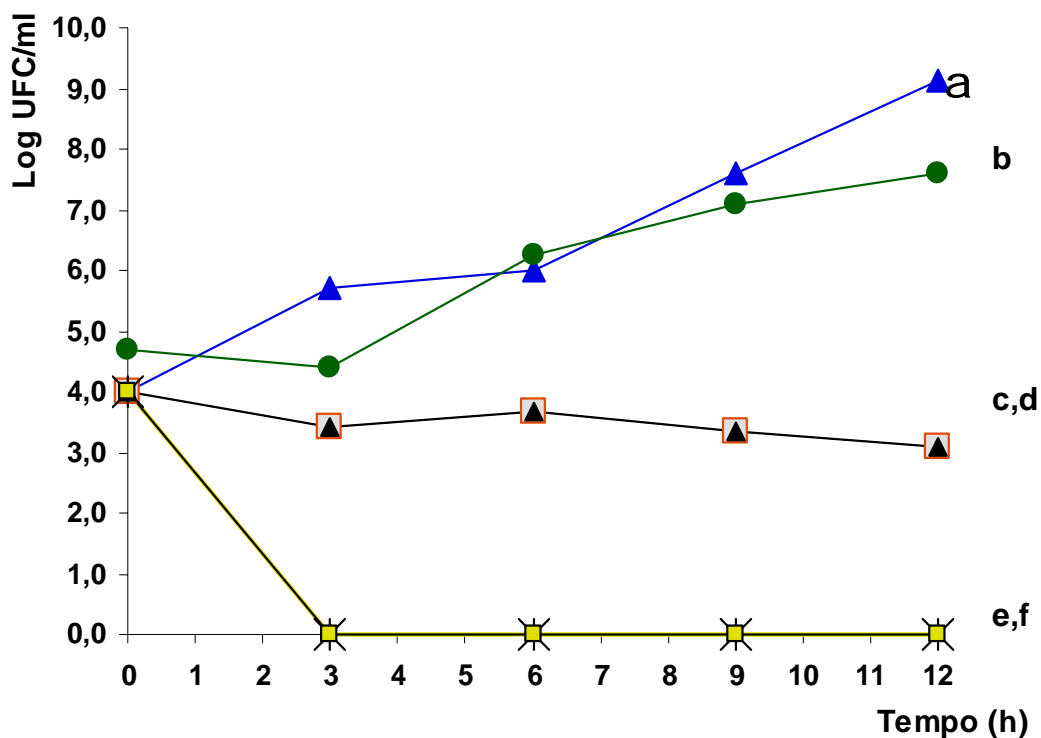




**FIGURA 11** Efeito do EDTA 2,0 mM sobre a multiplicação de cepas de *Salmonella* em meio BHI em aerobiose a 37°C.

#### 4.4.3 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* em meio BHI em aerobiose a 37°C, em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>

O co-cultivo do “pool” de cepas de *Salmonella* com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> em meio BHI contendo EDTA 10 mM ou 20 mM, em aerobiose a 37°C, resultou na eliminação do patógeno em apenas 3 horas de cultivo (curvas e,f). Na ausência de *L.sake* 2a bac<sup>+</sup> mas com o uso do EDTA nas duas concentrações, o patógeno foi inibido em até 5 ciclos logarítmicos em 12 h de cultivo (Figura 12, curvas c,d).



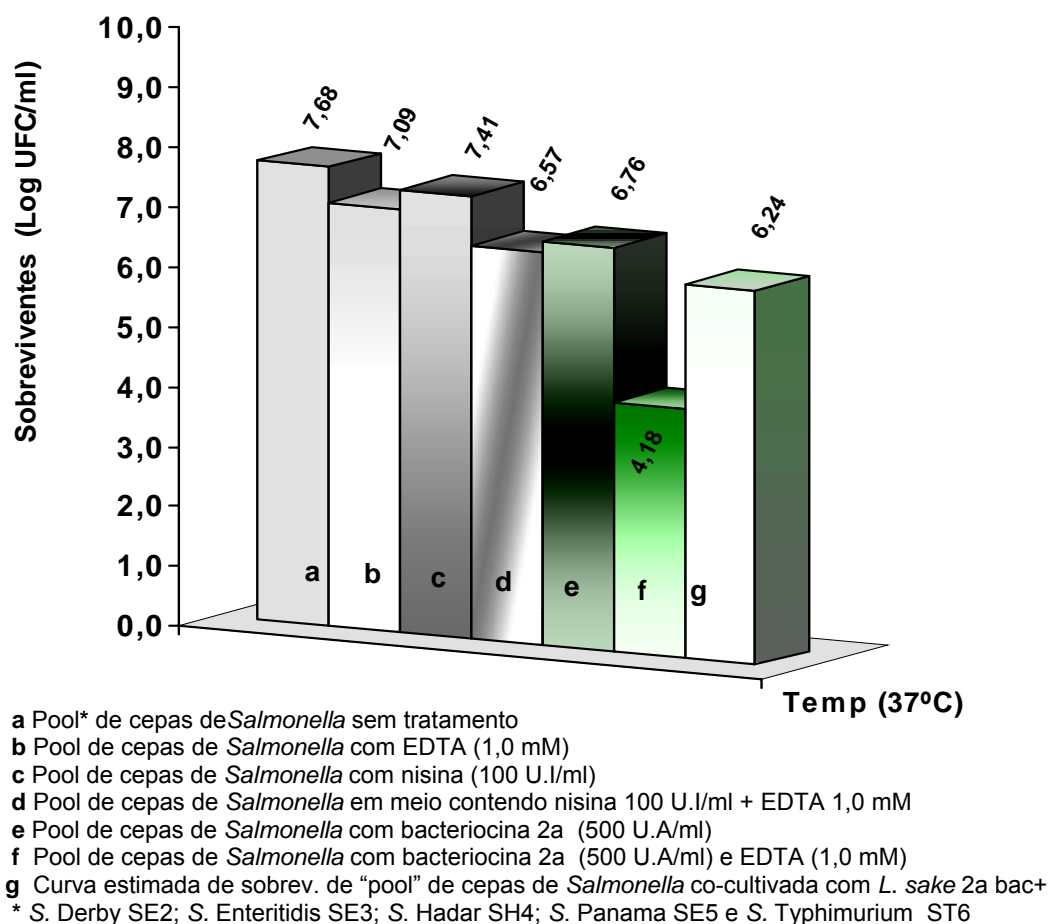
- a Pool\* de cepas de *Salmonella* sem tratamento  
 b Pool de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>  
 c Pool de cepas de *Salmonella* em meio contendo EDTA 20 mM  
 d Pool de cepas de *Salmonella* em meio contendo EDTA 10 mM  
 e Pool de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> em meio contendo EDTA 10 mM  
 f Pool de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> em meio contendo EDTA 20 mM  
 \* *S. Derby* SE2; *S. Enteritidis* SE3; *S. Hadar* SH4; *S. Panama* SE5 e *S. Typhimurium* ST6

**FIGURA 12** Efeito do EDTA (10 mM ou 20 mM) sobre a multiplicação do “pool” de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *Lactobacillus sake* 2a bac<sup>+</sup> em meio BHI em aerobiose a 37°C.

#### 4.4.4 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida

A Figura 13 apresenta os resultados do efeito do EDTA 1,0 mM na sobrevivência de “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a. Esta figura mostra o número de sobreviventes determinados após 30 minutos de ação do EDTA sobre uma cultura contendo cerca de  $5 \times 10^7$  UFC/ml.

