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

Caracterização da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R isolado de rúcula (*Eruca sativa* Mill.) e avaliação do seu potencial probiótico utilizando o modelo dinâmico TIM-1

Monika Francisca Kruger

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo

2010

Monika Francisca Kruger

Caracterização da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
MK02R isolado de rúcula (*Eruca sativa* Mill.) e avaliação do seu potencial
probiótico utilizando o modelo dinâmico TIM-1

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ .

“Viva como se você fosse morrer amanhã,
mas aprenda como se você fosse viver para sempre”

Mahatma Ghandi

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a Bernadette D. G. M. Franco, pela orientação segura, oportunidade de aprendizado e confiança depositada em mim durante todo o curso de doutorado.

Ao Matheus de Souza Barbosa, Dr. Svetoslav D. Todorov e Daniella N. Furtado pela amizade verdadeira e pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Ao prof^o. Dr. Antônio de Miranda do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo pelo apoio nas realizações dos testes cromatográficos.

Ao prof^o. Dr. João Moreira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pelo auxílio na identificação do isolado MK02R.

Às professoras Dr^a Maria Teresa Destro e Dr^a Mariza Landgraf pela atenção e o pronto auxílio nos momentos de dúvidas.

À prof^a. Dr^a Susana Saad pela oportunidade de participação no projeto CAPES-WAGENINGEN (nº. 3916-06-5), o qual me proporcionou a realização do estágio na Holanda.

Aos professores Dr. Hauke Smidt e Dr. Erwin Zoetendal da Universidade de Wageningen pelo auxílio constante na execução e análise dos experimentos realizados.

Ao Dr. Koen Venema e Sanne Van Rijn pelo apoio na execução e análise dos experimentos realizados no TNO (Zeist, Holanda) e pelo convívio agradável.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Wageningen pelo auxílio e pelos momentos agradáveis de descontração.

Às funcionárias Kátia e Lúcia do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP pelo convívio agradável no ambiente de trabalho e também pelos bons momentos de descontração que compartilhamos.

Aos funcionários Jorge e Elaine da secretaria de Pós-graduação da FCF-USP pela paciência e disposição.

Aos secretários Mônica, Edilson e Cleonice da FCF-USP, pela colaboração e auxílio nos momentos necessários.

À minha mãe Elza, e aos meus irmãos Rainer, Karin, Francine e Roberto, pelo amor, respeito, reconhecimento, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

À minha tia Brunilde e ao tio André pela inspiração, amor, reconhecimento e apoio.

Aos meus sobrinhos Anna Luiza e Erich por trazerem sempre aquele sorriso ingênuo e alegre de criança, tornando minha vida muito feliz.

À toda minha família, meus tios e primos, e meus amigos que na convivência do dia-a-dia me apóiam e me respeitam e, sem perceberem, tornam mágicos muitos momentos de minha vida.

Ao Krisztián Kovacs pelas flores, amor e amizade e à família Kovacs pelo carinho e apoio.

À CAPES pela concessão das bolsas de estudo do programa de doutorado, do programa PAE e do programa de estágio no exterior.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Bactérias láticas e suas aplicações em alimentos	02
1.2. BAL e segurança dos alimentos 1.1.1	05
1.2.1. Nisina e suas aplicações em alimentos.....	11
1.3. BAL como cultura probiótica em alimentos funcionais.....	16
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo global	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Isolamento e identificação de bactérias láticas	23
3.1.1. Isolamento de bactérias láticas	23
3.1.2. Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados	23

3.1.3. Avaliação inicial da atividade antimicrobiana das BAL isoladas	24
3.1.4. Identificação do isolado MK02R	25
3.2. Identificação e caracterização das bacteriocinas	26
3.2.1. Avaliação da natureza protéica	27
3.2.2. Caracterização da bacteriocina produzida pelo isolado MK02R	27
3.2.2.1. Avaliação da estabilidade térmica	28
3.2.2.2. Avaliação da influência do pH	28
3.2.2.3. Avaliação da sensibilidade à compostos tensoativos, detergentes e NaCl	29
3.2.2.4. Avaliação do espectro de ação	29
3.2.3. Avaliação da ação da bacteriocina MK02R	31
3.2.3.1. Avaliação da inibição da multiplicação microbiana	31
3.2.3.2. Avaliação da capacidade de causar lise celular	31
3.2.4. Avaliação da influência da temperatura e da presença de cisteína na produção da bacteriocina MK02R	32
3.2.5. Determinação da presença do gene nisina no isolado MK02R	33
3.2.6. Adsorção da bacteriocina MK02R às células produtoras.....	34
3.2.7. Purificação da bacteriocina MK02R	34
3.2.8. Análise por cromatografia de fase líquida (HPLC) e espectrometria de massas	35
3.3. Avaliação da sobrevivência das BAL no ambiente simulado do trato gastrointestinal humano, utilizando o modelo dinâmico TIM-1	36
3.3.1. Preparo do modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1 para a realização dos experimentos	39

3.3.2. Preparo do material para os testes no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1	41
3.3.3. Avaliação da sobrevivência das BAL no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1	43
3.3.4. Avaliação da atividade de bacteriocinas após o trânsito no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1	44
3.3.5. Análise estatística	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Isolamento e identificação das cepas de BAL isoladas de rúcula	46
4.2. Caracterização da bacteriocina produzida por <i>L. lactis</i> MK02R	48
4.2.1. Avaliação do espectro de atividade da bacteriocina produzida por <i>L. lactis</i> MK02R	50
4.2.2. Avaliação da inibição da multiplicação microbiana	52
4.2.3. Avaliação da capacidade de causar lise celular	53
4.2.4. Avaliação da influência da temperatura e da presença de cisteína na produção da bacteriocina MK02R	54
4.2.5. Adsorção de bacteriocina MK02R às células produtoras	57
4.2.6. Determinação da presença do gene de nisina em <i>L. lactis</i> MK02R.	58
4.2.7. Determinação dos aminoácidos da bacteriocina MK02R por espectrometria de massas após purificação por cromatografia de fase-líquida (HPLC)	61
4.3. Avaliação da sobrevivência de <i>L. lactis</i> MK02R, <i>L. sakei</i> 2a e do efeito do co-cultivo com <i>E. faecium</i> LMA1 no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1	64
4.3.1. Avaliação da produção de bacteriocinas por <i>L. lactis</i> MK02R e <i>L. sakei</i> 2a no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1	70

5. CONCLUSÕES	73
----------------------------	-----------

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características bioquímicas de bactérias lácticas (adaptado de Salminen <i>et al.</i> , 2004)	04
Tabela 2: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas segundo Klaenhammer (1993)	06
Tabela 3: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas proposta por Cotter, Hill e Ross (2005)	07
Tabela 4: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas proposta por Heng <i>et al.</i> (2007)	08
Tabela 5: Cepas bacterianas e condições de cultivo empregadas na determinação do espectro da bacteriocina produzida pelo isolado MK02R	30
Tabela 6: Microrganismos utilizados nos testes no modelo dinâmico TIM-1	42
Tabela 7: Composição da amostra inicial injetada no modelo dinâmico TIM-1	43
Tabela 8: Caracterização inicial da substância antimicrobiana produzida por <i>L. lactis</i> MK02R	49
Tabela 9: Espectro de atividade do sobrenadante da cultura de <i>L. lactis</i> MK02R	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura primária das variantes naturais de nisina: A, Z, Q e U. Dha, dehidroalanina; Dhb, dehidrobutirina; Ala-S-Ala, lantionina; Abu-S-Ala, metil-lantionina. Os aminoácidos marcados em cinza diferem dos aminoácidos da nisina A. **13**
- Figura 2:** Mecanismos de ação da nisina. A dupla ação está representada por sua ligação à membrana, causando a formação de poros e também o bloqueio da síntese de peptideoglicanos da parede celular. **15**
- Figura 3:** Esquema simplificado do modelo dinâmico TIM-1 (TNO). A) compartimento do estômago; B) esfíncter pilórico; C) compartimento do duodeno; D) válvula peristáltica; E) compartimento do jejuno; F) válvula peristáltica; G) compartimento do íleo; H) válvula íleo-cecal; I) eletrodos de pH; J) frasco de secreção gástrica com ácidos e enzimas; K) frascos de secreções duodenais com e bicarbonato; L) soluções com eletrólitos para controle do pH intestinal; M) pré-filtro N) filtro com membranas de exclusão de 5 kDa; O) sistema de absorção de líquidos; P) fechamento do sistema de diálise. **37**
- Figura 4:** Média dos valores de pH nos compartimentos do estômago, duodeno, jejuno e íleo no modelo TIM-1, durante os experimentos. **40**
- Figura 5:** Proporção dos volumes médios do efluxo final e de líquidos retidos durante os experimentos no modelo TIM-1. **41**
- Figura 6:** Produto de 800 pb gerado por amplificação do 16S-23S DNAr de *L. lactis* MK02R. Marcador de peso molecular (M) de 1 Kb. **47**
- Figura 7:** Restrição enzimática do amplicom do produto de PCR do 16S-23S DNAr de *L. lactis* MK02R. Os sinais positivos e negativos na parte inferior da figura significam clivagem positiva ou negativa, respectivamente. Marcador de peso molecular (M) de 1 Kb. **47**
- Figura 8:** Multiplicação de *Listeria innocua* a 37°C em caldo BHI com ou sem a adição de 20% do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R. **52**

- Figura 9:** Multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A a 37°C em caldo BHI com ou sem a adição de 20% do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R. 52
- Figura 10:** Multiplicação de *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 a 30°C em caldo MRS com ou sem a adição de 20% do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R. 53
- Figura 11:** Multiplicação de *L. lactis* MK02R (linhas) e produção da bacteriocina MK02R (barras) a 37°C em caldo MRS acrescido de 0,0%, 0,5% ou 1,0% de cisteína. 54
- Figura 12:** Multiplicação de *L. lactis* MK02R (linhas) e produção da bacteriocina MK02R (barras) a 30°C em caldo MRS acrescido de 0,0%, 0,5% ou 1,0% de cisteína. 55
- Figura 13:** Multiplicação de *L. lactis* MK02R (linhas) e produção da bacteriocina MK02R (barras) a 25°C em caldo MRS acrescido de 0,0%, 0,5% ou 1,0% de cisteína. 55
- Figura 14:** Produto de amplificação do DNA obtido através da PCR com os *primers* de expressão de nisina (Nisf e Nisr). Marcador de peso molecular (M) de 100 pb. 59
- Figura 15:** Sequência de aminoácidos da bacteriocina produzida por *L. lactis* MK02R deduzida por análise do DNA, comparada com as sequências das nisinas A, Z, F e Q. O peptídeo líder das variantes de nisina consiste de 13 aminoácidos (da posição -13 até a posição 1), seguida pelos aminoácidos que codificam o peptídeo maduro (da posição 1 até a posição 34). A diferença entre os aminoácidos da nisina produzida por *L. lactis* MK02R em relação às outras variantes de nisina estão sinalizadas com a cor vermelha. 60
- Figura 16:** Perfil cromatográfico (HPLC) da amostra purificada da bacteriocina MK02R utilizando a coluna preparativa C₁₈ (2,2 × 150 mm, 3,5µ m, 60 poros, Nova-Pak, Waters C18). 62
- Figura 17:** Perfil da espectrometria de massas da bacteriocina MK02R (A) e da nisina Z (B). (A) Obtido utilizando Micromass (ZMD- Waters Corporation, Milford, MA,), com eluição em 30 minutos com gradiente linear de acetonitrila (CH₃CN) acidificado de 5% a 95% a uma vazão de 0,4 ml/min. (B) Obtido de Sun *et al.* (2009). 62

Figura 18: Viabilidade de <i>Lactococcus lactis</i> MK02R utilizando os Protocolos 1 e 2 (P1 e P2) durante o trânsito no modelo dinâmico TIM-1	64
Figura 19: Viabilidade de <i>Lactobacillus sakei</i> 2a utilizando os Protocolos 1 e 2 (P1 e P2) durante o trânsito no modelo dinâmico TIM-1	65
Figura 20: Viabilidade de <i>Enterococcus faecium</i> LMA1 utilizando os Protocolos 1 e 2 (P1 e P2) durante o trânsito no modelo dinâmico TIM-1	65
Figura 21: Flutuação das contagens da população de <i>L. lactis</i> MK02R em comparação com as amostras iniciais durante a passagem no modelo TIM-1	69
Figura 22: Flutuação das contagens da população de <i>L. sakei</i> 2a em comparação com as amostras iniciais durante a passagem no modelo TIM-1	69
Figura 23: Flutuação das contagens da população de <i>E. Faecium</i> LMA1 em comparação com as amostras iniciais durante a passagem no modelo TIM-1	70

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Anotação do sequenciamento genético do 16-23S DNAr de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MK02R	98
Anexo 2: Representação dos aminoácidos em código, abreviação, bem como seu códon genético	99

RESUMO

Após a constatação da escassez de estudos realizados com vegetais crus na busca por novas estirpes de bactérias lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas e diante do potencial tecnológico da aplicação destas cepas tanto como agentes de conservação em alimento, bem como cultura probiótica em alimentos funcionais, este estudo objetivou isolar e identificar cepas de bactérias lácticas potencialmente bacteriocinogênicas de amostras de rúcula obtidas no comércio local de São Paulo, SP – Brasil, identificar e caracterizar as bacteriocinas produzidas pelos isolados e avaliar o potencial probiótico dos isolados testando sua sobrevivência no modelo dinâmico do trato gastrointestinal *TNO gastro-Intestinal Model* - TIM-1 disponível no TNO (*The Netherlands Organization for Applied Scientific Research*) divisão *Quality of Life* (Zeist, Holanda). A produção de bacteriocinas neste modelo também foi avaliada, comparando-se com *L. sakei* 2a, também produtora de bacteriocinas e ainda avaliou-se a interferência na viabilidade de *E. faecium* LMA1. A cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R de rúcula produziu uma bacteriocina sensível à enzimas proteolíticas, termoestável e não influenciada pelo pH, sendo capaz de inibir *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Listeria monocytogenes* de diferentes grupos sorológicos. Os ensaios genéticos utilizando primers Nisf e Nisr confirmaram que a bacteriocina MK02R é uma nisina, apresentando uma alteração dos aminoácidos no peptídeo líder em relação às nisinas A, Z, Q, F e U, porém com a estrutura do peptídeo maduro idêntica ao da nisina F. Estes resultados foram confirmados por espectrometria de massas de amostras purificadas por HPLC. *L. lactis* MK02R resistiu à passagem no modelo

dinâmico TIM-1, apresentando uma alta capacidade de sobreviver nas condições simuladas do trato gastrointestinal humano. Entretanto, não foi capaz de causar a redução no número de *E. faecium* LMA1. Em contrapartida, *L. sakei* 2a, mesmo apresentando uma sobrevivência menor, foi capaz de causar uma redução de 70% na população de *E. faecium* LMA1 no ambiente simulado do TGI. Não foi detectada atividade residual da ação antimicrobiana das bacteriocinas produzidas por *L. lactis* MK02R ou *L. sakei* 2a após a passagem pelo modelo dinâmico TIM-1. Estes resultados evidenciam a possível aplicação de *L. lactis* MK02R como um agente de controle biológico na conservação de alimentos e também como uma cultura potencialmente probiótica.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas (BAL), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Nisina, Trato gastrointestinal, Probióticos, Vegetais.