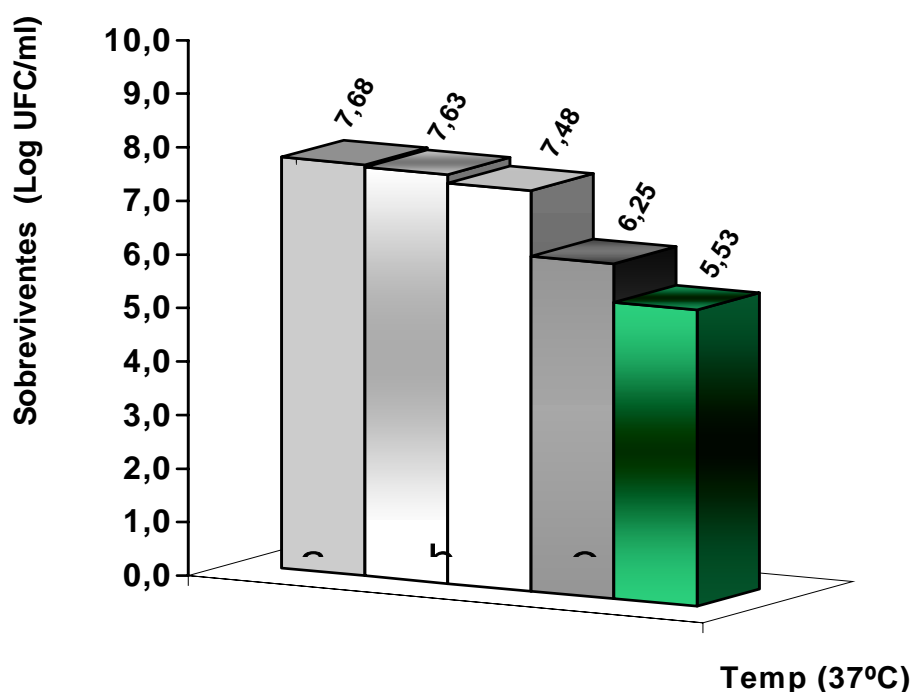
Os dados indicam que a bacteriocina 2a teve sua ação de inibição de *Salmonella*, potencializada pelo EDTA (barra f na Figura 13), com redução de 3,5 ciclos logarítmicos (barra a na Figura 13).



**FIGURA 13** Efeito combinado de EDTA 1,0 mM e extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) na sobrevivência de “pool” de cepas de *Salmonella*.

#### 4.4.5 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida e lisozima

A Figura 14 mostra os resultados do efeito do EDTA 1,0 mM na sobrevivência do “pool” de cepas de *Salmonella* na presença do extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida e lisozima. Essa figura mostra o número de sobreviventes determinados após 30 minutos de ação do EDTA sobre uma cultura contendo cerca de  $5 \times 10^7$  UFC/ml.



- a Pool\* de cepas de *Salmonella* sem tratamento  
 b Pool de cepas de *Salmonella* com lisozima (10 µg/ml)  
 c Pool de cepas de *Salmonella* com lisozima (10 µg/ml) e EDTA (1,0 mM)  
 d Pool de cepas de *Salmonella* com nisina (100 U./ml), EDTA (1,0 mM) e lisozima (10 µg/ml)  
 e Pool de cepas de *Salmonella* com bacteriocina 2a (500 U.A./ml) EDTA (1,0 mM) e lisozima (10 µg/ml)  
 \* S. Derby SE2; S. Enteritidis SE3; S. Hadar SH4; S. Panama SE5 e S. Typhimurium ST6

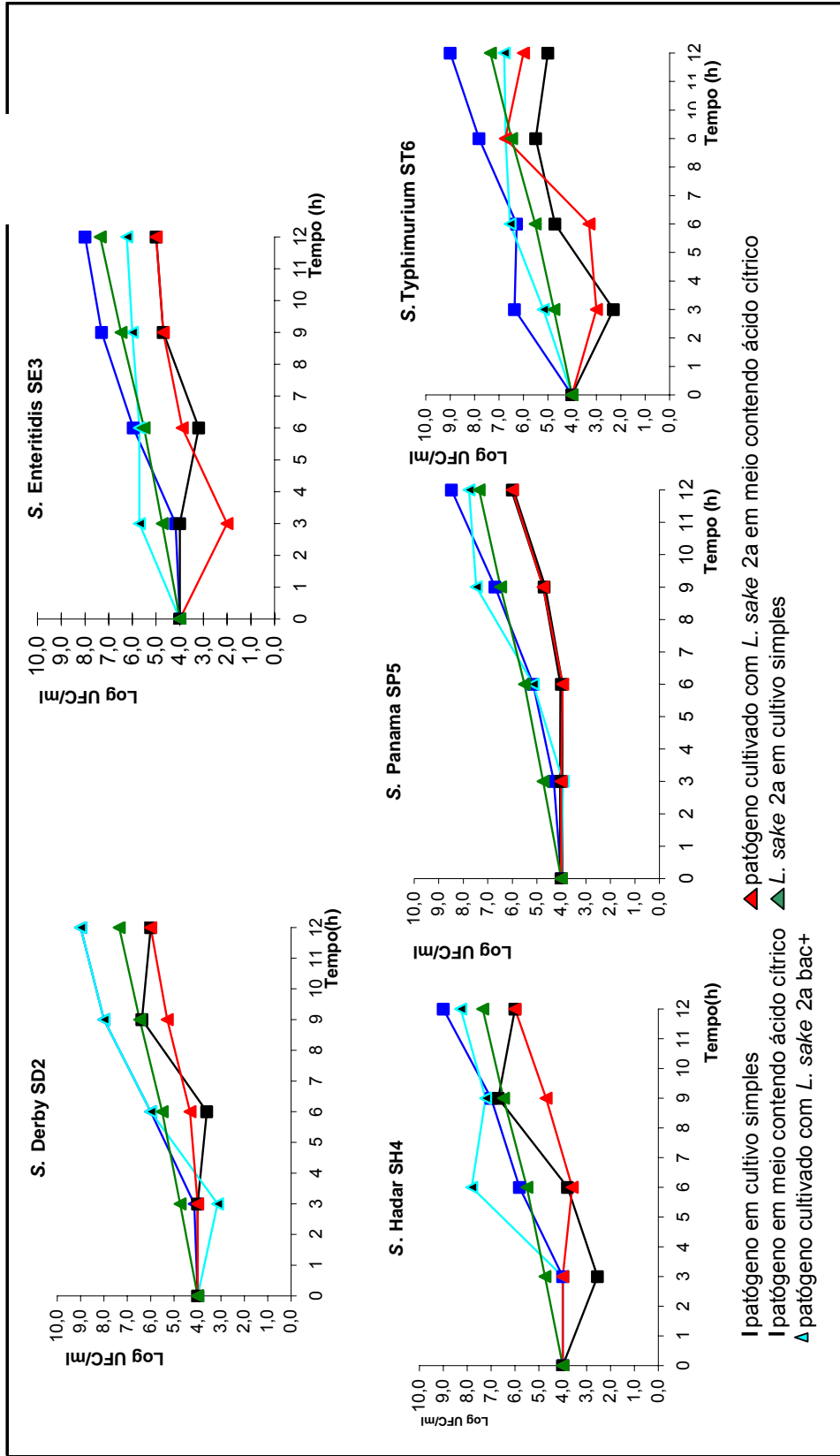
**FIGURA 14** Efeito combinado de EDTA 1,0 mM, extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A./ml) e lisozima (10 µg/ml) na sobrevivência de “pool” de cepas de *Salmonella*.

Quando o “pool” de cepas de *Salmonella* foi submetido à ação combinada do extrato protéico de bacteriocina 2a com lisozima (barra “e” da Figura 14), verificou-se uma redução do número de sobreviventes do patógeno em aproximadamente 2 ciclos logarítmicos em relação ao grupo não tratado (barra “a” da Figura 14).