ABSTRACT

Given the scarcity of studies performed with raw vegetables addressing the search for new bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria (LAB) and considering the technological application of these strains as food preservatives and probiotic cultures in functional foods, this study was aimed at isolation and identification of bacteriocinogenic LAB strains from samples of rocket salad obtained in the local market of São Paulo, SP - Brazil, subsequent characterization of the bacteriocins produced by these LABs and evaluation of their probiotic potential by testing their survival in the dynamic gastrointestinal model *TNO gastro-Intestinal-Model* - TIM-1, available at the TNO (*Netherlands Organization for Applied Scientific Research*) Quality of Life division (Zeist, Netherlands). The studies in the TIM-1 model were also done with another bacteriocinogenic strain *L. sakei* 2a for comparison, evaluating their interference on the viability of *E. faecium* LMA1. The bacteriocin produced by strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R isolated from rocket salad was sensitive to proteolytic enzymes, heat-stable and not influenced by the pH. The bacteriocin inhibited the growth of *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus delbrueckii* the primers Nisf and Nisr indicated that the bacteriocin produced by the strain MK02R is a nisin, with a change in the amino acid sequence of the leader peptide when compared to nisin A, Z, Q, U and F, but with the structure of the mature peptide homologous to that of nisin F. These results were confirmed by mass spectrometry of purified samples obtained by HPLC. *L. lactis* MK02R withstood the test in the dynamic model TIM-1, presenting capability to survive in the simulated conditions of the human gastrointestinal tract. However, the strain was not able to cause a reduction in the

number of *E. faecium* LMA1. On the other hand, *L. sakei* 2a, even presenting lower survival, was able to cause 70% reduction in the population of *E. faecium* LMA1 in the gut simulated environment. No residual antimicrobial activity of bacteriocin produced by *L. lactis* MK02R or *L. sakei* 2a was detected after the transit through the dynamic model TIM-1. These results demonstrate the possible application of *L. lactis* MK02R both as a biocontrol agent in food preservation and as a potentially probiotic culture.

Keywords: Lactic acid bacteria (LAB), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R, Nisin, Probiotic, Vegetables.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias láticas ou bactérias ácido láticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos na natureza. As BAL são tradicionalmente usadas na fermentação de alimentos e bebidas, contribuindo para o desenvolvimento do sabor e do aroma através da produção de compostos aromáticos (Ponce *et al.*, 2008; Saguir *et al.*, 2009). Entretanto, sua utilização em alimentos se torna a cada dia mais interessante por vários motivos além da fermentação.

Muitas BAL são capazes de produzir de uma grande variedade de compostos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeídos e bacteriocinas, que podem interferir na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas presentes nos alimentos. As bacteriocinas produzidas pelas BAL se apresentam como uma alternativa tecnológica bastante promissora na solução do aumento da resistência microbiana decorrente do uso de conservantes convencionais (Gálvez *et al.*, 2010; Mitra, Chakrabartty e Biswas, 2010; Ponce *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010; Soliman e Donkor, 2010).

Outro motivo do interesse da indústria pelas BAL é que algumas espécies, como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*, são reconhecidamente probióticas, agregando o status de alimento funcional ao produto onde são adicionados (Justé, Thomma e Lievens, 2008). Além disso, a utilização de culturas de BAL e/ou seus produtos metabólicos em alimentos é reconhecida pelos consumidores como uma forma natural de conservação, o que demonstra seu

aspecto positivo considerando a demanda crescente por produtos livres de conservantes artificiais (Carr, Chill e Maida, 2002; Gálvez *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2003).

1.1. Bactérias lácticas e suas aplicações em alimentos

A designação bactérias lácticas (BAL) se aplica a um grupo de bactérias que têm o ácido láctico como principal produto metabólico da fermentação de açúcares, gerados através de duas vias metabólicas distintas: a via glicolítica e a via da pentose-fosfato (Axelsson, 1998; Klaenhammer *et al.*, 2005). Desde o primeiro isolamento de uma cultura pura de uma bactéria produtora de ácido láctico de amostras de leite por J. Lister em 1873, classificada como "*Bacterium lactis*" (Axelsson, 1998), houve uma expansão na classificação destas bactérias, que passaram a ser isoladas de vários outros alimentos e também do trato gastrointestinal (TGI) de humanos e de animais.

As BAL são microrganismos Gram positivos, não patogênicos, não esporulados, anaeróbios/aerotolerantes, desprovidos de citocromos, apresentam reação de catalase negativa, são ácido tolerantes e possuem o metabolismo estritamente fermentativo (Górska *et al.*, 2007). Os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* formam a base do grupo das bactérias lácticas. Além destes, os gêneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, e *Weissella* possuem importância do ponto de vista da tecnologia dos alimentos (Górska *et al.*, 2007), enquanto que os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* são microrganismos comensais do TGI humano (Ranadheera, Baines e Adams, 2010).

A diferenciação dos gêneros dentro do grupo das bactérias lácticas está baseada no modo de fermentação da glicose em condições específicas de multiplicação, podendo ser caracterizadas como homofermentativas, quando o produto metabólico é principalmente ácido lático, ou heterofermentativas, quando além do ácido lático, são produzidos também o etanol, ácido acético e CO₂ (Kučerová *et al.*, 2007).

Os gêneros de BAL diferem entre si em relação à temperatura de multiplicação, tolerância ao NaCl e sais biliares e resistência ao pH. A Tabela 1 apresenta resumidamente as características bioquímicas dos diferentes gêneros de BAL (Kučerová *et al.*, 2007; Salminen, Von Wright e Ouwehand, 2004). No entanto, para a identificação das espécies das BAL são necessários testes de fermentação de carboidratos, formação de acetoina, análise da hidrólise da arginina, testes de hemólise, bem como a utilização de métodos moleculares complementares para a detecção da presença de aminoácidos altamente específicos situados na seção intergênica do 16S-23S DNA ribossomal (Amor, Vaughan e De Vos, 2007; Kučerová *et al.*, 2007).

As BAL utilizadas como culturas “starters” e seus produtos metabólicos, tal como as bacteriocinas, são considerados GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, ou seja, podem ser utilizados em alimentos sem nenhuma restrição (Deegan *et al.*, 2006; Maragkoudakis *et al.*, 2009).

Tabela 1: Características bioquímicas de bactérias láticas (adaptado de Salminen *et al.*, 2004)

Características	Bacilos		Cocos						
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
Produção de CO ₂ ^a	-	±	-	-	-	+	-	-	-
Multiplicação a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+
Multiplicação a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-
Multiplicação em NaCl 6.5%	NI	±	+	+	-	±	±	-	+
Multiplicação em NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Multiplicação em pH 4.4	NI	±	-	+	±	±	+	-	-
Multiplicação em pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Produção de ácido láctico ^b	L	D,L,DL	L	L	L	D	L, DL	L	L

^a homofermentativo (-) e heterofermentativo (+)^b produção de D, L ou DL ácido láctico a partir de glicose

NI: não informado

1.2. BAL e a segurança dos alimentos

Um dos aspectos importantes da aplicação das BAL em alimentos se refere ao seu uso como bioconservante, visando a segurança dos alimentos (Gálvez *et al.*, 2010; Savadogo *et al.*, 2006). O efeito de conservação não se dá apenas pelas condições ácidas que estes microrganismos criam nos alimentos, mas também pode resultar da produção de diversas substâncias antimicrobianas, como o peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil, dióxido de carbono (CO₂), e ainda, bacteriocinas ou substâncias semelhantes às bacteriocinas (Dalié, Deschamps e Richard-Forget, 2010; Gálvez *et al.*, 2010; Maragkoudakis *et al.*, 2009; Ponce *et al.*, 2008).

As bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos produzidos por uma grande variedade de microrganismos Gram positivos e Gram negativos, porém, as produzidas por bactérias láticas são as mais estudadas por apresentarem um grande potencial de aplicação nos alimentos (Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2005; Rodgers, 2008).

Estas substâncias antimicrobianas diferem dos antibióticos clássicos quanto aos mecanismos de síntese, modo de ação, espectro antimicrobiano, toxicidade e mecanismos de resistência (Montville e Chen, 1998; Sang e Blecha, 2008; Settanni e Corsetti, 2008). As bacteriocinas são sintetizadas nos ribossomos das bactérias e atuam na membrana citoplasmática de células sensíveis dissipando a força próton motriz, através da formação de poros na bicamada lipídica ou causando a inibição da síntese de compostos essenciais à sobrevivência da célula (Dalié, Deschamps e Richard-Forget, 2010; Devlignere *et al.*, 2004). De maneira geral, as bacteriocinas apresentam efeito bactericida decorrente da lise celular, podendo

também apresentar um efeito bacteriostático, impedindo a multiplicação celular (Dalié, Deschamps e Richard-Forget, 2010; Oscáriz et al., 2008).

As bacteriocinas são moléculas catiônicas, anfifílicas, contendo entre 30 e 60 aminoácidos, e são agrupadas em classes distintas de acordo com suas características bioquímicas e genéticas, porém esta classificação passa por constantes atualizações (Cotter, Hill e Ross, 2005; Dalié, Deschamps e Richard-Forget, 2010; Drider *et al.*, 2006; Heng e Tagg, 2006; Heng *et al.*, 2007). A primeira classificação feita por Klaenhammer em 1993, já dividia as bacteriocinas em quatro classes (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas segundo Klaenhammer (1993)

Classe	Características	Exemplos
I	Ia Lantibióticos, peptídeos pequenos (<5kDa), contendo aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina, catiônicos e hidrofílicos com estrutura flexível	Nisina, Lactacina 481
	Ib Lantibióticos, peptídeos pequenos (<5kDa), contendo aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina, globulares, com estrutura rígida e rede de anéis não carregados ou carregados com carga negativa	Mersacidina
II	IIa Peptídeos pequenos (<5kDa), termoestáveis, sintetizados a partir de resíduos de glicina, ativos contra <i>Listeria</i> , contendo uma sequência YGNGV-C no N-terminal	Pediocina PA-1, Sakacinas A e P, Leucocina A, Carnobacteriocinas, etc.
	IIb Peptídeos formados por dois componentes agindo simultaneamente na formação de poros	Lactococina G e F, Lactacina F, Plantaricina EF e JK
III	Proteínas grandes (>30kDa) termolábeis	Helveticinas J e V-1829, Acidofilucina A, Lactacinas A e B
IV	Proteínas complexas, com atividade dependente da associação de um ou mais grupos funcionais (carboidratos ou fosfolipídios)	Plantaricina S, Leucocina S, Lactacina 27 e Pediocina J1

Porém, com o isolamento e caracterização de novas bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas, novas classificações foram propostas (Cotter, Hill e Ross, 2005; De Jong *et al.*, 2006; Eijsink *et al.*, 2002; Heng e Tagg, 2006; Heng *et al.*, 2007), conforme indicado nas Tabelas 3 (Cotter, Hill e Ross, 2005) e 4 (Heng *et al.*, 2007).

Tabela 3: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas proposta por Cotter, Hill e Ross (2005)

Classe	Características	Exemplos
I	Lantibióticos, peptídeos ou proteínas catiônicas e hidrofílicas contendo aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina. Inclui os peptídeos lineares ou globulares, e ainda os lantibióticos contendo dois componentes	Nisina, Lactacina 481, Mersacidina, Salvaricina A, Sublancina 168, Cinamicina
II		
IIa	Peptídeos pequenos (<5kDa), termoestáveis, sintetizados através de resíduos de glicina, ativos contra <i>Listeria</i> , contendo uma sequência YGNGV-C no N-terminal	Pediocina PA-1, Sakacinas A e P, Leucocina A
IIb	Peptídeos formados por dois componentes agindo simultaneamente na formação de poros	Lactococina G e F, Lactacina F, Plantaricina, Lacticinina 3147
IIc	Peptídeos com estrutura cíclica, envolvendo a ligação das terminações N e C-terminal	(IIc i) Enterocina AS48; (IIc ii) Gassericina A, Reuterina 6
IId	Peptídeos lineares, tipo não-pediocina, podendo ser subdivididos de acordo com a sequência do peptídeo líder, não classificadas nos outros grupos	Lactococina A, Divergicina A, Carnobacteriocinas, Turicina S
Bacteriolisinas	Proteínas complexas, grandes (>30kDa) termolábeis, com atividade dependente da associação de um ou mais grupos funcionais (carboidratos ou fosfolipídios)	Lisostafina, Enterocina A

Tabela 4: Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas proposta por Heng *et al.* (2007)

Classe			Características	Exemplos
I	Ia	Ia1	Lantibióticos pequenos (<5kDa) contendo aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina, catiônicos e hidrofílicos com estrutura alongada e flexível do tipo nisina	Nisina A, Z, Q, U e F
		Ia2	Lantibióticos pequenos (<5kDa) contendo aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina, catiônicos e hidrofílicos com estrutura alongada e flexível do tipo SA-FF22	Lacticina 481, Salvaricina A, Sublancina 168.
	Ib		Lantibióticos, peptídeos pequenos (<5kDa) contendo aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina, globulares, com estrutura rígida e rede de anéis não carregados ou carregados com carga negativa	Mersacidina, Cinamicina
		Ic	Lantibióticos formados por dois peptídeos contendo lantionina agindo simultaneamente	Lactacina 3147, Citolisina
II	IIa		Peptídeos pequenos (<5kDa), estáveis ao calor, sintetizados através de resíduos de glicina, ativos contra <i>Listeria</i> , contendo uma sequência YGNGV-C no N-terminal	Pediocinas, Sakacinas, Leucocina A, Bavaricina A
	IIb		Peptídeos formados por dois componentes agindo simultaneamente na formação de poros	Lactococina G, Lactacina F, Plantaricinas, Lactococina G, Acidocina JI 132
	IIc		Peptídeos sec-dependentes, com os terminais C e N ligados por ligação covalente	Divergicina A, Lactococina A e 972
III	IIIa		Proteínas grandes (>30kDa) termolábeis capazes de causar lise, ou bacteriolisinas	Helveticina V-1829, Acidofilucina A, Lacticinas A
	IIIb		Proteínas grandes (>30kDa) termolábeis não líticas	Helveticina J, Colicinas E2-E9
IV			Proteínas complexas, geralmente globulares com atividade dependente da associação de um ou mais grupos funcionais como carboidratos ou fosfolipídios	Leucocina S, Lacticina 27 e Enterocina AS-48

A maioria das BAL produtoras de bacteriocinas conhecidas atualmente foram isoladas de alimentos (Adnan e Tan, 2007; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2010), sendo considerados os microorganismos mais indicados para melhorar

a segurança microbiológica destes produtos, uma vez que se apresentam adaptadas a estes ambientes (Gálvez *et al.*, 2010).

Embora comuns em outros alimentos, poucos estudos relatam a ocorrência de cepas de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas em vegetais crus. Trias *et al.* (2008) isolaram 496 cepas de BAL de frutas frescas, sementes, vegetais orgânicos não processados e saladas prontas para o consumo, vendidas em embalagens plásticas na Espanha, verificando que apenas 18 foram capazes de inibir *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa* ou *Botrytis cinerea*, que são importantes microrganismos deteriorantes em vegetais. Pela caracterização do gene 16S DNAr, os isolados com atividade antimicrobiana foram identificados como *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Weissella cibaria* e *Enterococcus mundtii*. O sobrenadante das culturas destes isolados foi ativo contra pelo menos um dos microrganismos alvo testados, porém, a atividade antimicrobiana decorreu da ação de ácidos ou peróxido de hidrogênio, não tendo sido detectada de nenhuma substância antimicrobiana de natureza protéica, como bacteriocinas.