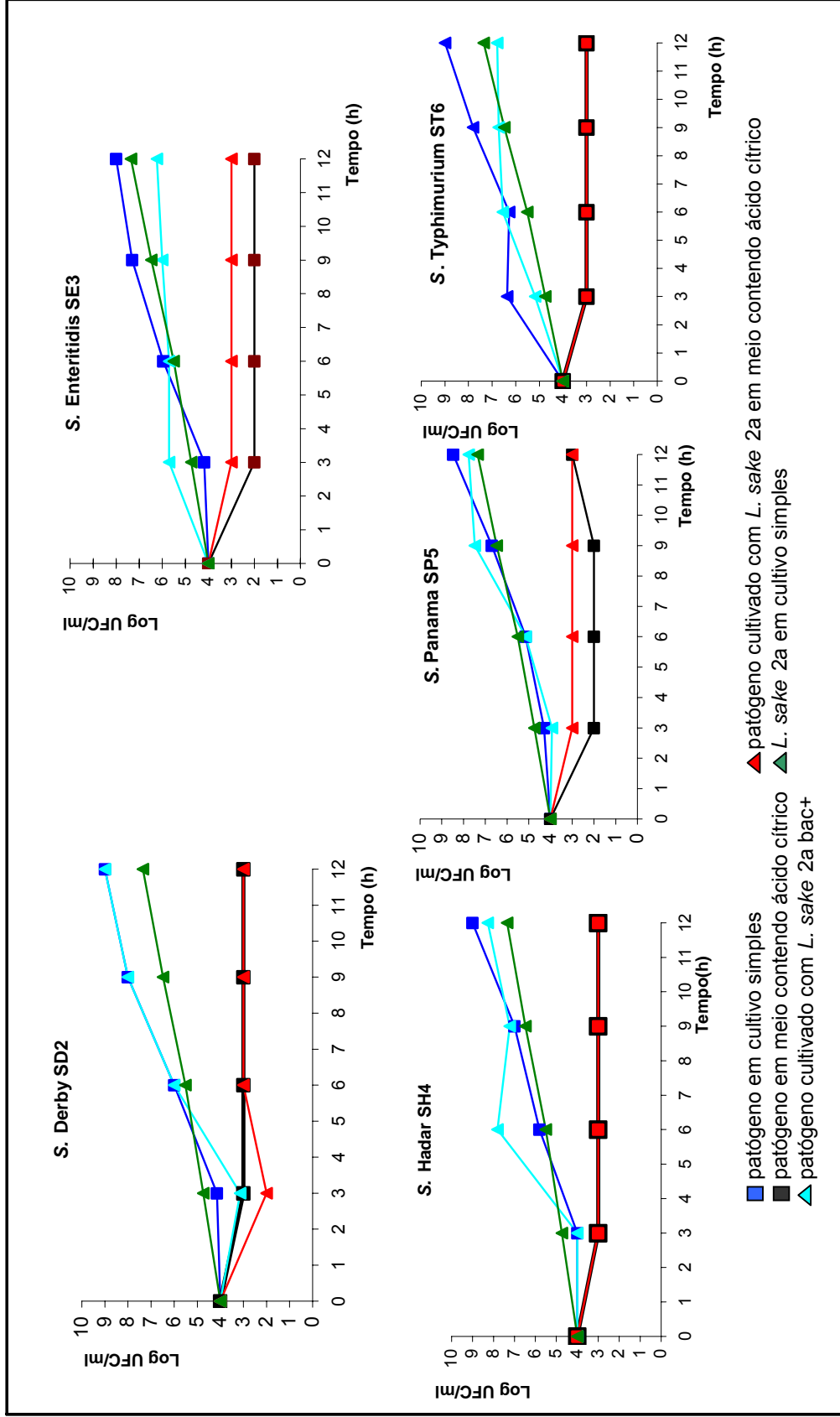
#### 4.5 Determinação do efeito do ácido cítrico

##### 4.5.1 Efeito sobre cepas de *Salmonella* em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> em meio BHI contendo ácido cítrico 10 mM ou 20 mM em aerobiose a 37°C

Os resultados dessa avaliação estão apresentados nas Figuras 15 e 16. Observa-se que a multiplicação de cepas de *Salmonella* foi inibida em meio BHI contendo ácido cítrico em co-cultivo com *L. sake* 2a bac<sup>+</sup> ou em meio contendo apenas o ácido. Ao final de 12 horas de cultivo observou-se uma média de inibição de 3 a 6 ciclos logarítmicos para as concentrações de ácido cítrico 10 mM e 20 mM, respectivamente, em relação ao grupo não tratado (sem ácido e sem *L. sake* 2a bac<sup>+</sup>).



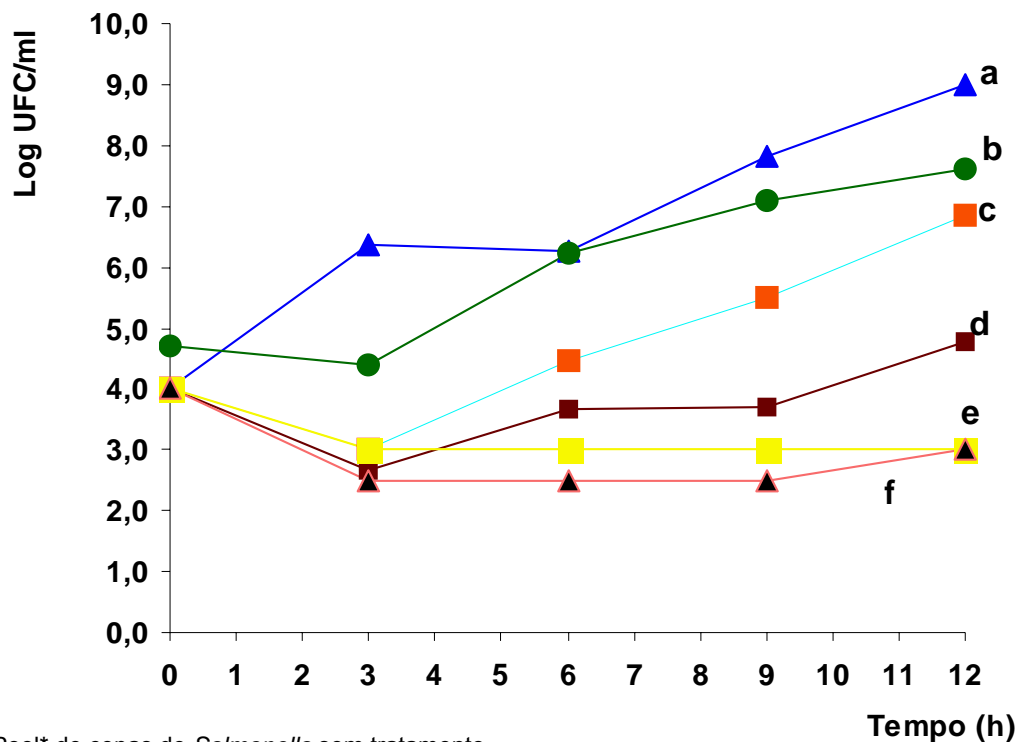
**FIGURA 15** Efeito do ácido cítrico (10 mM) sobre a multiplicação de cepas de *Salmonella* co-cultivada com *L. sake* 2a em meio BHI em aerobiose a 37°C.



**FIGURA 16** Efeito do ácido cítrico (20 mM) sobre a multiplicação de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *L. sake* 2a bac+ em meio BHI em em aerobiose a 37°C.

#### 4.5.2 Efeito sobre “pool” de cepas de *Salmonella* em meio BHI contendo ácido cítrico 10 mM ou 20 mM em aerobiose a 37°C.

A Figura 17 apresenta os resultados do co-cultivo do “pool” de *Salmonella* com *L. sake 2a bac<sup>+</sup>* em meio BHI em aerobiose a 37°C, contendo ácido cítrico 10 mM ou 20 mM. Evidenciou-se uma redução final de até 6 ciclos logarítmicos (curvas **c**, **e**) do patógeno em relação ao grupo não tratado (curva **a**). Houve também uma inibição acentuada do patógeno quando cultivado apenas com ácido cítrico 20 mM (sem o lactobacilo), embora o resultado após 12 horas de cultivo tenha sido o mesmo para o tratamento em co-cultivo com *L. sake bac<sup>+</sup>* na presença do ácido.