Ponce *et al.* (2008) isolaram quatro cepas de BAL potencialmente bacteriocinogênicas a partir de amostras de vegetais orgânicos na Argentina, observando que *Lactococcus lactis* e *Enterococcus canis* isolados de espinafre, e *Enterococcus hirae* e *Enterococcus faecium* isolados de acelga apresentaram atividade inibitória contra diversos patógenos de origem alimentar. Apesar de a atividade antimicrobiana ter ocorrido pela ação de compostos protéicos presentes no sobrenadante das culturas, os autores não identificaram ou caracterizaram estas substâncias.

Sathe *et al.* (2007) avaliaram a atividade antifúngica de uma cepa de *Lactobacillus plantarum* isolada de espinafre comercializada na Índia, e observaram a inibição de *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea*, tanto pela inoculação direta da bactéria láctica neste vegetal, como pelo uso do sobrenadante da cultura. As amostras inoculadas apresentaram um aumento da vida-de-prateleira e a atividade antimicrobiana foi atribuída à ação de bacteriocinas, embora nenhum estudo tenha sido feito para a caracterização destes peptídeos.

Uhlman *et al.* (1992) isolaram a cepa *L. lactis* D53 a partir de uma amostra de salada fresca contendo endívia, alface e rabanete e de cenouras fermentadas comercializadas na Alemanha. O sobrenadante da cultura foi submetido a vários testes de resistência a enzimas proteolíticas, atividade em diferentes valores de pH e de tolerância térmica, confirmando-se que a atividade inibitória contra as diversas cepas de *Listeria monocytogenes* testadas decorreu da ação de bacteriocinas. O estudo apresentou evidências da produção de um peptídeo do tipo nisina, porém não foram feitos testes adicionais para uma melhor caracterização do composto antimicrobiano.

As bacteriocinas da Classe I são as mais estudadas e melhor caracterizadas. São também denominadas lantibióticos (“lanthionine containing antibiotic”) devido à presença de aminoácidos tioeter lantionina (Lan) e/ou β -metil-lantionina (MeLan) no anel intramolecular, ou ainda à presença de outros resíduos modificados, como a 2,3- dideidroalanina (Dha) ou a 2,3-didehidrobutirina (Dhb), em sua estrutura química (Cotter, Hill e Ross, 2005; Ghalfi et al., 2010; McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Miller, Chumchalova e McMullen, 2010). As bacteriocinas da classe I mais conhecidas são a nisina A e suas variantes naturais Z, Q, U e F.

1.2.1. Nisina e suas aplicações em alimentos

A nisina foi descoberta na Inglaterra em 1928, durante observação do metabolismo de uma linhagem especial de *Streptococcus lactis* (reclassificado posteriormente como *Lactococcus lactis*), capaz de inibir cepas de bactérias lácticas pela liberação de uma substância protéica. Esta proteína foi isolada e denominada nisina. O nome deriva de “*Group N Inhibitory Substance*” acrescido do sufixo “-ina”, comumente utilizado para antibióticos (Settanni e Corsetti, 2008).

Em 1947, a nisina foi purificada a partir de culturas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e utilizada inicialmente como agente terapêutico no controle da mastite em animais. Posteriormente, em 1951, foi proposto seu uso como antimicrobiano alimentar devido à sua degradação pelas enzimas digestivas do trato gastrointestinal (Thomas, Clarkson e Delves-Broughton, 2000).

A primeira preparação comercial de nisina (Nisaplin®) foi feita em 1953 pela empresa Aplin and Barrett, Ltd., Inglaterra, comercializada atualmente pela empresa Danisco A/S, Dinamarca. Porém, a aprovação da Food and Drug Administration para utilização em alimentos ocorreu apenas em 1988. Após o seu reconhecimento como GRAS, houve um considerável aumento no interesse pela nisina e outras bacteriocinas como agentes de conservação de alimentos (Bastos, Coutinho e Coelho, 2010; Maragkoudakis *et al.*, 2009; McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Tafreshi *et al.*, 2010).

A nisina é produzida durante a fase exponencial da multiplicação de *L. lactis* subsp. *lactis*, geralmente cessando sua produção quando o microrganismo entra na fase estacionária (Gillor, Etzion e Riley, 2008; Nes, Yoon e Diep, 2007; Tafreshi *et al.*, 2010). A nisina é sintetizada nos ribossomos como um pré-peptídeo

biologicamente inativo, que é posteriormente modificado enzimaticamente e transportado para o ambiente extracelular, onde se torna uma molécula ativa. O processo envolve genes de transcrição organizados em quatro operons: *nisABTCIPRK*, *nisI*, *nisRK* e *nisFEG* (Lubelski *et al.*, 2008).

Até o momento, cinco variantes naturais de nisina são conhecidas: nisina A, nisina Z, nisina Q, nisina U e nisina F (Kwaadsteniet, Ten Doeschate e Dicks, 2008). A nisina A, a primeira a ser descoberta, difere da nisina Z apenas no aminoácido da posição 27, possuindo uma histidina no lugar da asparagina. A nisina Q difere da nisina A por apresentar modificações nos aminoácidos das posições 15, 21, 27 e 30. A nisina U apresenta alterações nos aminoácidos das posições 4, 15, 18, 20, 21, 27, 29, 30 e 31, quando comparada à nisina A. Já a nisina F, recentemente caracterizada por Kwaadsteniet, Ten Doeschate e Dicks (2008), possui uma isoleucina no lugar da valina na posição 30, quando comparada à nisina Q. Apesar das diferenças nas posições dos aminoácidos, a atividade antimicrobiana das nisinas é bastante similar (Lubelski *et al.*, 2008). A Figura 1 apresenta a estrutura química das nisinas A, Z, Q e U.

Com exceção da nisina U produzida por *Streptococcus uberis* isolado de secreções mamárias de bovinos (Jayarao *et al.*, 1991; Wirawan *et al.*, 2006), todas as outras variantes naturais de nisina conhecidas até o momento são produzidas por cepas de *Lactococcus lactis*.

Figura 1: Estrutura primária das variantes naturais de nisina: A, Z, Q e U. Dha, dehidroalanina; Dhb, dehidrobutirina; Ala-S-Ala, lantionina; Abu-S-Ala, metil-lantionina. Os aminoácidos marcados em cinza diferem dos aminoácidos da nisina A.

Fonte: <https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/29669/lantibio.pdf?sequence=1>

A cepa produtora da nisina A foi isolada a partir de uma cultura “starter” utilizada para a fabricação de queijos (Gross e Morell, 1971), enquanto que cepas produtoras de nisina Z foram isoladas de queijos (Mulders *et al.*, 1991; Olasupo *et al.*, 1999), Kimchi (Park, Itoh e Fujisawa, 2003), Dahi (Mitra, Chakrabartty e Biswas, 2007) e leite cru (Bravo, Rodríguez e Medina, 2009). *L. lactis* produtor da nisina Q foi isolado de água do rio Hikosan, no Japão (Zendo *et al.*, 2003), e a cepa produtora de nisina F foi isolada do intestino de peixes (*Clarias gariepinus*) de água doce na África do Sul (Kwaadsteniet, Ten Doeschate e Dicks, 2008). Até o momento não há informação sobre BAL isolada de vegetais crus capazes de produzir nisina.

A nisina tem um espectro de ação limitado, sendo ativa contra alguns microrganismos Gram positivos, como *Lactococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Listeria* spp, *Mycobacterium* spp, e células vegetativas ou esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Normalmente a nisina não tem ação inibitória contra microrganismos Gram negativos. No entanto, há relatos sobre a atividade quando a nisina é utilizada em combinação compostos que causam lesões na membrana celular de bactérias Gram negativas, como agentes quelantes (EDTA, por exemplo) e tensoativos (SDS, por exemplo) (Hammou *et al.*, 2010; Pranoto, Rakshit e Salokhe, 2005; Samelis *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação dos lantibióticos ainda não está totalmente esclarecido. Estudos indicam que a porção N-terminal da molécula de nisina é capaz de interagir com grupos fosfolipídicos na membrana citoplasmática das células alvo, interferindo na síntese de peptideoglicanos, enquanto que a porção C-terminal é a responsável pela formação de poros (Cotter, Hill e Ross, 2005). Desta maneira, a nisina pode apresentar um modo de ação duplo: ela pode se ligar

ao lipídeo II, que é o principal transportador de subunidades de peptideoglicanos do citoplasma para a parede celular, impedindo a síntese da parede celular e levando a célula à morte; ou ainda pode utilizar o lipídeo II como uma molécula de acoplamento para sua inserção na membrana, levando à formação de poros e consequente dissipação da força próton-motriz, inibição do transporte de aminoácidos e o efluxo de substâncias com baixo peso molecular, como íons e ATP (Cotter, Hill e Ross, 2005; Richard *et al.*, 2006; Wilson-Stanford *et al.*, 2009). Na Figura 2 é possível visualizar o duplo modo de ação da nisina.

Figura 2: Mecanismos de ação da nisina. A dupla ação está representada por sua ligação à membrana, causando a formação de poros e também o bloqueio da síntese de peptideoglicanos da parede celular.

Fonte: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n10/images/nrmicro1273-f2.gif>

1.3. BAL como cultura probiótica em alimentos funcionais

Outra aplicação bastante importante das BAL em alimentos está relacionada aos produtos probióticos com atribuição do status de alimento funcional. Estes alimentos têm um grande apelo comercial, diretamente relacionado com seu potencial terapêutico e/ou benefícios conferidos ao organismo (Kimoto-Nira *et al.*, 2009; O'Flaherty e Klaenhammer, 2010).

O termo probiótico deriva da expressão grega “*pro bios*”, que significa “a favor da vida” (Hörmannspurger e Haller, 2010). Segundo a ANVISA (Brasil, 2002), as bactérias probióticas são “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo”. De acordo com a FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*, 2001), probióticos são definidos como “microrganismos vivos que oferecem benefícios ao organismo quando ingeridos em quantidades adequadas”.

Alguns dos efeitos benéficos à saúde atribuídos ao consumo de produtos probióticos descritos na literatura incluem: o aumento da resistência contra invasão de agentes patogênicos na mucosa do TGI, a prevenção da diarreia do viajante, da diarreia infantil e da síndrome do intestino irritável, o fortalecimento do sistema imunológico, a redução da intolerância à lactose, a redução dos níveis séricos de colesterol, a prevenção da osteoporose e o melhor aproveitamento dos nutrientes dos alimentos (Culligan, Hill e Ross, 2009; Oelschlaeger, 2010; O'Flaherty e Klaenhammer, 2010; Ranadheera, Baines e Adams, 2010; Sanders, 2008). Outros benefícios estão relacionados à prevenção e tratamento de doenças crônicas dos trato gastrointestinal, respiratório e urogenital (Culligan, Hill e Ross, 2009; O'Flaherty e Klaenhammer, 2010; Ranadheera, Baines e Adams, 2010).

Recentemente, Oelschlaeger (2010) propôs uma classificação para o efeito terapêutico dos probióticos, baseada em três mecanismos distintos de ação no TGI: (1) efeito imunomodulador, ou seja, capacidade de modular as defesas do hospedeiro, incluindo a imunidade inata e o sistema imune adquirido; (2) efeito antimicrobiano, ou seja, ação direta sobre outros microrganismos comensais e/ou agentes patogênicos, competindo por nutrientes ou indisponibilizando sítios de adesão; e (3) efeito modulador, ou seja, inativação de toxinas e desintoxicação do hospedeiro, atuando no metabolismo e digestão de componentes dos alimentos no ambiente do TGI. Os três modos de ação estão envolvidos de alguma forma na defesa contra infecções, na prevenção de câncer e na manutenção ou reconstituição do equilíbrio fisiológico da microbiota intestinal (Oelschlaeger, 2010).

Para proporcionar algum benefício ao organismo, as BAL probióticas devem atingir 10^6 - 10^9 UFC/g do conteúdo intestinal (Kimoto-Nira *et al.*, 2009). No Brasil, a ANVISA (Brasil, 2002) estipula que a quantidade mínima viável do probiótico no produto pronto para o consumo deva estar entre 10^8 e 10^9 UFC/g.

Os principais representantes das bactérias probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, pois não apresentam fatores de virulência para o organismo humano (Moussavi e Adams, 2010; Sakar, 2010; Sanders, 2008). É importante ressaltar que o gênero *Bifidobacterium*, apesar de ser tradicionalmente designado como BAL, utiliza a enzima frutose-6-fosfoquinase (*bifid shunt*) para a degradação das hexoses, estando portanto filogeneticamente separado do grupo das BAL (Felis e Dellaglio, 2007).

Na lista de alegações da ANVISA (Brasil, 2008), são consideradas bactérias probióticas com uso permitido no Brasil as seguintes espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei rhamnosus*,

Lactobacillus casei variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. Porém, estudos recentes citam ainda *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium essensis*, *Bifidobacterium laterosporus*, outras espécies como *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus thermophilus*, e algumas espécies dos gêneros *Propionibacterium*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* como as principais espécies microbianas utilizadas como probióticos (Ranadheera, Baines e Adams, 2010).

Segundo Sakar (2010), a seleção de uma cepa probiótica de uso em alimentos funcionais depende não apenas de sua capacidade de causar um benefício de saúde definido, mas também de algumas características fisiológicas do microrganismo, tais como tolerância à bile e ao pH ácido. A atividade antimicrobiana é também um fator importante, mas sabe-se que cepas probióticas semelhantes podem ter diferentes mecanismos de ação contra patógenos (Culligan, Hill e Ross, 2009; Hörmannspurger e Haller, 2010; Sakar *et al.*, 2010; Wohlgemuth, Loh e Blaut, 2010).

Uma das características mais importantes das cepas probióticas está relacionada com sua sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Frizzo *et al.*, 2010; Fujiwara *et al.*, 2001; Maragkoudakis *et al.*, 2006). Para esta avaliação, frequentemente são utilizados testes simulados *in vitro*, que são

limitados uma vez que não reproduzem com fidelidade as condições encontradas no trato gastrointestinal. O comportamento dos microrganismos nos testes *in vitro* pode ser muito diverso do observado *in vivo* (Bonomo *et al.*, 2010; Dunne *et al.*, 2001; Golod *et al.*, 2009; Morelli, 2007; Sakar *et al.*, 2010). No entanto, os testes *in vivo* também são limitados por não reproduzem adequadamente o TGI humano, já que modelos animais como ratos, porcos e cachorros são utilizados. Além disso, em função da diversidade de fatores, os resultados das culturas avaliadas são em sua maioria reportados como espécie-dependentes (Bernbom *et al.*, 2006; Gronbach *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2008). Uma alternativa para avaliar de forma mais adequada a viabilidade de culturas probióticas durante a passagem no trato gastrointestinal é a utilização de modelos dinâmicos capazes de mimetizar as condições do trato gastrointestinal e a cinética do processo de digestão, tal como o modelo TIM-1, desenvolvido pelo TNO (*The Netherlands Organization for Applied Scientific Research*), Zeist, Holanda (Kheard *et al.*, 2010; Marteau *et al.*, 1997; Minekus *et al.*, 1995). O modelo dinâmico TIM-1 oferece precisão, reprodutibilidade, fácil manipulação e possibilidade de coleta de amostras em qualquer ponto do trato digestivo e em qualquer momento durante a digestão, sem restrições éticas como as necessárias quando se utiliza modelos animais (Blanquet *et al.*, 2004). Além disso, resultados obtidos utilizando-se o modelo TIM-1 em relação à cinética de trânsito intestinal e concentrações de ácido e bile durante a digestão (Minekus *et al.*, 1995), à sobrevivência microbiana no estômago e no intestino delgado (Marteau *et al.*, 1997), à biodisponibilidade de minerais em cereais (Larsson, Minekus e Havenaar, 1997) e à biodisponibilidade de vitaminas em leite (Verwei *et al.*, 2006) foram validados quando comparados à estudos com voluntários humanos ou com animais monogástricos.