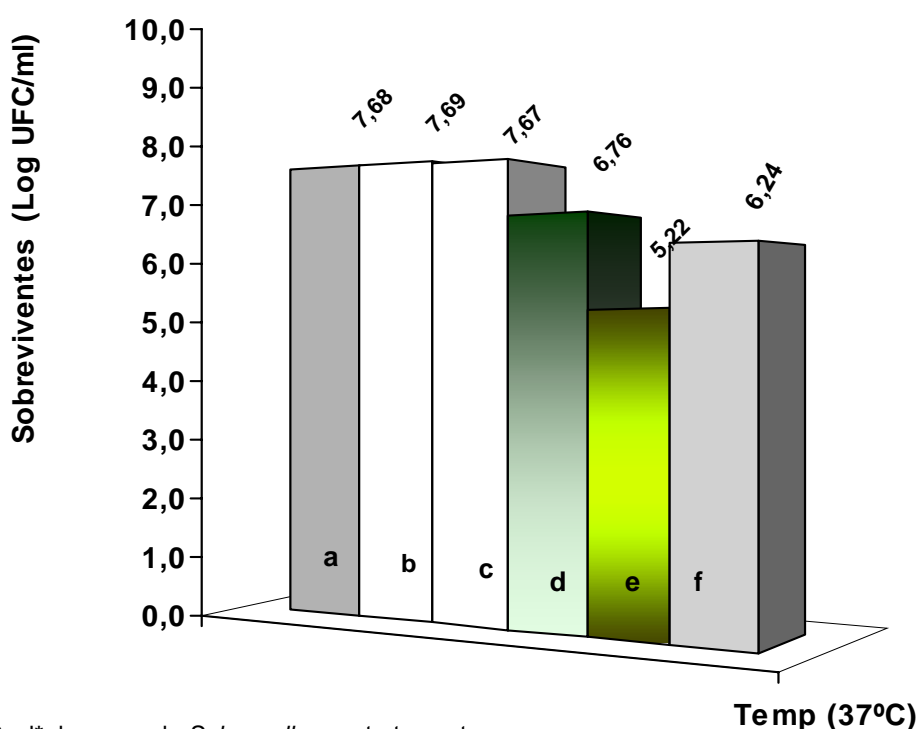
- a Pool\* de cepas de *Salmonella* sem tratamento  
 b Pool de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *L. sake 2a bac<sup>+</sup>*  
 c Pool de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *L. sake 2a bac<sup>+</sup>* em meio contendo ácido cítrico 10 mM  
 d Pool de cepas de *Salmonella* em meio contendo ácido cítrico 10 mM  
 e Pool de cepas de *Salmonella* co-cultivadas com *L. sake 2a bac<sup>+</sup>* em meio contendo ácido cítrico 20mM  
 f Pool de cepas de *Salmonella* em meio contendo ácido cítrico 20 mM  
 \* *S. Derby* SE2; *S. Enteritidis* SE3; *S. Hadar* SH4; *S. Panama* SE5 e *S. Typhimurium* ST6

**FIGURA 17** Efeito do ácido cítrico (10 mM ou 20 mM) sobre a multiplicação de “pool” de cepas de *Salmonella* em co-cultivo com *Lactobacillus sake 2a bac<sup>+</sup>* em meio BHI em aerobiose a 37°C.



#### 4.5.3 Efeito sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida

A Figura 18 apresenta os dados do efeito combinado de extrato protéico de bacteriocina 2a e ácido cítrico 10 mM na sobrevivência de “pool” de cepas de *Salmonella*. Verificou-se que houve uma redução no número de sobreviventes do patógeno em cerca de 2,5 ciclos logarítmicos (curva e) em relação ao grupo não tratado (curva a) ou tratado apenas com ácido cítrico (curva b).



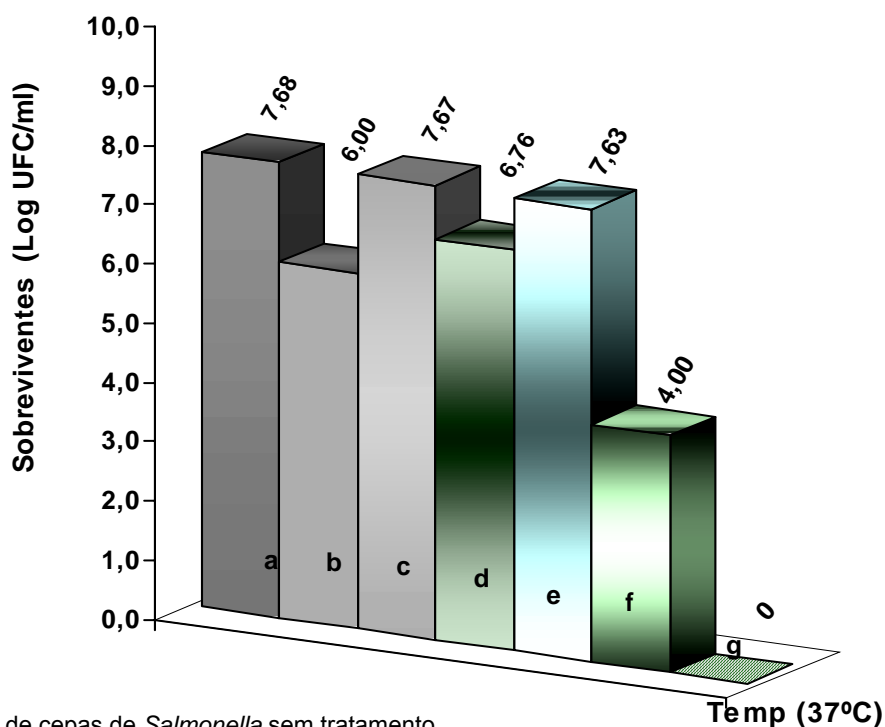
- a Pool\* de cepas de *Salmonella* sem tratamento  
b Pool de cepas de *Salmonella* com ácido cítrico 10 mM  
c Pool de cepas de *Salmonella* com nisina 100 UI/ml e ácido cítrico 10 mM  
d Pool de cepas de *Salmonella* com bacteriocina 2a (500 U.A/ml)  
e Pool de cepas de *Salmonella* com bacteriocina 2a (500 U.A/ml) e ácido cítrico  
f Curva estimada de sobreviventes de “pool” de cepas de *Salmonella* com *L.sake* 2a bac<sup>+</sup>  
\* S. Derby SE2; S. Enteritidis SE3; S. Hadar SH4; S. Panama SE5 e S. Typhimurium ST6

**FIGURA 18** Efeito combinado de ácido cítrico 10 mM e extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) na sobrevivência de “pool” de cepas de *Salmonella*.

## 4.6 Determinação do efeito do ácido láctico

### 4.6.1 Efeito sobre “pool” de cepas de *Salmonella* na presença de extrato protéico de bacteriocina 2a obtido por extração ácida ou em combinação com lisozima.

A Figura 19 apresenta os resultados dos tratamentos realizados com “pool” de cepas de *Salmonella*. A combinação ácido láctico e lisozima (curva f) reduziu cerca de 3,7 ciclos logarítmicos a população de sobreviventes de “pool” de cepas de *Salmonella* em relação ao grupo sem tratamento (curva a). Já a combinação ácido láctico e bacteriocina 2a (curva g) eliminou a população de “pool” de *Salmonella* submetida ao tratamento.