Apesar de inúmeros estudos terem avaliado a sobrevivência de bactérias lácticas probióticas no TGI, a capacidade de produção de bacteriocinas por estas culturas no ambiente do trato gastrointestinal humano raramente é estudada (Ross *et al.*, 2010; Sleator, 2010). Os possíveis efeitos benéficos do estabelecimento destas culturas no ambiente competitivo do intestino são ainda pouco conhecidos, justificando o desenvolvimento deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo global

Isolar bactérias lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas a partir de alimentos de origem vegetal, caracterizar as bacteriocinas produzidas e avaliar o potencial probiótico destas culturas, mensurando-se sua capacidade de sobreviver e de produzir bacteriocinas durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar novas BAL produtoras de bacteriocinas a partir de amostras de rúcula comercializada na cidade de São Paulo – SP, utilizando métodos fenotípicos e genotípicos;
- Caracterizar as bacteriocinas produzidas pelas BAL isoladas quanto à sua natureza protéica, estabilidade, espectro de ação e dinâmica de produção;
- Identificar as bacteriocinas produzidas através da determinação dos genes envolvidos em sua produção e do sequenciamento por espectrometria de massas após purificação por cromatografia de fase líquida (HPLC);
- Avaliar a sobrevivência das BAL e sua capacidade de produção de bacteriocinas no trato gastrointestinal humano, utilizando o modelo dinâmico

TIM-1 (*TNO gastro-Intestinal Model*), disponível no TNO (*The Netherlands Organization for Applied Scientific Research*), Zeist, Holanda;

- Avaliar a influência das BAL bacteriocinogênicas na sobrevivência do microrganismo entérico *E. faecium* LMA1 no trato gastrointestinal humano, utilizando o modelo dinâmico TIM-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento e identificação de bactérias lácticas

3.1.1. Isolamentos de bactérias lácticas

Porções de 10g de rúcula crua obtidas no mercado local de São Paulo, SP (Brasil) foram homogeneizadas com 90 ml de água peptonada (AP) 0,1% esterilizada, empregando-se um homogeneizador de pistões (Stomacher - Seward Medical, Inglaterra). A partir deste homogeneizado foram preparadas diluições decimais seriadas em AP e alíquotas de um mililitro destas diluições foram inoculadas em placas contendo o meio seletivo para bactérias lácticas MRS ágar (Difco). As placas foram incubadas em aerobiose por até 96 horas a 30°C. Dez a doze colônias foram selecionadas aleatoriamente e purificadas em ágar MRS (Difco) pelo método de esgotamento. As culturas puras foram armazenadas a -70°C em caldo MRS (Difco) suplementado com glicerol (20%, v/v).

3.1.2. Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados

As colônias isoladas foram primeiramente submetidas a testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que incluíram coloração de Gram, produção de catalase e oxidase e tolerância a 15% de cloreto de sódio ou a 20% de sais biliares (Kučerová *et al.*, 2007). A coloração de Gram foi feita através do tratamento de células devidamente fixadas em lâminas de vidro com cristal violeta, lugol, álcool e

fucsina. O teste de catalase foi feito adicionando-se uma gota de peróxido de hidrogênio à superfície das culturas cultivadas em ágar MRS (Difco), observando-se o borbulhamento imediato da cultura. A produção de oxidase foi testada com o auxílio de tiras de Oxidase (Laborclin Ltda.).

Para o teste de tolerância ao sal e sais biliares, frascos contendo caldo MRS (Difco) foram acrescentados de NaCl (Sigma) para a concentração final de 15% (p/v) ou de sais biliares (Oxoid) para a concentração final 20% (p/v), inoculados com os isolados e incubados em aerobiose a 30°C por 48 horas. Após este período, uma alíquota de cada caldo foi transferida para placas contendo ágar MRS (Difco) e incubadas novamente em aerobiose a 30°C por 24 horas. A presença de colônias nas placas foi interpretada como resistência a 15% de NaCl ou 20% de sais biliares.

Colônias com características de cocos ou bacilos Gram positivos, catalase e oxidase negativas, capazes ou não de se multiplicarem em MRS acrescido de 15% de NaCl ou 20% de sais biliares foram consideradas bactérias láticas.

3.1.3. Avaliação inicial da atividade antimicrobiana das BAL isoladas

Dos isolados iniciais, apenas sete foram identificados como bactérias láticas e submetidos ao teste *spot-on-lawn* para detecção da capacidade de inibir *Listeria monocytogenes* Scott A e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 (Lewus e Montville, 1991). Para isso, os sete isolados foram cultivados em caldo MRS (Difco) a 30°C por 24 horas e as culturas foram submetidas à centrifugação 12.000 x g por 10 minutos. O pH dos sobrenadantes foi ajustado para 6,0, utilizando-se solução de

NaOH 10 N (Sigma), para evitar uma possível atividade inibitória decorrente da produção de ácidos orgânicos. Em seguida os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana (0,22 µm – Millipore, Estados Unidos) e transferiu-se 10µL para a superfície de placas com ágar BHI (Difco) contendo 10^5 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* Scott A ou ágar MRS (Difco) contendo 10^5 UFC/ml de *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. A formação de um halo de inibição de multiplicação bacteriana no local onde o sobrenadante foi colocado indicou a atividade antimicrobiana. Dos isolados testados, apenas um, denominado MK02R, apresentou atividade antimicrobiana, assim que somente este isolado foi utilizado no desenvolvimento do restante do trabalho.

3.1.4. Identificação do isolado MK02R

Para a identificação, o isolado MK02R foi submetido a testes moleculares de sequenciamento da seção intergênica 16-23S DNAr por PCR-ARDRA de acordo com Moreira *et al.*, (2005).

O DNA total do isolado MK02R foi extraído utilizando-se o kit Qiagen ® "Blood DNeasy & Tissue Kit" (Qiagen, Valencia, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA ribossomal da seção intergênica 16S-23S foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos ou *primers* universais 16-1A, 5'-GAATCGCTAGTAATCG- 3' e 23-1B, 5'-GGGTTCCCCCATTCGGA-3' (Moreira *et al.*, 2005). O programa de amplificação utilizado foi: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 1 min 72°C por 1 min e 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TBE (0,5% Tris-Borato-EDTA) e visualizados por transiluminador UV, após coloração com brometo de etídio. Supercoiled DNA Ladder (1 Kb) (GE Healthcare Bio-Sciences – Inglaterra) foi utilizado como o marcador de peso molecular. Os genes de interesse foram selecionados pelo número e tamanho das bandas dos fragmentos de DNA gerados pelo isolado. O peso molecular esperado da amplificação do 16-23S DNA_r pode variar entre 500 a 900 pb, dependendo da espécie de BAL detectada. Os fragmentos que apresentaram peso molecular compatível com os genes de interesse foram purificados utilizando-se o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Bio-Sciences - Inglaterra), submetidos ao método PCR-ARDRA (ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), e então sequenciados.

Os experimentos de amplificação do DNA, os ensaios com enzimas de restrição e o sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados obtidos na PCR foram realizados no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2. Identificação e caracterização das bacteriocinas

As bacteriocinas produzidas pelo isolado MK02R foram caracterizadas através de uma série de ensaios bioquímicos e térmicos. Em todos estes ensaios, a atividade antimicrobiana foi monitorada empregando-se o método *spot-on-lawn*

utilizando as culturas de *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como microrganismos indicadores, conforme descrito no item 3.1.3..

3.2.1. Avaliação da natureza protéica

A natureza protéica das substâncias antimicrobianas produzidas pelo isolado MK02R foi verificada através do tratamento com protease tipo XIV (5,8 U/mg - Sigma), proteinase K (45,2 U/mg - Sigma), α -quimiotripsina (55 U/mg - Sigma), pepsina (Merk, INGLATERRA) e papaína (Wallerstein Ltda) na concentração final de 1 mg/ml em 0,2 M tampão fosfato pH 7,0. Alíquotas do sobrenadante da cultura de MK02R obtidas conforme descrito no item 3.1.3. foram incubadas na presença das enzimas por 2 horas a 37°C. Em seguida essas amostras foram aquecidas a 100°C por 2 minutos, para inativar as enzimas adicionadas, e garantir que a inibição dos microrganismos indicadores se desse efetivamente pela ação da bacteriocina. Alíquotas de caldo MRS (Difco) esterilizado adicionado das enzimas em tampão fosfato pH 7,0 serviram como controles negativos do experimento. A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se o método *spot-on-lawn*, conforme descrito no item 3.1.3..

3.2.2. Caracterização da bacteriocina produzida pelo isolado

MK02R

A bacteriocina produzida pelo isolado MK02R foi caracterizada através de uma série de ensaios bioquímicos e térmicos. Em todos os ensaios, a atividade

antimicrobiana da bacteriocina foi monitorada empregando-se o método *spot-on-lawn*, conforme descrito no item 3.1.3.

3.3.2.1 Avaliação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica das bacteriocinas produzidas pelo isolado MK02R foi determinada incubando-se o sobrenadante da cultura, obtido conforme descrito no item 3.1.3., a 60°C e 100°C por 10, 30 e 60 minutos. Também foi avaliada a resistência da bacteriocina à temperatura de esterilização, ou seja, a 121°C por 15 min. Como controle positivo, empregou-se o sobrenadante não submetido aos testes de calor.

3.3.2.2. Avaliação da influência do pH

A influência do pH sobre a estabilidade das bacteriocinas produzidas pelo isolado MK02 foi avaliada ajustando o pH do sobrenadante da cultura para 2,0; 6,0 e 9,0 utilizando HCl 1M (Sigma) ou NaOH 1M (Sigma) e incubando a 37°C por 2 horas. A atividade residual da bacteriocina foi testada após o ajuste do pH para 6,0, a fim de evitar a interferência do pH na avaliação da atividade do peptídeo. A atividade antimicrobiana foi determinada pela presença de uma zona clara de inibição na cultura dos microrganismos indicadores.

3.3.2.3. Avaliação da sensibilidade à compostos tensoativos, detergentes e NaCl

Para esta avaliação, amostras separadas do sobrenadante da cultura do isolado MK02R foram acrescentadas de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 1% (Sigma), uréia 1% (Sigma), EDTA (Ácido etilonodiamino tetra-acético) 1% (Sigma) ou NaCl 6,5% (Sigma) e incubadas por 5 horas a 37°C. Alíquotas do sobrenadante sem a adição destes compostos e alíquotas destes compostos dissolvidos em água destilada estéril foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

3.3.2.4. Avaliação do espectro de ação

O espectro de ação foi avaliado utilizando-se os microrganismos listados na Tabela 5, que apresenta também os meios de cultivo e temperatura utilizados, assim como a origem destes microrganismos. Para este teste, o sobrenadante da cultura MK02R foi diluído sucessivamente na razão de 1:2 (v/v) em placas de microtitulação estéreis (Microwel Plates 96F), utilizando-se o diluente MES (2 - [N-morfolina] etanosulfônico). As diluições foram submetidas ao teste *spot-on-lawn* conforme descrito no item 3.1.3. em placas contendo os diferentes microrganismos em teste, quantificando-se a atividade antimicrobiana de acordo com Rosa *et al.* (2002). A atividade foi calculada em unidades arbitrárias (UA) por ml, sendo uma UA definida como a recíproca da maior diluição que apresentou inibição. A

sensibilidade à bacteriocina foi determinada pela presença de uma zona clara de inibição na cultura dos microrganismos indicadores.

Uma solução contendo 25 mg/ml de Nisaplin® (Danisco A/S, Dinamarca) diluída em HCl 0,1 N (Sigma), esterilizada por filtração em membrana (0,22 µm – Millipore, Estados Unidos) foi utilizada em paralelo neste teste para comparação dos resultados obtidos.

Tabela 5: Cepas bacterianas e condições de cultivo empregadas na determinação do espectro da bacteriocina produzida pelo isolado MK02R

Culturas	Temperatura de incubação	Meio de cultura
Gram-positivas		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	30°C	TSBye
<i>Enterococcus faecium</i> LMA1 (a)	37°C	TSBye
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (b)	30°C	MRS
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	30°C	MRS
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a (c)	30°C	MRS
<i>Listeria innocua</i> (d)	37°C	TSBye
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	37°C	TSBye
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	37°C	TSBye
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	37°C	TSBye
Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	37°C	TSBye
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150	37°C	TSBye
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	37°C	TSBye
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	37°C	TSBye
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 7644	37°C	TSBye
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	37°C	TSBye
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	37°C	TSBye

(a) Isolada de alimentos (b) Isolada de leite; (c) Isolada de linguiça frescal; (d) Isolada de carne de frango; TSBye: Caldo Trypticase de Soja (Difco) acrescido de 0,5% de extrato de levedura (Sigma); MRS: caldo MRS (Difco)

3.2.3. Avaliação da ação da bacteriocina MK02R

3.2.3.1. Avaliação da inibição da multiplicação microbiana

O potencial de inibir a multiplicação celular foi avaliado através da adição de 20 ml do sobrenadante do isolado MK02R, obtido conforme descrito no item 3.1.3., a 100 ml da cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A e de *Listeria innocua* em meio BHI e de *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 em MRS, na fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} \sim 0,02$) (Todorov *et al.*, 2008). Os frascos foram incubados a 37°C e a multiplicação dos microrganismos foi monitorada através de leituras da densidade ótica (DO_{600nm}) a cada hora até o tempo máximo de 14 horas. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Ultraspec® 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos). Como controle positivo utilizou-se a cultura dos microrganismos indicadores sem a adição do sobrenadante da cultura do isolado MK02R.

3.2.3.2. Avaliação da capacidade de causar lise celular

O potencial de causar lise nas células viáveis dos microrganismos indicadores pela bacteriocina MK02R foi avaliado através da adição do sobrenadante da cultura a um volume igual de cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A e de *Listeria innocua* em meio BHI e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 em MRS no início da fase estacionária de multiplicação ($DO_{600nm} \sim 0,8-1,5$). Para isso, os microrganismos indicadores foram cultivados a 37°C por até 18 horas para que

atingissem o início da fase estacionária de multiplicação, e então foram centrifugados a 5000 x *g* por 5 min (4°C), lavados com solução salina esterilizada (SS) por duas vezes e ressuspensos em 10 ml de SS. Volumes iguais do sobrenadante da cultura de MK02R, obtidos conforme descrito no item 3.1.3., foram adicionados às culturas indicadoras e incubados por 1 hora a 37°C. A determinação do número de células viáveis dos microrganismos indicadores foi feita através da semeadura em ágar antes e após a incubação e seu resultado foi expresso em UFC/ml. Suspensões dos três microrganismos indicadores sem a adição do sobrenadante da cultura MK02R foram utilizadas como controles positivos de multiplicação.