- a Pool\* de cepas de *Salmonella* sem tratamento  
 b Pool de cepas de *Salmonella* com ácido láctico 0,1%  
 c Pool de cepas de *Salmonella* com nisina 100 UI/ml e ácido láctico 0,1%  
 d Pool de cepas de *Salmonella* com bacteriocina 2a (500 U.A/ml)  
 e Pool de cepas de *Salmonella* com lisozima (10 µg/ml)  
 f Pool de cepas de *Salmonella* com lisozima (10 µg/ml) e ácido láctico 0,1%  
 g Pool de cepas de *Salmonella* com bacteriocina 2a (500 U.A/ml) e ácido láctico 0,1%  
 \* S. Derby SE2; S. Enteritidis SE3; S. Hadar SH4; S. Panama SE5 e S. Typhimurium ST6

**FIGURA 19** Efeito combinado do ácido láctico 0,1% e extrato protéico de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) na sobrevivência de “pool” de cepas de *Salmonella*.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstrou-se que *Lactobacillus sake* 2a foi capaz de produzir bacteriocina com atividade contra *Listeria monocytogenes* Scott A Cm<sup>r</sup> Em<sup>r</sup> nos meios de cultura BHI, MRS e TSB com 0,1% de glicose, independente da temperatura e atmosfera de incubação. Verificou-se, no entanto, que os halos produzidos no meio MRS eram maiores que nos demais meios (Tabela 5). De forma similar, ROSA *et al.* (2002) verificaram que o meio MRS foi mais eficiente para produção de bacteriocina que o meio APT, já que a atividade antimicrobiana de bacteriocina 2a, medida através de teste de difusão em ágar, foi menor em meio APT em todas as faixas de temperaturas testadas (11°C, 25°C, 30°C, 37° e 42°C).

A observação de halos de inibição maiores no meio MRS a 30°C do que em BHI e TSB com 0,1% de glicose, tanto a 30°C quanto à 37°C, apenas confirma que o meio MRS é o que tem as melhores condições para que *L. sake* 2a produza seus metabólitos adequadamente em termos de quantidade e efetividade. DE VUYST e VANDAMME (1992) verificaram que as melhores condições para a multiplicação celular eram também as melhores para a produção das bacteriocinas Ach, nisina, sakacina A e leucocina Lcm 1. O MRS também foi considerado o melhor meio de cultura para a produção de lactocina 705 por *Lactobacillus casei* CRL 705, sendo que a presença de tween neste meio de cultura parece ser um ponto favorável, uma vez que seu efeito surfactante na membrana celular

bacteriana interfere na sua permeabilidade e aumenta a difusão da bacteriocina, a exemplo de outras bacteriocinas estudadas (VIGNOLO *et. al.*, 1995)

Apesar da clara superioridade do meio MRS em relação aos demais meios testados para a produção de bacteriocina, o MRS não foi o meio selecionado para avaliar os efeitos dos compostos antimicrobianos em combinação com a bacteriocina produzida pelo *L. sake* 2a, por ser inadequado ao cultivo de *Salmonella*. Assim, entre os dois outros meios avaliados, optou-se pelo BHI, pois ambos *L. sake* e *Salmonella* multiplicaram-se bem nesse meio a 37°C em aerobiose.

No presente estudo, a extração ácida mostrou-se bastante eficiente para a concentração da bacteriocina produzida por *L. sake* 2a, sem perda da sua atividade biológica. Verificou-se que a atividade inibitória contra *L. monocytogenes* Scott A Cm<sup>f</sup> Em<sup>f</sup> ainda podia ser observada no material concentrado diluído 1:20. Conforme YANG *et al.* (1992) esse processo de extração baseia-se no fato de as bacteriocinas adsorvidas às células produtoras em pH 6,0-6,5 serem liberadas quando o pH é abaixado para 1,5-2,0. As bacteriocinas liberadas no meio podem então ser submetidas a um processo de concentração.

Baseando-se nos estudos de STEVENS *et al.* (1991,1992), GILL, HOLLEY (2000a,b); HELANDER, MATTILA-SANDOHOLM (2000a, b), o uso de EDTA foi estudado como um agente facilitador da ação bacteriocina, em combinação ou não com outros antimicrobianos sobre *Salmonella*.

STEVENS *et al.* (1991) observaram que o uso de nisina na concentração de 50 µg/ml em combinação com EDTA (20 mM) foi capaz de reduzir de 3 a 6 ciclos logarítmicos as populações de diferentes sorotipos de *Salmonella*. Este e outros estudos já realizados (MAHADEO e TATINI,1994; CUTTER e SIRAGUSA,1999) indicam que não existe ainda uma concentração padrão de uso para nisina quando se visa ação em patógenos Gram positivos ou

Gram negativos, havendo grande variação nas concentrações usadas indo de 50 U.I/ml a 2.500 U.I/ml. Essas variações devem-se a diferenças nos sistemas de estudo, nos tipos de tratamentos empregados no microrganismo alvo. Assim, por exemplo, MAHADEO e TATINI (1994) utilizaram nisina na concentração de 100 U.I/ml, obtendo uma redução de mais de 4 ciclos logarítmicos na suspensão de *L. monocytogenes*, enquanto o mesmo tratamento aplicado às células aderidas à superfície de pele de peru causou uma redução de apenas um ciclo logarítmico. CUTTER e SIRAGUSA (1999) demonstraram que tratamentos com 50 U.I/ml de nisina pura, ou em combinação com 50 mM de EDTA, tiveram pouco efeito sobre *S. Typhimurium* ou *E. coli* (menos que 0,5 ciclos logarítmicos). Em virtude disto, no presente estudo optou-se pela concentração de 100 U.I/ml de nisina para efeito de comparação desta bacteriocina em relação à bacteriocina 2a do *L. sake 2a*.

A ação de nisina em combinação com permeabilizadores de membrana externa de patógenos como *Salmonella*, foi também avaliada por STEVES *et al.* (1991,1992); HELANDER, MATTILA-SANDHOLM (2000b) e GILL e HOLLEY, (2000a). No presente estudo, os experimentos de co-cultivo de cada um dos cinco sorotipos de *Salmonella* com *L. sake 2a* na presença de EDTA 2,0 mM, mostraram que esse composto tem efeito no aumento da ação inibidora de *L. sake 2a* bac<sup>+</sup> mas não houve diferença de resposta entre os cinco sorotipos de *Salmonella*. A média de redução na multiplicação dos sorotipos tratados com EDTA 2,0 mM em meio BHI a 37°C foi cerca de 3 ciclos logarítmicos (Figura 11). Essa diferença poderia ter sido maior não fosse uma queda do pH do meio de 7,0 para 5,0 após 6 horas de cultivo, causada pela produção de ácido por *L. sake 2a*. BOZIARIS e ADAMS (1999) realizaram estudos semelhantes em caldo fermentado, verificando que a redução de pH causou uma redução no poder de quelação do EDTA. De fato, nas 3 primeiras horas de cultivo, a população de *Salmonella* baixou de 1 a 2 ciclos logarítmicos, mas recuperou-se após 6 horas de cultivo. Todavia, mesmo com recuperação, tratamento do patógeno com EDTA apenas ou EDTA na presença de *L.sake 2a* ainda ficou abaixo de seu grupo controle (*Salmonella* em cultivo simples).

A ação combinada de extrato protéico de bacteriocina 2a com EDTA sobre o “pool” de cepas de *Salmonella* foi mais acentuada do que a combinação nisina/EDTA (Figura 13). No primeiro caso, houve redução de 3,5 ciclos logarítmicos enquanto no segundo a redução foi de 1 ciclo logarítmico apenas. A combinação bacteriocina 2a/EDTA foi mais efetiva na inibição do “pool” de cepas de *Salmonella* do que a combinação bacteriocina 2a/EDTA/lisozima, que por sua vez foi mais efetiva do que a combinação nisina/EDTA (Figuras 13 e 14).

Apesar de a lisozima ser ineficaz como inibidora de Gram negativos em virtude da presença da membrana externa que protege o peptidoglicano., esperava-se que a ação conjunta de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) com lisozima (10 µg/ml) e com EDTA (1,0 mM) fosse mais efetiva que a combinação sem lisozima na redução ou eliminação do “pool” de *Salmonella*. Conforme já observado CHUNG e HANCOCK (2000) a interação de substâncias antimicrobianas e sua ação em patógenos Gram negativos parecem ser mais complexas do que o que se observa com patógenos Gram positivos.

Com relação ao ácido cítrico, observou-se que na concentração de 10 mM este ácido foi menos inibitório para *Salmonella* que o EDTA na mesma concentração para os mesmos tipos de experimentos. Na concentração de 20 mM, o ácido cítrico teve o mesmo efeito que o EDTA 20 mM. BOZIARIS e ADAMS (1999) realizaram estudos em caldo fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina, adicionado de EDTA 10 mM ou de ácido cítrico 20 mM, mais um pool de patógenos constituído por linhagens de *Escherichia coli*, *S. Enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que o EDTA foi mais eficaz na inibição dos patógenos que o ácido cítrico. Os autores também observaram que as cepas de *Salmonella* apresentaram maior sensibilidade que as de *E. coli*, provavelmente em função da baixa tolerância à produção de ácido do que pela ação da bacteriocina na presença de EDTA.

Nos experimentos de ação do ácido cítrico 10 mM em combinação com bacteriocina 2a (500 U.A/ml) sobre “pool” de cepas de *Salmonella*, verificou-se que essa combinação não eliminou o patógeno, mas foi eficiente em sua inibição.

A ação combinada de bacteriocina 2a (500 U.A/ml) com ácido láctico (0,1%) ou de lisozima (10 µg/ml) com ácido láctico (0,1%) sobre “pool” de cepas de *Salmonella* causou duas respostas bem distintas: a primeira combinação eliminou toda a população do patógeno enquanto a segunda reduziu a população do patógeno em 3 ciclos logarítmicos em relação ao grupo não tratado. Evidenciou-se portanto uma ação mais eficiente com a combinação ácido láctico e bacteriocina 2a. ALAKOMI *et al.* (2001) verificaram que a ação de permeabilização do ácido láctico se dá através da liberação de lipopolissacarídeo de membrana externa, e que este ácido potencializa a ação de outras substâncias antimicrobianas sobre patógenos Gram negativos. No presente estudo, a combinação ácido láctico e lisozima não foi suficiente para eliminar o “pool” de cepas do patógeno, mas reduziu o número de sobreviventes, mesmo não sendo a lisozima ativa contra Gram negativas. Estudos realizados por CHUNG e HANCOCK (2000) mostraram que tratamento de bactérias ácido lácticas com lisozima não causou lise nas células, mas apenas a produção de pequenos agregados de material na superfície das mesmas. Porém os autores observaram que a combinação de lisozima com nisina causou sérias alterações na morfologia das células, evidenciadas por análise em microscopia eletrônica. No presente estudo a combinação ácido láctico e bacteriocina 2a na inibição de *Salmonella* foi bastante favorável, pois aumentou o potencial de ação desses compostos, evidenciado pela eliminação da população do “pool” de cepas do patógeno após os tratamentos.

Atualmente, a indústria de alimentos em consonância com tendências para produção alimentos seguros e saudáveis, está ampliando a gama de produtos refrigerados, minimamente processados, com estabilidade microbiológica, prontos para o consumo e ampla vida de prateleira. Por outro lado, um aspecto crítico na produção desses alimentos é o potencial para

desenvolvimento de microrganismos patogênicos (POST, 1996; McMULLEN, STILE, 1996; HOLLEY, 1997). A qualidade microbiológica e segurança desses alimentos baseiam-se na embalagem à vácuo e estocagem sob refrigeração. Por outro lado, o uso de atmosfera modificada e refrigeração podem favorecer o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas. (DE MARTINIS *et al.*, 2002). Como alternativa tecnológica tem-se o uso de bacteriocinas que, sozinhas ou em combinação a outros antimicrobianos, podem causar interferência na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas (SCHILLINGER *et al.*, 1996; HUGAS, 1998).

Muitas bacteriocinas de bactérias ácido lácticas mostram atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* e outros patógenos Gram positivos (DABA *et al.*, 1991; FOEGEDING *et al.*, 1992; ABEE *et al.*, 1994 CHUNG, HANCOCK, 2000), porém estudos sobre atividade de outras bacteriocinas além da nisina contra bactérias Gram negativas ainda não têm sido suficientemente relatados (SCHILLINGER *et al.*, 1996; ELLIASON, TATINI, 1999)

No presente estudo a utilização da bacteriocina 2a produzida por *L. sake* 2a, sozinha e em combinação com outros compostos antimicrobianos, confirmou o potencial de aplicação dessa bacteriocina para inibição da multiplicação de *Salmonella* em alimentos. Bacteriocina 2a em combinação com ácido láctico pode ser particularmente útil no controle da colonização e multiplicação dos sorotipos de *Salmonella* estudados.

Verificou-se que a ação combinada de antimicrobianos em experimentos onde se testou a ação direta sobre células de *Salmonella*, houve um efeito mais inibitório do que quando se testou a ação dos agentes antimicrobianos em meios de cultura mais complexos, onde possivelmente a interferência de componentes presentes reduziu a ação dos mesmos. É claro que se fosse avaliar a ação desses sistemas em substratos como, por exemplo, alimentos, isso seria mais evidente, a resposta dependeria da interferência positiva ou negativa de fatores intrínsecos e extrínsecos que permitiriam ou não a



sobrevivência ou multiplicação dos microrganismos presentes no alimento. Por outro lado, quando não se tem uma avaliação do comportamento de um patógeno frente à ação de determinadas substâncias, é preciso primeiro estudá-las em um sistema modelo, como é o caso desse estudo.

O principal foco das pesquisas aplicadas que utilizam bacteriocinas, combinadas ou não a outros antimicrobianos, é a inibição da multiplicação de patógenos de origem alimentar, principalmente *Listeria monocytogenes*. Isto porque as bacteriocinas são ativas principalmente contra microrganismos Gram positivos. Entretanto, a despeito da inquestionável importância deste patógeno, os não menos importantes como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* 0157:H7, *Campylobacter jejuni* e outros, podem ser alvo de estudos que utilizem as bacteriocinas em combinação com outros antimicrobianos, em diferentes sistemas de estudo.

Neste estudo priorizou-se a utilização de bacteriocina em combinação com substâncias antimicrobianas regulamentadas e aprovadas para uso como aditivos em alimentos no Brasil e em outros países. A bacteriocina 2a produzida por *Lactobacillus sake* 2a tem histórico recente de pesquisas e, como tal, outros estudos deverão ser realizados para que sua eficácia como antimicrobiano contra outros patógenos seja mostrada. As perspectivas de aplicação dessa bacteriocina como reforço nas estratégias de bioconservação de alimentos são bastante promissoras face aos resultados já obtidos.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, as seguintes conclusões podem ser descritas:

1. A cepa de *Lactobacillus sake* 2a produz bacteriocina 2a contra *Listeria monocytogenes* Scott A Cm<sup>r</sup> Em<sup>r</sup> (cepa indicadora) nos meios de cultura BHI, MRS e TSB com 0,1% de glicose, independente de temperatura e atmosfera de incubação;

2. A bacteriocina produzida por *L. sake* 2a pode ser concentrada através de extração ácida, sem perda da atividade. O método é relativamente fácil de execução no laboratório, e a atividade pode ser observada no material concentrado diluído;

3. A cultura de *L. sake* 2a, produtora de bacteriocina, não inibe de forma significativa a multiplicação de *Salmonella* nos meios de cultura BHI, MRS e TSB com 0,1% de glicose;

4. EDTA, na concentração de 2,0 mM, em meio de cultura BHI incubado a 37°C contendo *L. sake* 2a e *Salmonella*, inibe a multiplicação de cepas do patógeno.

5. A presença de EDTA (10 mM ou 20 mM) em caldo BHI contendo a cultura de *L. sake* 2a produtor de bacteriocina, faz com que a multiplicação de *Salmonella* nesse meio a 37°C seja completamente inibida.

6. A adição de ácido cítrico (10 mM) ao caldo BHI contendo a cultura de *L. sake* 2a produtora de bacteriocina, faz com que a multiplicação de *Salmonella* neste meio incubado a 37°C seja reduzida, mas não completamente inibida. O emprego de ácido cítrico em combinação com a bacteriocina 2a purificada por extração ácida potencializa a atividade inibitória de bacteriocina;

7. Acido láctico é semelhante ao ácido cítrico na ação sobre *Salmonella*, na presença de *L. sake* 2a produtor de bacteriocina. A adição de lisozima ao sistema potencializa a ação inibitória do ácido láctico.