3.2.4. Avaliação da influência da temperatura e da presença de cisteína na produção da bacteriocina MK02R

Nesta avaliação, o isolado MK02R foi cultivado em 250 ml de caldo MRS a 25°, 30° ou 37°C, na presença de L-mono-cisteína (Sigma) 0,0%, 0,5% e 1,0%, a fim de avaliar a melhor combinação de temperatura e concentração de cisteína para a produção da bacteriocina. A cisteína é um agente redutor que promove a formação de um ambiente anaeróbio no meio de cultura, estimulando a multiplicação das BAL (Ravula e Shah, 1998). A multiplicação bacteriana foi monitorada através de leituras de absorbância a 600 nm, usando um espectrofotômetro (Ultraspec® 2000, Amershan Pharmacia Biotech, Estados Unidos), a cada hora durante 17 horas. A produção de bacteriocina nas diferentes

condições de cultivo foi determinada pelo método *spot-on-lawn*, conforme descrito no item 3.1.3., utilizando-se *L. sakei* ATCC 15521 como cultura indicadora.

3.2.5. Determinação da presença do gene de nisina no isolado MK02R

O DNA total do isolado MK02R foi extraído pelo kit Qiagen® "DNeasy Blood & Tissue Kit" (Qiagen, Valencia, Estados Unidos) seguindo a recomendação do fabricante. O DNA isolado foi amplificado com os primers Nisf, 5'- ATG AGT AAA ACA GAT TTC AAC TT - 3' e Nisr, 5'- TTA TTT GCT GTG TAC AAC CG - 3', construídos com base no gene estrutural da nisina Q (GenBank AB100029) descrito por Kwaadsteneit *et al.* (2008), que deve gerar um fragmento com peso molecular de 898 pb (Bravo, Rodríguez e Medina, 2009). As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 94°C por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 45 s, 48°C por 30 s, e 72°C por 45 s; e 1 ciclo de 72°C durante 7 min. Os produtos da PCR foram purificados com o kit de purificação QiaQuick PCR (Qiagen) e sequenciados por empresa terceirizada. A sequência de aminoácidos da bacteriocina MK02R foi deduzida pelos códons (Anexo 2) do DNA amplificado utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e sua homologia foi comparada com as sequências das variantes naturais de nisina listadas no GenBank.

3.2.6. Adsorção da bacteriocina MK02R às células produtoras

Este teste foi feito com o objetivo de avaliar a adsorção da bacteriocina à membrana citoplasmática da própria cepa produtora. Foi utilizado o método descrito por Yang, Johnson e Ray (1992), que consiste na obtenção da maior quantidade possível de bacteriocinas livres em solução através do abaixamento do pH, que provoca uma alteração na tensão da membrana celular, liberando para a solução os peptídeos naturalmente aderidos às membranas das células produtoras. Para isto, uma cultura do isolado MK02R com 18 horas de incubação em aerobiose a 30°C teve seu pH ajustado para 6,0 com uma solução de NaOH 1M (Oxoid) esterilizada. A cultura foi centrifugada (20.000 x *g*, 15 min, 4°C), as células foram lavadas com tampão fosfato 0,1M (pH 6,5) esterilizado e ressuspensas em 10 ml de NaCl 0,1M (Sigma), pH 2,0, sendo então mantidas sob agitação constante a 4°C por 1 hora. Em seguida, a cultura foi novamente centrifugada (20000 x *g*, 15 min, 4°C), selecionando-se o sobrenadante, que teve o pH neutralizado a 7,0 com NaOH 1M (Sigma). A atividade antimicrobiana da solução foi avaliada pelo método *spot-on-lawn* de acordo com Rosa *et al.*, (2002), com modificações (Todorov *et al.*, 2008), conforme descrito no item 3.1.3..

3.2.7. Purificação da bacteriocina MK02R

Uma cultura de 24 horas do isolado MK02R (2%, v/v) foi adicionada a 8L de caldo MRS (Difco) acrescido de 0,5 mg/ml de cisteína (Sigma). Após incubação a 30°C, sem agitação, por 18 horas a cultura foi submetida à centrifugação (3.000 x

g, 10 min, 4°C). Após a remoção do sobrenadante, as células foram submetidas a uma extração ácida, conforme descrito por Yang, Johnson e Ray (1992) e Rosa *et al.* (2002). Para isto o sedimento foi submetido à duas lavagens com tampão 2 - [N-morfolina] etanosulfônico (MES, Sigma) a 0,5 M, pH 6,5, e ressuspenso em 400 mL de solução de NaCl 0,1 M (Sigma) com pH ajustado para 1,5 com ácido fosfórico (Sigma) concentrado. Após 2 horas de agitação a 4°C, a suspensão foi novamente centrifugada a 3000 x g por 15 min a 4°C. Em seguida, o pH do sobrenadante foi neutralizado a 7,0 com NaOH 20N (Sigma) e submetido à diálise e concentração através do sistema Amicon (Millipore, Bedford, Estados Unidos), utilizando-se membranas com limite de exclusão de 1.000 Da. Este extrato foi esterilizado por filtração em membrana (0,22 µm – Millipore, Estados Unidos) e posteriormente submetido aos testes de atividade antimicrobiana conforme descrito no item 3.1.3..

3.2.8. Análise por cromatografia de fase líquida (HPLC) e espectrometria de massas

O extrato obtido no item 3.2.7. foi purificado por HPLC (Waters Delta 600, Milford, Estados Unidos), utilizando-se uma coluna preparativa de fase reversa. As amostras foram carregadas na coluna C18 Júpiter (21,2 x 250 mm, 15 mm, 300 poros, Phenomenex, Torrance, Estados Unidos) com gradientes lineares (declive B 0,33%/min) e eluídas utilizando-se os solventes A (TFA/H₂O 0,1%) e B (0,1% TFA/H₂O: CH₃CN - 40:60) com uma vazão de 10,0 ml/min. As frações contendo a bacteriocina purificada foram injetadas em HPLC contendo uma coluna C18 Nova-

Pak (2,2 × 150 mm, 3,5 μ m, 60 poros, Waters C18) acoplado a um espectrofotômetro de massas Micromass (ZMD- Waters Corporation, Milford, MA.). A eluição foi realizada em 30 minutos utilizando gradiente linear de acetonitrila (CH₃CN) acidificado de 5% a 95% a uma vazão de 0,4 ml/min. A absorbância foi medida entre 191 e 400 nm, utilizando um modelo de arranjo de diodos Waters 996. As medições das massas foram realizadas com escala de massa entre 500 e 3.930 m/z (relação massa/carga) (fluxo de gás nitrogênio: 2,6 L/h; agulha: 2,5 kV; cone de tensão: 47 V; aquecedor da fonte: 105°C; aquecedor do solvente: 400°C, energia íon 1,0 V e multiplicador: 996 V) (Fukao *et al.*, 2008). Os experimentos de HPLC e espectrometria de massas foram realizados no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

3.3. Avaliação da sobrevivência das BAL no ambiente simulado do trato gastrointestinal humano, utilizando o modelo dinâmico TIM-1

Para a avaliação da sobrevivência das BAL no ambiente do TGI humano utilizou-se o modelo dinâmico *INO gastro-Intestinal Model* (TIM-1), descrito por Minekus *et al.* (1995), disponível no TNO (*The Netherlands Organization for Applied Scientific Research*) divisão *Quality of Life* (Zeist, Holanda) (Figura 3).

O modelo TIM-1 é composto por quatro compartimentos conectados que simulam o estômago, o duodeno, o jejuno e o íleo. Cada compartimento é constituído de dois tubos de vidro com tubos plásticos flexíveis em seu interior. O espaço entre os tubos plásticos flexíveis e os tubos de vidro é preenchido com

água aquecida a 37°C com o objetivo de simular a temperatura do corpo humano. Além disso, esta água é submetida à pressão pulsante controlada por sensores e monitorada por computador, de forma a simular os movimentos peristálticos do estômago e do intestino delgado. As frequências de contrações são de cinco e seis vezes por minuto para os compartimentos gástrico e duodenal, respectivamente, e de sete vezes por minuto para os compartimentos do jejuno e do íleo.

Figura 3: Esquema simplificado do modelo dinâmico TIM-1 (TNO). A) compartimento do estômago; B) esfíncter pilórico; C) compartimento do duodeno; D) válvula peristáltica; E) compartimento do jejuno; F) válvula peristáltica; G) compartimento do íleo; H) válvula íleo-cecal; I) eletrodos de pH; J) frasco de secreção gástrica com ácidos e enzimas; K) frascos de secreções duodenais com e bicarbonato; L) soluções com eletrólitos para controle do pH intestinal; M) pré-filtro N) filtro com membranas de exclusão de 5 kDa; O) sistema de absorção de líquidos; P) fechamento do sistema de diálise.

Fonte: http://www.whole-isticsolutions.com/hr_pdf/research.pdf

O pH em cada compartimento e o trânsito do conteúdo luminal de um compartimento para outro são controlados por computador, simulando os índices esperados para o TGI de humanos, podendo ainda ser ajustado para simular o TGI de crianças ou animais. O pH é constantemente monitorado por eletrodos acoplados à todos os compartimentos e, quando necessário, uma solução de HCl 1M (Sigma) ou NaHCO₃ 1M (Sigma) é injetada para restabelecer o pH ideal de cada um dos compartimentos. O trânsito do conteúdo luminal é controlado por bombas e válvulas que são abertas automaticamente quando o volume excede a capacidade máxima de um determinado compartimento. As bombas injetam constantemente o suco gástrico dentro do compartimento do estômago, enquanto bile e suco pancreático são injetados no compartimento do duodeno. O suco gástrico contém pepsina (0,28 ml/mg) da mucosa gástrica de suínos (CE 3.4.23.1, Sigma-Aldrich, Brasil) e lipase (0,25 mg/ml) de *Rhizopus oryzae* (CE 3.1.1.3, Amano Pharmaceuticals, Japão) dissolvidos em uma solução de eletrólitos (NaCl, 3 g/l; KCl, 1,1 g/l; CaCl₂, 0,15 g/l; NaHCO₃ 0,60 g/l; pH 2,0). A secreção duodenal contém 7% de pancreatina em pó (Pancrex V, Paines & Byrne, Greenford, Reino Unido) e 4% de extrato de bile de suínos (Sigma-Aldrich Canadá, Ltd.), também dissolvidos numa solução de eletrólitos (NaCl, 5 g/l; KCl, 0,6 g/l; CaCl₂, 0,30 g/l; pH 7,0).

Nos compartimentos do jejuno e do íleo está acoplado um dispositivo tubular de fibras, contendo membranas semipermeáveis em seu interior, que dializam o fluido do quimo, simulando a absorção de nutrientes durante o processo de digestão. Compostos com até 5 kDa são filtrados pelas membranas e transferidos para o fluido de diálise. Esse sistema de absorção é ativado quando há mais fluido entrando pelo duodeno (via conteúdo luminal) que saindo pelo íleo

(via válvula íleo-cecal). Após a passagem por todos os compartimentos, as frações do fluido luminal são eliminadas do modelo e recolhidas em tubos acondicionados em gelo.

3.3.1. Preparo do modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1 para a realização dos experimentos

Antes de iniciar e após o término de cada experimento, o modelo foi desinfetado por 60 minutos com uma solução (10% v/v) de um detergente comercial contendo cloro em sua composição (Lavo Inc., Montreal, PQ, Canadá), seguido por lavagens sucessivas com água desmineralizada estéril. A completa eliminação de cloro foi monitorada mensurando-se o pH da água de lavagem em todos os compartimentos desinfetados, sendo considerados satisfatórios aqueles que apresentaram pH 6,0.

Os experimentos com o modelo TIM-1 foram realizados nas mesmas condições fisiológicas encontradas para o TGI humano. Assim, o pH do estômago foi ajustado para $2,0 \pm 0,5$, do duodeno para $6,5 \pm 0,5$, do jejuno para $6,5 \pm 0,5$, e do íleo para $7,0 \pm 0,5$, conforme indicado na Figura 4. As secreções digestivas foram injetadas à velocidade 0,5 mL/min de suco gástrico e 1,0 mL/min de bile e suco pancreático durante as seis horas de análise.

Figura 4: Média dos valores de pH nos compartimentos do estômago, duodeno, jejuno e íleo no modelo TIM-1, durante os experimentos.

O esvaziamento gástrico iniciou-se 20 minutos após a injeção da amostra em teste, seguido por um escape gradual e contínuo até o tempo máximo de 3,5 horas, momento em que houve a completa eliminação do volume contido no estômago. As frações liberadas do estômago circularam continuamente pelos compartimentos do duodeno, jejuno e íleo, seguindo a cinética das condições fisiológicas do TGI humano. Os volumes eliminados pelo compartimento íleo-cecal, ou seja, após a passagem completa pelo modelo TIM-1, foram denominados efluxo final. A Figura 5 apresenta os volumes médios de efluxo final obtidos desde a primeira até a sexta hora de análise.

Figura 5: Proporção dos volumes médios do efluxo final e de líquidos retidos durante os experimentos no modelo TIM-1.

3.3.2. Preparo do material para os testes no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1

Além do isolado MK02R, as cepas *L. sakei* 2a e *E. faecium* LMA1 também foram submetidas aos testes de sobrevivência no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1. A cepa *L. sakei* 2a, também isolada no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP por De Martinis e Franco (1998), foi selecionada por ser outra cepa de BAL produtora de bacteriocinas para fins de comparação de resultados. A cepa de *E. faecium* LMA1 foi selecionada por ser uma BAL intestinal, empregada como um indicador da atividade das BAL produtoras de bacteriocinas na redução de um patógeno entérico no ambiente intestinal.

O comportamento das cepas no modelo TIM-1 foi avaliado empregando-se as culturas isoladamente ou em combinação, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Microrganismos utilizados nos testes no modelo dinâmico TIM-1

Microrganismos	
1	Isolado MK02R
2	Isolado MK02R + <i>E. faecium</i> LMA1
3	<i>L. sakei</i> 2a
4	<i>L. sakei</i> 2a + <i>E. faecium</i> LMA1
5	<i>E. faecium</i> LMA1

O isolado MK02R e *L. sakei* 2a foram cultivados por 18 horas em caldo MRS (Difco) a 30°C e *E. faecium* LMA1 foi cultivado em BHI (Difco) a 37°C. As culturas foram centrifugadas (3.000 x g, 10 min, 10°C) e ressuspendidas em 10 ml de SS de forma a obter uma suspensão com 10⁹-10¹⁰ UFC/mL.

As soluções iniciais contendo enzimas (2.100 U/mg de pepsina, Sigma; 12.700 U/mg de tripsina Tipo III, Sigma e 15.000 U/mg de lipase, Amano Pharmaceuticals, Japão), suco gástrico (conforme descrito no item 3.4.), 250 g de água (Protocolo 1) ou 250 g de leite de vaca comercial esterilizado (Protocolo 2) (Tabela 7), foram adicionadas das suspensões bacterianas em teste. A utilização de dois protocolos diferentes objetivou avaliar a interferência de uma matriz alimentar (leite) na sobrevivência das BAL no TIM-1.

Tabela 7: Composição da amostra inicial injetada no modelo dinâmico TIM-1

Componentes	Protocolo	
	1	2
Água esterilizada	250 g	--
Leite de vaca esterilizado	--	250 g
Suco gástrico	50 g	50 g
Enzimas	5 g	5 g
Suspensão bacteriana	10 g	10 g
Total	315 g	315 g
pH final	5,5	5,5

3.3.3. Avaliação da sobrevivência das BAL no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1

A viabilidade dos microrganismos durante a passagem pelo modelo TIM-1 foi monitorada nas amostras da solução inicial antes de serem injetadas no equipamento (Tempo 0) e nas amostras do efluxo final, a cada hora, até o tempo máximo de 6 horas, através de semeadura *pour plate* conforme Hoben e Somasegaran (1982). Todas as amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em SS e alíquotas de um mililitro destas diluições foram transferidas para placas de petri vazias, às quais se adicionou ágar MRS para quantificação do isolado MK02R e *L. sakei* 2a ou ágar BHI para contagem de *E. faecium* LMA1, com incubação a 30°C e 37°C, respectivamente, por 24 horas. Nos ensaios realizados com culturas em combinação, adicionou-se neomicina (5mg/ml) para a contagem seletiva de *L. sakei* 2a, nisina (2mg/ml) para a contagem seletiva do isolado MK02R ou vancomicina (5mg/ml) para a contagem seletiva de *E. faecium* LMA1. Considerando a hipótese de aquisição de resistência aos antibióticos, os

microrganismos presentes nas placas foram confirmados através da adição de uma sobrecamada de ágar BHI contendo *E. faecium* LMA1 (10^5 UFC/ml), incubando-se a 30°C por mais 24 h. As colônias que apresentaram um halo de inibição sobre o microrganismo indicador da sobrecamada foram quantificadas como as BAL do objeto de estudo.

As contagens obtidas nas placas foram ajustadas de acordo com o fator de diluição dos líquidos ao longo de sua passagem no modelo TIM-1, com auxílio do *software* TIMALL 041201 disponível no TNO (*Quality of Life*, Zeist, Holanda). Os resultados foram expressos em log UFC/g.

3.3.4. Avaliação da atividade de bacteriocinas após o trânsito no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1

Para a avaliação da atividade das bacteriocinas nas amostras coletadas após a passagem pelo TIM-1 as enzimas digestivas presentes nessas amostras foram inativadas através de imersão imediata em água aquecida a 100°C por 10 min, seguida de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram neutralizados a pH 6,0 pela adição de NaOH 1M (Sigma), esterilizados por filtração em membrana (0,22 µm – Millipore, Estados Unidos) e submetidos ao teste de antagonismo *spot-on-lawn*, conforme descrito no item 3.1.3., utilizando-se *L. sakei* ATCC 15521 como cultura indicadora.

3.3.5. Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de sobrevivência no ambiente do TGI utilizando o modelo dinâmico TIM-1 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados, aplicou-se o teste de comparação T de Student. O programa utilizado foi o STATISTICA (StatSoft[®], versão 7.0 - Oklahoma, Estados Unidos).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e identificação das cepas de BAL isoladas de rúcula

Das colônias inicialmente isoladas das amostras de rúcula em ágar MRS, sete foram caracterizadas como bactérias lácticas. Estes isolados apresentaram a morfologia de cocos Gram positivos, com reações de catalase e oxidase negativas, sem multiplicação em MRS (Difco) acrescido de 15% NaCl ou de 20% de bile. Entretanto, apenas um destes isolados, denominado MK02R foi capaz de inibir *Listeria monocytogenes* Scott A e *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 nos testes iniciais de antagonismo, sendo o único isolado selecionado para a continuidade do trabalho.

Através dos testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e do sequenciamento do fragmento 16S-23S DNAr, o isolado MK02R foi identificado como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (doravante denominado *L. lactis* MK02R). O sequenciamento do DNA do isolado apresentou 99% de homologia esta espécie, conforme anotação genética disponível no GenBank (Anexo 1).

As figuras 6 e 7 apresentam os resultados da amplificação do DNA total de *L. lactis* MK02R e dos testes de restrição enzimática, respectivamente. Na Figura 6 é possível visualizar o fragmento amplificado com os primers utilizados, de peso molecular de aproximadamente 800 pb.

Figura 6: Produto de 800 pb gerado por amplificação do 16S-23S DNAr de *L. lactis* MK02R. Marcador de peso molecular (M) de 1 Kb.

O fragmento do 16S-23S DNAr do isolado MK02R extraído do gel de agarose (Figura 6) apresentou o perfil de *Lactococcus* nos testes de PCR-ARDRA visto que não foi restringido com as enzimas Sph, NcoI, Nhe, Ssp, Sfu, EcoRV, Vsp, Hinc, EcoRI, HindI e AvrII, mas apresentou clivagem positiva com a enzima Dra.

Figura 7: Restrição enzimática do amplicom do produto de PCR do 16S-23S DNAr de *L. lactis* MK02R. Os sinais positivos e negativos na parte inferior da figura significam clivagem positiva ou negativa, respectivamente. Marcador de peso molecular (M) de 1 Kb.

Cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, como a isolada neste estudo, são comuns em alimentos (Campos *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2002; Mitra, Chakrabartty e Biswas, 2007; Park, Itoh e Fujisawa, 2003; Ponce *et al.*, 2008), porém poucas são provenientes de vegetais crus (Ponce *et al.*, 2008). A maioria das cepas de *L. lactis* conhecidas atualmente são provenientes de produtos lácteos e seus derivados, vegetais fermentados ou produtos cárneos. Ponce *et al.* (2008) identificaram apenas uma cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* dentre 45 isolados obtidos de amostras de espinafre. Trias *et al.* (2008) identificaram apenas uma cepa de *L. lactis* dentre 496 isolados de BAL provenientes de amostras de frutas frescas, sementes, vegetais orgânicos não processados e saladas prontas para o consumo.

4.2. Caracterização da bacteriocina produzida por *L. lactis* MK02R

A atividade antimicrobiana do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R em caldo MRS (Difco) foi destruída após o tratamento com protease do tipo XIV (5,8 U/ml - Sigma), proteinase K (45,2 U/mg - Sigma), α -quimiotripsina (55 U/mg - Sigma) e papaína, mas não foi afetada pelo tratamento com pepsina (Tabela 8). Estes resultados confirmam a natureza protéica do inibidor produzido por *L. lactis* MK02R. Sua atividade manteve-se inalterada após o tratamento térmico de 60 minutos a 60°C ou 100°C, mas foi perdida após 15 minutos a 121°C (autoclavagem). A bacteriocina MK02R permaneceu ativa após a incubação em pH 2,0, 6,0 e 9,0 por duas horas e após o tratamento em solução com 1% SDS, 1% uréia, 1% EDTA e 6,5% NaCl.

Tabela 8: Caracterização inicial da substância antimicrobiana produzida por *L. lactis* MK02R

Tratamento	Atividade da bacteriocina MK02R	
	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	<i>L. sakei</i> ATCC 15521
Enzimas		
α-quimiotripsina	-	-
Protease	-	-
Proteinase K	-	-
Papaína	-	-
Pepsina	+	+
pH		
2,0	+	+
6,0	+	+
9,0	+	+
Temperatura		
60°C por 10 min	+	+
por 30 min	+	+
por 60 min	+	+
100°C por 10 min	+	+
por 30 min	+	+
por 60 min	-	+
121°C por 15 min	-	-
Compostos		
SDS 1%	+	+
Uréia 1%	+	+
EDTA 1%	+	+
NaCl 6,5 %	+	+

Kelly, Davey e Ward (1998), Ponce *et al.* (2008), e Uhlman *et al.* (1992) obtiveram resultados bastante semelhantes aos aqui relatados em relação à atividade residual dos compostos antimicrobianos produzidos por cepas de *L. lactis* isoladas de vegetais após o tratamento térmico e exposição à diversos valores de pH. Mitra, Chakrabartty e Biswas (2007), observaram que a bacteriocina produzida por *L. lactis* W8 permaneceu estável ao tratamento com diversos agentes surfactantes ou detergentes, tais como uréia, EDTA, SDS, entre outros, também em conformidade com os resultados apresentados neste trabalho.

A estabilidade das bacteriocinas é um importante fator para seu uso como conservante em alimentos (Mitra, Chakrabartty e Biswas, 2007; Simsek *et al.*, 2009). Considerando que o sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R apresentou-se estável em diferentes valores de pH, após o tratamento térmico e após à exposição à agentes detergentes e surfactantes, a bacteriocina produzida pelo isolado MK02R tem grande potencial de utilização como conservante natural.

4.2.1. Avaliação do espectro de atividade da bacteriocina produzida por *L. lactis* MK02R

A bacteriocina MK02R inibiu *Enterococcus faecium* LMA1, *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 com uma concentração final de 1600 UA/ml, mas foi mais eficaz contra *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, *Lactobacillus delbrueckii* e *L. monocytogenes* Scott A com atividade de 200 UA/ml (Tabela 9). A concentração de apenas 100 UA/ml foi suficiente para inibir *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. O sobrenadante não foi eficaz contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, ou contra as cepas Gram negativas como *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 35150, *Escherichia coli* O157:H7, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterobacter aerogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028. Os controles paralelos com nisina comercial Nisaplin® (25 mg/ml, Danisco A/S, Dinamarca) mostraram que a substância antimicrobiana produzida por *L. lactis* MK02R possui um espectro de ação bastante semelhante à nisina.

Tabela 9: Espectro de atividade do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R

Culturas	Atividade antimicrobiana (UA/ml)	
	Bacteriocina MK02R	Nisaplin®
Gram-positivas		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-	+
<i>Enterococcus faecium</i> LMA1 (a)	1600	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (a)	200	+
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	100	+
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 2a (c)	200	+
<i>Listeria innocua</i> (d)	1600	+
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	200	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	1600	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-
Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 7644	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	-	-

(a) Isolada de alimentos (b) Isolada de leite; (c) Isolada de linguiça frescal; (d) Isolada de carne de frango;
 TSBye: Caldo Trypticase de Soja (Difco) acrescido de 0,5% de extrato de levedura (Sigma); MRS: caldo MRS (Difco)

A atividade de bacteriocinas contra cepas relacionadas às cepas produtoras é uma das características principais destes antimicrobianos (Bastos, Coutinho e Coelho, 2010; Heng *et al.*, 2007), assim, não é surpresa que o antimicrobiano produzido por *L. lactis* MK02R tenha sido ativo contra as cepas de *Lactobacillus* testadas. A inibição de diferentes cepas de *L. monocytogenes* ressalta o potencial do uso desta bacteriocina em alimentos, considerando que este patógeno possui grande importância em se tratando de doenças transmitidas por alimentos.

4.2.2. Avaliação da inibição da multiplicação microbiana

Os resultados da multiplicação celular após a adição de 20% do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R às culturas frescas de *L. innocua*, *L. monocytogenes* e *L. sakei* ATCC 15521 estão apresentados nas Figuras 8, 9 e 10, observando-se que o antimicrobiano foi capaz de inibir a multiplicação de todos os microrganismos testados por até 14 horas.

Figura 8: Multiplicação de *Listeria innocua* a 37°C em caldo BHI com ou sem a adição de 20% do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R.

Figura 9: Multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A a 37°C em caldo BHI com ou sem a adição de 20% do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R.

Figura 10: Multiplicação de *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 a 30°C em caldo MRS com ou sem a adição de 20% do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R.

4.2.3. Avaliação da capacidade de causar lise celular

A adição do sobrenadante da cultura de *L. lactis* MK02R à cultura de *L. monocytogenes* Scott A contendo 10^8 - 10^9 UFC/ml resultou numa acentuada redução no número de células viáveis, que não foram mais detectadas após uma hora de contato, ou mesmo após mais 48 horas de incubação. No entanto, não houve alteração na quantidade de células das amostras controles (10^8 e 10^9 UFC/ml), sugerindo uma ação bactericida do antimicrobiano produzido por *L. lactis* MK02R. Resultados semelhantes foram obtidos com as bacteriocinas HA-6111-2 produzidas *P. acidilactici* e bacteriocina HA-5692-3, produzida por *E. faecium* (Albano *et al.*, 2007).

4.2.4. Avaliação da influência da temperatura e da presença de cisteína na produção da bacteriocina MK02R

As figuras 11, 12 e 13 apresentam a multiplicação de *L. lactis* MK02R e a produção da bacteriocina MK02R em caldo MRS contendo diferentes concentrações de cisteína por até 17 horas a 37°C, 30°C e 25°C, respectivamente.

Figura 11: Multiplicação de *L. lactis* MK02R (linhas) e produção da bacteriocina MK02R (barras) a 37°C em caldo MRS acrescido de 0,0%, 0,5% ou 1,0% de cisteína.

Figura 12: Multiplicação de *L. lactis* MK02R (linhas) e produção da bacteriocina MK02R (barras) a 30°C em caldo MRS acrescido de 0,0%, 0,5% ou 1,0% de cisteína.

Figura 13: Multiplicação de *L. lactis* MK02R (linhas) e produção da bacteriocina MK02R (barras) a 25°C em caldo MRS acrescido de 0,0%, 0,5% ou 1,0% de cisteína.

Verificou-se que, independente da concentração de cisteína no caldo MRS (Difco), a fase exponencial foi mais rapidamente atingida quando a cultura de *L. lactis* MK02R foi realizada a 37°C. Nesta temperatura, a fase exponencial foi atingida duas horas após o início do cultivo, enquanto que a 30°C foram necessárias três horas, e a 25°C, seis horas.

Quanto à produção de bacteriocina, verificou-se que a máxima concentração atingida foi de 600 UA/ml, obtida após 8h a 37°C e 30°C, e após 14 horas a 25°C. As curvas apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13 indicam que a produção da bacteriocina inicia-se aproximadamente na metade da fase exponencial de multiplicação de *L. lactis* MK02R, atingindo o máximo de produção no início da fase estacionária, independente da temperatura de incubação. Campos *et al.* (2006) relataram resultados semelhantes trabalhando com *L. lactis* subsp. *lactis* isolado do intestino de peixes, verificando ainda que a atividade antimicrobiana estava presente mesmo após 72 horas. Outros autores também relatam que a produção da bacteriocina está diretamente relacionada com a fase de multiplicação do microrganismo (Franz *et al.*, 1997; Ponce *et al.*, 2008; Tafreshi *et al.*, 2010). Geralmente a produção inicia-se na metade ou no final da fase exponencial de crescimento, podendo se estender durante a fase estacionária de multiplicação (Ponce *et al.*, 2008; Tafreshi *et al.*, 2010).

Conforme pode ser observado nas Figuras 11, 12 e 13, a presença de cisteína no caldo MRS nas concentrações de 0,5% ou 1,0% aumentou a produção da bacteriocina pela cepa *L. lactis* MK02R, de forma mais evidente quando a temperatura utilizada foi 37°C. Quando a incubação foi feita a 30°C ou a 25°C, esse efeito foi menor. No entanto, a presença de cisteína teve pouca influência na

multiplicação de *L. lactis* MK02R. A 25°C observou-se certo efeito negativo no período de 8 a 13 horas, que desapareceu em seguida. Apesar de interferir pouco na multiplicação da cepa, a cisteína influenciou a produção de bacteriocina, principalmente quando a incubação foi feita a 37°C. Sabe-se que fatores que alteram a taxa de multiplicação do microrganismo produtor da bacteriocina estarão diretamente relacionados com a produção do peptídeo (Gillor, Etzion e Riley, 2008; Liu *et al.*, 2010; Penna *et al.*, 2005).