8. A tríplice combinação mais positiva na inibição da multiplicação de *Salmonella* é bacteriocina parcialmente purificada por extração ácida (500 UA/ml) + EDTA (1,0 mM) + lisozima (10 µg/ml);

9. A combinação apresentada no item 8 é mais eficiente que a combinação nisina (100 UI/ml) + EDTA (1,0 mM) + (10 µg/ml);

10. Os cinco sorotipos de *Salmonella* testados frente aos antimicrobianos usados, isoladamente ou em combinação, responderam de forma semelhante;

11. Há um bom potencial de aplicação desses antimicrobianos em alimentos, isoladamente ou em combinação, para inibição da multiplicação de *Salmonella*.

12. A bacteriocina 2a produzida por *L. sake* 2a apresenta boas perspectivas de aplicação em alimentos na inibição de *Salmonella* em combinação com outras substâncias antimicrobianas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, v.28, p.169-185, 1995.

ABEE, T., ROMNOUTS, F.M.; HUGENHOLTZ, J.; GUIHARD, G.; LETELLIER, L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 60, n.5, p.1962-1968, 1994.

ABIA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das normas e padrões de alimentos; (Ver.6): São Paulo, 1996, v.1, 3.31.

ALAKOMI, H. L., SKYTТА, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I.M. Lactic acid permeabilizes gram-negative by disrupting the outer membrane. *Appl. Env. Microbiol.*, 66:2001-2005,2000.

ADANS, M.R. HALL, C.J. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v.23, p287-292,1988.

ANVISA -AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - 1997. Portaria nº 540 SVS/MS de 27 de outubro de 1997 que aprova o Regulamento Técnico sobre aditivos alimentares. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> . Documento extraído em 15/05/2002.

ANVISA -AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – 1999a. Res nº 382 de 5 de agosto de 1999, que aprova o “Regulamento técnico sobre aditivos estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 13–molhos e condimentos”. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> Documento extraído em 15/05/2002.

ANVISA -AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – 1999b. Res nº 386 de 5 de agosto de 1999, que aprova o “Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções”. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> . Documento extraído em 15/05/2002.

ANVISA -AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – 1999c – Grupo de Trabalho de Aditivos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/>. Documento extraído em 18/05/2002.

ANVISA -AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – 2001 - Res. RDC n. 7 de 02 de janeiro de 2001 que aprova a extensão de uso do ácido láctico (INS 270) como coadjuvante de tecnologia na função de controle de microrganismo na lavagem de ovos, carcaças ou partes de animais de abate em açougue, em quantidade suficiente para obter o efeito desejado. Disponível em [http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) . Documento extraído em 15/05/2002.

ANVISA -AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – 2001 - Res. RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em [http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) . Documento extraído em 15/05/2002.

BLACK, J.G. Microbiology: principles & applications.3.ed.:Prentice-Hall, New Jersey, 1996. 790p.

BLANC-POTARD, A.B., GROISMAN, E.A. The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *Emb J.*,v.16, p.5376-5385,1997.

BOZIARIS, I.S., ADAMS, M.R. Effect of chelators and nisin produced in situ on Inhibition and inactivation of gram negatives. *Int. J. Food Microbiol.*, v.53, p.105-113, 1999.

BOZIARIS, I.S., ADAMS, M.R. Transient sensitivity to nisin in cold-shocked gram negatives. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.31, p.233-237, 2000.

BOZIARIS, I.S., HUMPHESON, L., ADAMS, M.R. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *Int. J. Food Microbiol.*, v.43, p.7-13, 1998.

BRYAN, F.L., DOYLE, M.P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter-jejuni* in raw poultry. *J. Food Prot.*, v.58, n.3, p.326-344, 1995.

CDC- Department of Health and Human Services. - Centers for Disease Control and Prevention UNITED STATES, USA - Disponível em: <http://www.cdc.gov/cdc.gov>. Acesso em: 10/ jan/2002.

CHUNG, W., HANCOCK, R.E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v.60, p.25-32, 2000.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobial for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v.71, p.1-20, 2001.

CUTTER, C., SIRAGUSA, G.R. Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Prot.*, v.58, p.997-983, 1995a.



CUTTER, C., SIRAGUSA, G.R. Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *J. Food Prot.*, v.57, n.9, p.1028-1030, 1995b.

DAESCHEL, M.A. Antimicrobial substances from lactic-acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, v.43, n.1, p.164-166, 1989.

D'AOUST, J.Y., MAURER, J., BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J., eds. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. 2.ed.: ASM Press, Washington, 2001. 872p.

DABA,H.;PANDIAN,S.; GOSSELIN, J. F.; SIMARD, R. E; HUANG,J.;LACROIX,C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*.

*Appl. Environ.Microbiol.*,v.57, n.12, p.3450-3455, 1991.

DE MARTINIS, E.C.P., FRANCO, B.D.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *Int. J. Food Microbiol.*, v.42, n.1/2, p.119-126, 1998.

DE MARTINIS, E.C.P., ALVES,V.F., FRANCO, B.D.G.M. Bioconservação de alimentos. *Biotechnologia*, ano V, n.29, 2002a.

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

DE VOS, W.M., KUIPERS, O.P., VAN DER MEER, J.R., SIEZEN, R.J. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.17, p.427-437, 1995.

DE VUYST, L.,VANDAMME, J., Eds (1993) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Chapman & Hall, *apud* HELANDER, I.M., WRIGHT,A. VON, MATTILA-SANDHOLM,T-M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*,v8,p.146-150,1997.

ELLIASON, D. J.,TATINI, S.R. Enhanced inactivation of *Salmonella typhimurium* and verotoxigenic *Escherichia coli* by nisin at 6.5°C. *Food Microbiol.* v.16, p257-267,1999.

ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.24, n.1, p.85-106, 2000.

FACON, M.J., SKURA, B.J. Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *Int. Dairy J.*, v.6, p.303-313, 1996.

FIELDS, F.O. Use of bacteriocins in food: Regulatory considerations. *J. Food Prot.*, p.72-77,1996.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M., DESTRO, M.T., GELLI, D. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILIOTIS, M., BIER, J. eds. *International handbook of foodborne pathogens*. New York: Marcel Dekker, 2003. p.733-743.

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

GELINSKI, J. M. L. N.;MARTIN, G.;DESTRO,M.T.; LANDGRAF,M.; FRANCO,B. D. G.M. Rapid detection of *Salmonella* in foods using a combination of SPRINT<sup>®</sup>, MSRV<sup>®</sup> and Salmonella Latex Test<sup>®</sup>. *Rev.Bras.Cienc.Farmaceut.* v.38,n.4,p.315-322, 2002

GILL, A.O., HOLLEY, R.A. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozime, nisin and EDTA. *Food Res. Int.*, v.33,p.83-90,2000a.

GILL, A.O., HOLLEY, R.A. Surface application of lysozime, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. *J. Food Prot.*, Des v.63, n.10, p.1338-1346, 2000b.

GOULD, G.W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot.*, suppl., p.82-86, 1996.

GROSS, E., MORELL, J.L. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*, Columbus, v.92, n.2919, p.4634-4635, 1971.

HANCOCK, R.E.W. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J. Med. Microbiol.*, v.46, p.1-3, 1997. [Editorial].

HANCOCK, R.E.W. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.*, v.5, n.1, p.37-42, 1997. [Review].

HANCOCK, R.E.W., DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.*, v.8, n.9, 2000. [Review].

HARRIS, L.J., DAESCHEL, M.A. , KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, v.52, n.6, p.384-387, 1989.

HELANDER, I.M., MATTILA-SANDHOLM, T. Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. *J. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.88, p.213-219, 2000a.

HELANDER, I.M., MATTILA-SANDHOLN, T. Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *Int. J. Food Microbiol.*, v.60, p.153-161, 2000b.

HELANDER, I.M., WRIGHT, A.V., MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*, v.8, p.146-150, 1997.

HOLLEY, R.A. Asymmetric distribution and growth of bacteria in sliced vacuum-packaged ham and bologna. *J. Food Prot.*, v.60, p510-519,1997.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS,S.T. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9.ed.: Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.787p.

HOLZAPFEL, W.H., GEISEN, R., SCHILLINGER, U. `Biological preservation of foods, with reference to protective cultures,bacteriocins and food-grade enzymes`. *Int. J. Food Microbiol.*,v.24, p.343-362,1995.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, v.49n.1,p.5139-5150,1998.

HURST, A. Bacterial injury: a review. *Can. J. Microbiol.*, v.23, n.8, p.935-944. 1977.

HURST, A. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, San Diego, v.27, p.85-123, 1981.

INGRAM, L.C. Synthesis of the antibiotic nisin: formation of lanthionine and  $\beta$ -methyllanthionine. *Biochim. Biophys. Acta*, v.184, p.216-219, 1969.

JACK, R.W., TAGG, R.W.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v.59, n.2, p.171-200, 1995.

JAY, J. *Modern food microbiology*. 6.ed. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000. 679p.

KEKESY, D.A., PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, p.282-283, 1970.

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

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, p.39-87, 1993.

KLANDER, O., Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Ant van Leuw.*, v.49, p.209-224, 1983.

KOO, F.C.W.; PETERSON, J.W.; CLIFFORD, W.H.; MOLINA, C. Pathogenesis of experimental salmonellosis: Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Inf. Immunity.*, v.43, n.1, p.93-100, 1984.

KUIPERS, O.P., ROLLEMA, H.S., YAP, W.M.G.J., BOOT, H.J., SIEZEN, R.J., DE VOS, W.M. Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin. *J. Biol. Chem.*, v.256, p.2434-21346, 1992.

KNIGHT, K.P., BARTLETT, F.M., MCKELLAR, R.C., HARRIS, L.J. Nisin reduces the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in liquid whole egg. *J. Food Prot.*, v.62, n.9, p.999-1003, 1999.

LEISTNER, I., GORRIS, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.*, v.6, p.41-46, 1995.

LEWUS, C., MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods*, v.13, p.145-150, 1991.

LIU, W., HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small – protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.2551-2558, 1990.

LOSSO, J.N., NAKAI, S., CHARTER, E.A. Lysozyme. **In:** Natural food antimicrobial systems. NAIDU, A.S. (ed.): CRC Press, London, section-II: Ovo-antimicrobials, cap.6, p.185-210, 2000. 818p.

MAGALHÃES, H.B., BROMBERG, R., MORENO, I. O. Efeito de agente quelantes e bacteriocinas de bactérias lácticas no crescimento de *Escherichia coli*. Anais do 1º Cong. Brasil. de Ciência e Tecnol. de Carnes (22 a 25 de outubro de 2001). Publ. pelo Centro Tecnol. de Carnes - CTC *Inst. Tec. Alim.-ITAL*, p.464-465,2001.

MAHADEO, M.; TATINI, S.R. The potential use of nisin to control *Listeria monocytogenes* in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.18, n6, .323-326, 1994.

MAYR-HARTING, A; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. 1972. Methods of studying bacteriocins. *apud* ROSA, C.M. Caracterização de uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake* isolada de produto cárneo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998. 76p.

MCAULIFFE, O., ROSS, R.P., HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Rev.*, v.25, p.285-308, 2001.

MCMULLEN, L.M., STILES, M.E. Potential for use of bacteriocina-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, (suppl.), p.64-71, 1996.

MOLL, G.N., KONINGS, W.N., DRIESSEN, A.J.M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. *Ant. van Leeuw.*, v.76, p.185-198, 1999.



MONTVILLE, T.J., BRUNO, M.E.C. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobials proteins. *Int. J. Food Microbiol.*, v.24, p.53-74, 1994.

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

MONTVILLE, T.J., WINKOWISKI, K., CHIKINDAS, M. Biologically based preservation systems. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J., eds. *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*.2.ed. ASM Press, 2001. p.629-648.

MONTVILLE, T.J., WINKOWISKI, K., LUDESCHER, R.D. Models and mechanisms for bacteriocina action and application. *Int.Dairy J.*,v.5p.797-814,1995.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for controls of *Listeria spp.* in food. *J. Food Prot.*, suppl., p.54-63, 1996.

NIKAIDO, H. Outer membrane. In: NEIDHARDT, F.C., CURTIS, R., eds. *Escherichia coli* and *Salmonella: cellular and molecular biology*. 2.ed. Washington: ASM Press, 1996. p.29-47.

NES, I.F., DIEP, D.B., HAVARSTEIN, L.S., BRURBERG, M.B., EIJSINK, V., HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Ant. Van Leeuwenhoek*, v.70, n.2/4, p.113-128, 1996.

PANALIMENTOS-2002 Disponível em <http://www.panalimentos.org/panalimentos/> .  
Documento extraído em 29/10/2002.

PAYNE, K.D., OLIVER,S.P., DAVIDSON,P.M. Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food Prot.*v.57,p.62-65, 1994.

PELLEGRINI, A.,THOMAS,U., VON FELLEBERG,R., WILD, P. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to heir basic character. *J. Appl. Bacteriol.* v.72, p.180-187,1992.

POPOFF, M.Y., BOCKEMÜHL, J., BRENNER, L.L., GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (n.44) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.*,v.152, n.10, p.907-909, 2001.

POST, R.C. Regulatory perspective of the USDA on the use of antimicrobials and inhibitors in foods. *J. food Prot.*, suppl.,p.78-81,1996.

PROCTOR, V.A., CUNNINGHAM,F.F. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, v.26,p.359-395,1988.

ROSA, C.M., Caracterização de uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake* isolada de produto cárneo. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 98p.

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

ROSS, R.P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food. Microbiol.*, v.79, p3-16, 2002.

SAHL, H.G., BIERBAUM, G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, v.230, p.827-853, 1998.

SALYERS, A. A., WHITT, D. D. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. ASM Press, Washington, cap.19, p229-243, 1994. 418p.

SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W.H. Potentials of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.*, v.7, p.158-164, 1996.

SHARMA, R.K. Citric acid. **In:** Natural food antimicrobial Systems. NAIDU, A.S. (ed.), CRC Press: London, section-V: Acid-Microbials, cap.25, p.689-704, 2000. 818p.

- SHEA, J.E., HENSEL, M., GLEESON, C., HOLDEN, D.W. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.93, p.2593-2597, 1996.
- SOFOS, J.N. Current microbiological considerations in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v.19, p.87-108, 1993.
- STEVENS, K.A., SHELDON, B.W., KLAPES, A., KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.12, p.3613-3615, 1991.
- STEVENS, K.A., KLAPES, A., SHELDON, B.W., KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.58, n.5, p.1786-1788, 1992.
- STILES, M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Ant. Van Leeuw.*, v.70, p.331-345, 1996.
- TAGG, J.R., MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.21, n.5, p.943, 1971.
- UZZAU, S., BROWN, D. J., WALLIS, T., RUBINO, S., LEORI, G., BERNARD, S., CASADESÚS, J., PLATT, D. J., OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* v.125, p.229-225, 2000.

- VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.*, v.56, n.3, p.395-411, 1992.
- VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, v.49, n.1, 1985.
- WASSERFALL, F., TEUBER, M. Action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.38, p.197-199, 1979.
- VIGNOLO, G.M.,KAIRUZ,M.N.,HOLGADO,A.A.P.R.,OLIVER,G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.*, v.78,p.5-10,1995.
- WOOD, M.W., JONES, M.A., WATSON, P.R., HEDGES, S., WALLIS, T.S., GALYOV, E.E. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Mol. Microbiol.*, v.29, n.3, p.883-891, 1998.
- WINKOWSKI, K., LUDESCHER, R.D., MONTVILLE, T.J. Physicochemical characterization of the nisin-membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62 n.2, p.323-327, 1996.
- YANG, R., JOHNSON, M. C. RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58,n.10, p.3355-3359,1992.