Penna e Moraes (2002) testaram o efeito da adição de sacarose, asparagina, fosfato de potássio ou Tween ao meio MRS na produção de nisina e observaram que 5,0 g/l de sacarose com 29 g/l de asparagina resultaram em máxima produção de nisina na fase exponencial da multiplicação de *L. lactis*. A cisteína, utilizada nos experimentos como coadjuvante para potencializar a produção da nisina (Stoyanova *et al.*, 2006), apresentou um efeito positivo sobre a produção da bacteriocina MK02R quando concentrações de 0,5% ou 1,0% foram adicionadas ao MRS com incubação a 37°C. No entanto, quando a incubação foi feita a 25°C ou 30°C, este efeito potencializador não foi tão proeminente.

4.2.5. Adsorção da bacteriocina MK02R às células produtoras

Os resultados indicam que após o tratamento das células em pH 1,5 houve uma liberação de grande quantidade de bacteriocina adsorvida à membrana de *L. lactis* MK02R para o meio. Após a neutralização do pH da solução observou-se uma atividade antagônica de 200 UA/ml sobre *L. monocytogenes* Scott A. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também relataram pouca ou nenhuma adsorção de bacteriocinas às células produtoras em pH 1,5, como a

plantaricina ST31 (Todorov *et al.*, 1999), a pediocina ST18 (Todorov e Dicks, 2004), as bacteriocinas HA-6111-2 e HA-5692-3 (Albano *et al.*, 2007) e a bozaccina B14 (Ivanova *et al.*, 2000).

Cerca de 93 a 100% da bacteriocina sintetizada ficam aderidas à parede das células produtoras quando cultivadas em pH 6,0, porém essa adsorção cai para menos de 5% quando em pH 1,5 - 2,0 (Pongtharangku e Demirci, 2007; Yang, Johnson e Ray, 1992). O estudo da adsorção/dessorção de bacteriocinas à membrana celular das células produtoras é imprescindível no desenvolvimento de protocolos eficientes visando a máxima recuperação do peptídeo antimicrobiano para a purificação de grandes quantidades destes compostos (Pongtharangku e Demirci, 2007).

4.2.6. Determinação da presença do gene de nisina em *L. lactis* MK02R

Visto que o isolado MK02R foi identificado como *L. lactis* subsp. *lactis*, uma espécie freqüentemente produtora de nisina, e que o espectro de ação da bacteriocina MK02R apresentou-se similar ao da nisina comercial Nisaplin® (Danisco A/S, Dinamarca), testou-se a presença do gene responsável pela produção de nisina no DNA do isolado. O resultado da amplificação do DNA de *L. lactis* MK02R com os primers Nisf e Nisr está apresentado na Figura 14.

Figura 14: Produto de amplificação do DNA obtido através da PCR com os *primers* de expressão de nisina (Nisf e Nisr). Marcador de peso molecular (M) de 100 pb.

Quando o DNA de *L. lactis* MK02R foi amplificado com os primers Nisf e Nisr foi gerado um fragmento com peso molecular de 300 pb, indicando que *L. lactis* subsp. *lactis* MK02R possui determinantes genéticos associados à produção de uma variante da nisina (Kwaadsteneit *et al.*, 2008). Os primers Nisf e Nisr amplificam o gene de codificação da nisina Q, e diferem apenas por uma ou duas bases dos genes estruturais da nisina A, Z, U e F, o que permite a amplificação dos genes destas nisinas. Para a confirmação da nisina produzida por *L. lactis* MK02R a sequência dos aminoácidos da bacteriocina MK02R foi deduzida com base neste fragmento de 300 pb gerado após a amplificação do DNA utilizando os primers Nisf e Nisr. A sequência obtida foi comparada com as sequências das nisinas A, Z, Q e F, disponíveis no GenBank, conforme apresentado na Figura 15.

	-20		-10		1		10		20		30
	↓		↓		↓		↓		↓		↓
Nisina MK02R	MSTKDFN	DL	V	SV	RRRS	GASPRITSIS	LCTPGCKTGA	LMGCN	MKTAT	CNCS	VHVS
Nisina F	MSTKDFN	LDL	V	SV	SKKDS	GASPRITSIS	LCTPGCKTGA	LMGCN	MKTAT	CNCS	VHVS
Nisina Z	MSTKDFN	LDL	V	SV	SKKDS	GASPRITSIS	LCTPGCKTGA	LMGCN	MKTAT	CNCS	IHVS
Nisina A	MSTKDFN	LDL	V	SV	SKKDS	GASPRITSIS	LCTPGCKTCA	LMGCN	MKTAT	CNCS	IHVS
Nisina Q	MSTKDFN	LDL	V	SV	SKTDS	GASTRITSIS	LCTPGCKTGV	LMGCN	LKTAT	CNCS	VHVS

Figura 15: Sequência de aminoácidos da bacteriocina produzida por *L. lactis* MK02R deduzida por análise do DNA, comparada com as sequências das nisinas A, Z, F e Q. O peptídeo líder das variantes de nisina consiste de 13 aminoácidos (da posição -13 até a posição 1), seguida pelos aminoácidos que codificam o peptídeo maduro (da posição 1 até a posição 34). A diferença entre os aminoácidos da nisina produzida por *L. lactis* MK02R em relação às outras variantes de nisina estão sinalizadas com a cor vermelha.

A sequência de aminoácidos deduzida da nisina MK02R difere das demais nisinas nos aminoácidos das posições -12, -11, -8, -7, -6 e -5, correspondentes à sequência do peptídeo líder da nisina.

A sequência da nisina produzida por *L. lactis* MK02R apresentou semelhança à sequência gravada para o gene estrutural de codificação da nisina Z (número de acesso GenBank X61144), exceto pela presença de valina em vez de isoleucina na posição 30. Esta comparação também foi feita com a nisina Q (número de acesso GenBank AB100029), que também apresenta valina na posição 30. A cepa *L. lactis* MK02R difere da nisina Q pois possui alanina e não valina na posição 15, e metionina no lugar da leucina na posição 21 do peptídeo líder. No entanto, apresenta homologia à sequência da nisina F nas posições correspondentes à sequência do peptídeo maduro (posições 1 até 34).

É importante ressaltar que a aplicação de diferentes abordagens para a caracterização de uma bacteriocina é crítica. Muito frequentemente, os autores relatam a identificação de uma nova bacteriocina apenas com base na presença de genes de produção de bacteriocinas, sem avaliar se tais genes são expressos (Kwaadsteniet *et al.*, 2006; Kwaadsteniet, Ten Doeschate e Dicks, 2008). Albano *et al.* (2007) assinalaram a presença dos genes da pediocina PA-1 em duas cepas diferentes de *P. acidilactici*, porém, não apresentaram evidências efetivas da expressão destas bacteriocinas, assim que a expressão e produção destes antimicrobianos são apenas presumidas. A purificação da bacteriocina seguida pela espectrometria de massas e o sequenciamento de aminoácidos, mesmo que apenas parcial, são necessários para verificar se os genes das bacteriocinas estão sendo expressos (Zendo *et al.*, 2008).

4.2.7. Determinação dos aminoácidos da bacteriocina MK02R por espectrometria de massas após purificação por cromatografia de fase líquida (HPLC)

A Figura 16 apresenta os resultados da separação primária da bacteriocina por cromatografia de fase líquida (HPLC) e a Figura 17 o escaneamento por espectrometria de massas.

Figura 16: Perfil cromatográfico (HPLC) da amostra purificada da bacteriocina MK02R utilizando a coluna preparativa C₁₈ (2,2 × 150 mm, 3,5 μm, 60 poros, Nova-Pak, Waters C18).

Figura 17: Perfil da espectrometria de massas da bacteriocina MK02R (A) e da nisina Z (B). (A) Obtido utilizando Micromass (ZMD- Waters Corporation, Milford, MA,), com eluição em 30 minutos com gradiente linear de acetonitrila (CH₃CN) acidificado de 5% a 95% a uma vazão de 0,4 ml/min. (B) Obtido de Sun *et al.* (2009).

O sequenciamento parcial dos aminoácidos das amostras purificadas do antimicrobiano por espectrometria de massas demonstrou certa homologia com o sequenciamento deduzido do DNA amplificado com os *primers* Nisf e Nisr, reforçando principalmente a presença de uma valina na posição 30 e de alanina na posição 15. Os outros aminoácidos modificados deduzidos pelo sequenciamento do DNA, como a metionina na posição 21, não puderam ser confirmados pelo cromatograma.

Apesar da eficácia na caracterização parcial de nisina, o método de cromatografia líquida (HPLC) apresenta certa dificuldade na identificação exata do peptídeo, visto que as moléculas das nisininas A, Z, Q, U e F são bastante parecidas (Zendo *et al.*, 2008). No entanto, os resultados apresentados indicam que a cepa *L. lactis* subsp. *lactis* MK02R não só possui um determinante genético para a produção de nisina, como também é capaz de produzir e exportar a nisina para o meio extracelular.

A presença de aminoácidos modificados no peptídeo líder da nisina F produzida por *L. lactis* MK02R pode auxiliar em estudos futuros relacionados à regulação da expressão e na caracterização dos processos moleculares envolvidos na biosíntese desta bacteriocina. A função do peptídeo líder das bacteriocinas está relacionada com sua atividade biológica, já que é o peptídeo responsável por fornecer o sinal de reconhecimento para o gene ABC transportador. Se houver uma alteração na estrutura do peptídeo líder, o processo de reconhecimento fica comprometido e a bacteriocina não é exportada para o meio extracelular (Todorov, 2009).

Entretanto, os testes cromatográficos confirmaram a produção e os testes de antagonismo confirmaram a ação da nisina produzida por *L. lactis* MK02R. A alteração dos genes da nisina produzida por *L. lactis* MK02R é única, e pode servir para elucidar a influência da organização dos *operons* envolvidos na biosíntese da nisina.

4.3. Avaliação da sobrevivência de *L. lactis* MK02R, *L. sakei* 2a e do efeito do co-cultivo com *E. faecium* LMA1 no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1

As figuras 18, 19 e 20 apresentam os resultados da sobrevivência de *L. lactis* MK02R, *L. sakei* 2a e *E. faecium* LMA1, respectivamente, no modelo dinâmico TIM-1.

Figura 18: Viabilidade de *Lactococcus lactis* MK02R utilizando os Protocolos 1 e 2 (P1 e P2) durante o trânsito no modelo dinâmico TIM-1.

Figura 19: Viabilidade de *Lactobacillus sakei* 2a utilizando os Protocolos 1 e 2 (P1 e P2) durante o trânsito no modelo dinâmico TIM-1.

Figura 20: Viabilidade de *Enterococcus faecium* LMA1 utilizando os Protocolos 1 e 2 (P1 e P2) durante o trânsito no modelo dinâmico TIM-1.

Conforme apresentado na Figura 18, *L. lactis* MK02R resistiu bem à passagem pelo TIM-1, apresentando contagens de 7 log UFC/g nas amostras obtidas no Tempo 0, mantendo uma população de 6 log UFC/g desde a primeira

até a sexta hora de análise, sem diferenças significativas ($p>0,05$) nestas contagens. Da mesma maneira não foram detectadas diferenças significativas nas contagens obtidas nos experimentos em co-cultura com *E. faecium* LMA1 ou nas contagens obtidas utilizando os protocolos P1 e P2 ($p>0,05$).

Durante a passagem pelo modelo dinâmico TIM-1, houve uma redução significativa ($p<0,05$) na viabilidade de *L. sakei* 2a (Figura 19). No Tempo 0 as contagens de *L. sakei* 2a eram de 6 log UFC/g, porém na primeira hora estas contagens foram significativamente reduzidas para 2 log UFC/g ($p<0,05$). Em seguida a cepa apresentou uma recuperação gradual, atingindo contagens de 4 log UFC/g na sexta hora de análise.

Em contrapartida, *E. faecium* LMA1 (Figura 20), quando cultivado isoladamente, apresentou uma alta capacidade de persistir nas condições simuladas do trato gastrointestinal, atingindo populações de aproximadamente 8 log UFC/g desde o Tempo 0 até a sexta hora de análise, independente do protocolo utilizado ($p>0,05$).

L. lactis MK02R resistiu às condições de estresse a qual foi submetida durante a passagem no modelo TIM-1, estando em acordo com estudos que demonstraram um alto índice de sobrevivência de *L. lactis* no ambiente do TGI (Kang *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2008; Kimoto *et al.*, 2003; Bernbom *et al.*, 2006; Drouault *et al.*, 1999; Klijn, Weerkamp e De Vos, 1995). Kimoto *et al.* (2003) observaram que *Lactococcus lactis* N7 apresentou resistência a diferentes valores de pH e aos sais biliares em testes *in vitro*, e ainda demonstraram a capacidade de sobrevivência de *L. lactis* N7 no ambiente do trato gastrointestinal ao recuperar a cultura nas fezes de ratos após 12 (10^5 - 10^6 UFC/g), 24 (10^3 UFC/g) e 48 (10^2

UFC/g) horas após a administração do microrganismo via oral. Em outro estudo, Bernbom *et al.* (2006) observaram o efeito da administração de *Lactococcus lactis* CHCC5826, produtora de nisina A em comparação com *Lactococcus lactis* CHCH2862, não produtora de bacteriocinas, na composição da microbiota intestinal de ratos. Os autores concluíram que a administração de ambas as linhagens de *L. lactis* causaram um aumento no número de células de *Bifidobacterium* e uma redução no número de espécies de *Enterococcus*/*Streptococcus* no duodeno, íleo, ceco e cólon quando comparados com ratos controles, sem diferença significativa entre os resultados das cepas produtora ou não produtora de nisina. Drouault *et al.* (1999) também avaliaram a viabilidade de *L. lactis* no intestino de ratos e observaram um índice de 90-98% de sobrevivência no estômago, demonstrando a alta capacidade de adaptação do microrganismo ao estresse ácido. Entretanto, observaram que apenas 10-30% da população foi recuperada no duodeno e jejuno, indicando que a cepa apresenta uma baixa resistência à secreção biliar e ao suco pancreático.

Em contrapartida, *L. sakei* 2a apresentou uma baixa resistência à passagem pelo modelo dinâmico TIM-1 quando comparada com *L. lactis* MK02R. Park *et al.* (2008) descreveram índices de 50% de sobrevivência de *L. sakei* probio 65 ao suco gástrico e de 79% de sobrevivência do microrganismo na presença de sais biliares desconjugados em testes *in vitro*. Bonomo *et al.*, (2010) observaram uma redução de 80% na sobrevivência de *L. sakei* subsp. *sakei* submetida ao tratamento em condições de estresse ácido, observando que o menor valor de pH suportado pelo microrganismo é de 2,5.

E. faecium caracteriza-se como um microrganismo altamente adaptado ao ambiente do TGI (Weiss *et al.*, 2010). Além disso, a cepa de *E. faecium* LMA1 selecionada para este estudo é resistente ao antibiótico vancomicina, o que aumenta sua patogenicidade, considerando que cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina estão associadas a um alto índice de mortalidade (53%) decorrente de infecções em hospitais no Brasil (Pereira *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, o grupo Enterococci resistentes à vancomicina é o terceiro maior grupo de patógenos relacionado aos casos de bacteremia e infecção neonatal (Piper *et al.*, 2009).

O efeito protetor do leite sobre as células de BAL é bastante conhecido e já foi demonstrado também nas condições adversas do intestino (Kheadr *et al.*, 2010; Kimoto *et al.*, 2003). Este efeito protetor foi mais evidente nos experimentos feitos com *L. sakei* 2a, causando um aumento significativo ($p < 0,05$) da sobrevivência e permanência do microrganismo no ambiente simulado do TGI humano, que apresentou contagens entre 5 e 6 log UFC/g durante as seis horas de análise. No entanto, a sobrevivência de *L. lactis* MK02R e *E. faecium* LMA1 não foi significativamente ($p > 0,05$) afetada pela adição da matriz alimentar, visto que estes microrganismos apresentaram boa sobrevivência, mesmo sem a presença do leite.

Apesar da alta capacidade de sobrevivência demonstrada por *L. lactis* MK02R ao ambiente simulado do TGI, o microrganismo não foi capaz de causar a redução de *E. faecium* LMA1. Em contrapartida, *L. sakei* 2a, mesmo apresentando uma viabilidade reduzida, foi capaz de reduzir em 70% o número de células viáveis de *E. faecium* LMA1 quando estas culturas foram co-inoculadas. Recentemente, Carvalho *et al.* (2010) demonstraram que *L. sakei* 2a produz, além da sakacina,

outros dois peptídeos com atividade antimicrobiana contra *E. faecium*, enquanto que, como foi apresentado neste estudo, *L. lactis* MK02R produz apenas um antimicrobiano ativo contra esta cepa. Por outro lado, Bambirra *et al.* (2007) comprovaram que a atividade *in vivo* de *L. sakei* 2a contra a colonização intestinal por *L. monocytogenes* Scott A em ratos gnobióticos foi decorrente da competição por sítios de adesão, e não pela produção de bacteriocinas *in situ*.

As Figuras 21, 22 e 23 apresentam os valores das diferenças na população de *L. lactis* MK02R, *L. sakei* 2a e *E. faecium* LMA1, respectivamente, em relação ao inóculo inicial, durante a passagem no modelo TIM-1.

Figura 21: Flutuação das contagens da população de *L. lactis* MK02R em comparação com as amostras iniciais durante a passagem no modelo TIM-1.

Figura 22: Flutuação das contagens da população de *L. sakei* 2a em comparação com as amostras iniciais durante a passagem no modelo TIM-1.

Figura 23: Flutuação das contagens da população de *E. faecium* LMA1 em comparação com as amostras iniciais durante a passagem no modelo TIM-1.

Apesar do considerável potencial da aplicação dos probióticos na terapia ou na prevenção de doenças do TGI, é importante ressaltar que muitas cepas probióticas com alegação de benefícios à saúde não tiveram sua ação confirmada por evidências experimentais, sugerindo que a eficácia demonstrada por uma cultura específica não deve ser transferida à espécie (Wohlgemuth, Loh e Blaut, 2010).

4.3.1. Avaliação da produção de bacteriocinas por *L. lactis* MK02R e *L. sakei* 2a no modelo dinâmico do trato gastrointestinal TIM-1

Neste estudo, não foi observada a atividade residual de bacteriocinas produzidas por *L. lactis* MK02R ou *L. sakei* 2a após a passagem dos microrganismos pelo modelo dinâmico TIM-1. Poucas pesquisas descrevem o comportamento das bacteriocinas em ambientes do trato gastrointestinal. Bernbom

et al. (2006) observaram que a administração de nisina A não causou qualquer alteração na composição da microbiota de ratos após a ingestão oral do peptídeo antimicrobiano purificado. Entretanto, Kheadr *et al.* (2010) relataram atividade antimicrobiana de pediocina produzida por *Pediococcus acidilactici* UL5 recuperada do compartimento do estômago, do duodeno, do jejuno e do íleo em ensaios realizados no TIM-1. Reunanen e Saris (2009) avaliaram a degradação da nisina (6,75 µg/g) no TGI de cachorros, observando que no jejuno houve uma recuperação de 66% de nisina 30 minutos após a ingestão do antimicrobiano. No entanto, após uma hora de exposição neste ambiente, apenas 17,5% da concentração inicial da nisina foi recuperada. A nisina, assim como outras bacteriocinas produzidas por BAL, são degradadas pela enzima pancreática α -quimiotripsina presente no ambiente do TGI. Segundo Gálvez *et al.* (2010), além do impacto sobre a atividade das bacteriocinas, as enzimas digestivas podem interferir na produção destes antimicrobianos, de uma maneira cepa-dependente.

Se por um lado as bacteriocinas não agem de maneira efetiva no ambiente intestinal, por outro, não possuem efeito adverso ao organismo quando administrados em soluções puras, ou quando produzidos *in situ*, a partir de culturas instaladas na microbiota intestinal (Bernbom *et al.*, 2006; Reunanen e Saris, 2009; Ross *et al.*, 2010).

A compreensão de como as células produtoras de bacteriocinas sobrevivem no ambiente do TGI pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para uma melhor aplicação destas culturas tanto em nível industrial, como em nível terapêutico (Ross *et al.*, 2010; Simsek *et al.*, 2009). A produção desses metabólitos antimicrobianos é geralmente demonstrada em estudos *in vitro*, porém ainda não

está claro se estes peptídeos antimicrobianos são produzidos ou se possuem alguma atividade *in vivo*. Os resultados obtidos neste estudo concordam com outros apresentados na literatura, demonstrando que o antagonismo de bacteriocinas contra células sensíveis nos testes *in vitro* não são geralmente os mesmos aos apresentados no ambiente do trato gastrointestinal (Bambirra *et al.*, 2007; Simsek *et al.*, 2009).

No que diz respeito a aplicações terapêuticas, os agentes antimicrobianos produzidos por BAL utilizadas como culturas probióticas podem desempenhar um papel importante nas interações *in vivo* durante sua passagem pelo trato gastrointestinal humano, contribuindo assim para a saúde do intestino. No entanto, mais estudos são necessários para desvendar o papel preciso das bacteriocinas produzidas por BAL neste processo (De Vuyst e Leroy 2007; Ross *et al.*, 2010).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- (A) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R isolado de rúcula produz a nisina F, com atividade inibitória contra *E. faecium* LMA1, *L. sakei* ATCC 15521, *L. sakei* 2a, e microrganismos de importância alimentar, tal como *L. innocua* e *L. monocytogenes*, apresentando um alto potencial de aplicação para a conservação de alimentos;
- (B) A nisina F produzida por *L. lactis* MK02R apresentou alta estabilidade térmica, resistência ao pH ácido ou básico e à compostos surfactantes e detergentes, aumentando sua potencialidade de aplicação em alimentos;
- (C) *L. lactis* MK02R apresentou uma boa capacidade de sobreviver nas condições de estresse do ambiente simulado do trato gastrointestinal humano, apresentando um grande potencial de utilização como cultura probiótica;
- (D) *L. sakei* 2a apresentou baixa resistência às condições simuladas do TGI, no entanto, inibiu *E. faecium* LMA1, apresentando potencial para estudos futuros como uma cultura potencialmente probiótica.

(E) Não foi detectada atividade residual de bacteriocinas após os ensaios no modelo dinâmico TIM-1, assim que não se pode inferir se houve a produção destes compostos no ambiente do TGI, ou ainda se estariam relacionados com a ação das BAL na redução *E. faecium* LMA1, de forma que testes mais sensíveis são necessários para validar esta hipótese.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNAN, A.F.M., TAN, I.K.P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian food and assessment for the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, v. 98 (7), p. 1380-1385, 2007.

ALBANO, H., TODOROV, S.D., VAN REENEN C.A., HOGG, T., DICKS L.M.T., TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116 (2), p. 239-47, 2007.

AMOR, K.B., VAUGHAN, E.E., DeVOS, W.M. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. **The Journal of Nutrition**, v. 137 (3), p. 741S-747S, 2007.

AXELSSON, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology *In* S. Salminen, A. Von Wright. **New York**: Marcel Dekker, Inc. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, p. 01-72, 1998.

BAMBIRRA, F.H.S., LIMA, K.G.C., FRANCO, B.D.G.M., CARA, D.C., NARDI, R.M.D., BARBOSA, F.H.F., NICOLI, J.R. Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria Monocytogenes* in gnotobiotic mice. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45 (6), p. 663-667, 2007.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BASTOS, M. C.F, COUTINHO, B.G., COELHO, M.L.V.; Lysostaphin: A Staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. **Pharmaceuticals**, v. 3 (4), p. 1139-1161, 2010.

BERNBOM, N., RASK LICHT, T., BROGREN, C-H., JELLE, B., JOHANSEN, A.H., BADIOLA, I., VOGENSEN, F.K., NØRRUNG, B. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72 (1), p. 239-244, 2006.

BLANQUET, S., ZEJDNER, E., BEYSSAC, E., MEUNIER, J-P., DENIS, S., HAVENAAR, R., ALRIC, M., A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. **Pharmaceutical Research**, v. 21 (4), p. 585-591, 2004.

BONOMO, M.G., SICO, M.A., GRIECO, S., SALZANO, G. Fluorescent differential display analysis of *Lactobacillus sakei* strains under stress conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82 (1), p. 28-35, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Resolução RDC nº 2, de 7 de Janeiro de 2002, Anexo 2, item 2.1.3. Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional ou de saúde. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm> Acesso em: 19/07/2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Resolução RDC nº 2, de 7 de Janeiro de 2002, Anexo 4. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas

e Probióticos. Disponível em: <www.anvisa.gov.br_alimentos_comissoes_tecno_lista_alega.pdf>
 Atualizada em: Julho de 2008. Acesso em: 19/07/2010.

BRAVO, D., RODRÍGUEZ, E., MEDINA, M. Nisin and lacticin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92 (10), p. 4805-481, 2009.

CAMPOS, A., RODRIGUEZ, O., CALO-MATA, P., PRADO, M., BARROS-VELÁSQUEZ J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v. 39 (3), p. 356-364, 2006.

CARR, F.J., CHILL, D., MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28 (4), p. 281-370, 2002.

CARVALHO, K.G., BAMBIRRA, F.H.S., KRUGER, M.F., BARBOSA, M.S., OLIVEIRA, J.S., SANTOS, A.M.C., NICOLI, J.R., BEMQUERER, M.P., MIRANDA, A., SALVUCCI, E.J., SESMA, F.J.M., FRANCO, B.D.G.M. Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37 (4), p. 381-390, 2010.

CHANG, J.-H., SHIM, Y.Y., CHA, S.-K., CHEE, K.M. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109 (1), p. 220-230, 2010.

COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3 (10), p. 777-788, 2005.

CULLIGAN, E.P., HILL, C.S., ROY, D. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. **Gut pathogens**, v. 1, p. 19, 2009.

DALIÉ, D.K.D., DESCHAMPS, A.M., RICHARD-FORGET, F., Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21 (4), p. 370-380, 2010.

DE JONG, A., VAN HIJUM, S., BIJLSMA, J.J.E., KOK, J., KUIPERS, O.P. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W273-W279, 2006.

DE VUYST, L., LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. **Journal of Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 13 (4), p. 194-199, 2007.

DEEGAN, L.H., COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16 (9), p. 1058-1071, 2006.

DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14 (4), p. 273-285, 2004.

DRIDER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., MCMULLEN, L.M., PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 70 (2), p. 564-582, 2006.

DROUAULT, S., CORTHIER, G., EHRLICH, S.D., RENAULT, P. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65 (11), p. 4881-4886, 1999.

DUNNE, C., O'MAHONY, L., MURPHY, L., THORNTON, G., MORRISSEY, D., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., FLYNN, S., FITZGERALD, G., DALY, C., KIELY, B., O'SULLIVAN, G.C., SHANAHAN F., COLLINS, K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73 (2), p. 386S-392S, 2001.

EGERT, M., DE GRAAF, A.A., SMIDT, H., DE VOS, W.M., VENEMA, K. Beyond diversity: Functional microbiomics of the human colon. **Trends in Microbiology**, v. 14 (2), p. 86-91, 2006.

EIJSINK, V.G.H., AXELSSON, L., DIEP, D.B., VARSTEIN, L.S., HOLO, H., NES, A.I.F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria: An example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek: International Journal of Genenetics Molecular Biology**, v. 81 (4), p. 639-654, 2002.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. (www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf), 2001.

FELIS, G.E., DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 8 (2), p. 44-61, 2007.

FRANZ, C.M., Du TOIT, M., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W.H. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. **Journal of Basic Microbiology**, v. 37 (3), p. 187-196, 1997.

FRIZZO, L.S., BERTOZZI, E., SOTO, L.P., SEQUEIRA, G.J., ARMESTO, R.R., ROSMINI, M.R. Studies on translocation, acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf rearing. **Livestock Science**, v. 128 (1-3), p. 28-35, 2010.

FUJIWARA, S., SETO, Y., KIMURA A., HASHIBA, H. Establishment of orally-administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90 (1), p. 43-52, 2001.

FUKAO, M., OBITA, T., YONEYAMA, F., KOHDA, D., ZENDO, T., NAKAYAMA, J., SONOMOTO, K. Complete covalent structure of nisin Q, new natural variant, containing post-translational modified amino acids. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 72 (7), p. 1750-1755, 2008.

GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21 (2), p. 142-148, 2010.

GHALFI, H., BENKERROUM, N., ONGENA, M., BENSALD, M., THONART, P.
Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth.
Food Research International, v. 43 (1), p. 33-39, 2010.

GILLOR, O., ETZION, A., RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81 (4), p. 591-606, 2008.

GOLOD, N.A., LOIKO, N.G., MULYUKIN, A.L., NEIYMATOV, A.L., VOROBJEVA, L.I., SUZINA, N.E., SHANENKO, E.F., GAL'CHENKO, V.F., EL-REGISTAN, G.I.
Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions.
Microbiology, v. 78 (3), p. 280-289, 2009.

GÓRSKA, S., GRYCKO, P., RYBKA, J., GAMIAN, A. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure and biosynthesis. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 14 (61), p. 805-818, 2007.

GRONBACH, K., EBERLE, U., MÜLLER, M., OLSCHLÄGER, T.A., DOBRINDT, U., LEITHÄUSER, F., NIESS, J.H., DÖRING, G., REIMANN, J., AUTENRIETH, I.B., FRICK, J.S. Safety of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 depends on intestinal microbiota and adaptive immunity of the host. **Infection and Immunology**, v. 78 (7), p. 3036-3046, 2010.

GROSS, E., MORELL, J.L. The structure of nisin. **Journal of American Chemistry Society**, v. 93 (18), p. 4634-4635, 1971.

GUEIMONDE, M., SALMINEN, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 38 (Suppl. 2), p. S242-S247, 2006.

GUTIÉRREZ, J., CRIADO, R., CITTI, R., MARTIN, M., HERRANZ, C., NES, I.F., CINTAS, L.M., HERNÁNDEZ, P.E. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103 (3), p. 239-250, 2005.

HAMMOU, F.B., SKALI, S.N., IDAOMAR, M., ABRINI, J. Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. **African Journal of Biotechnology**, v. 9 (8), p. 1190-1195, 2010.

HENG, N.C.K., TAGG, J.R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4 (2), 160, 2006.

HENG, N.C.K., WESCOMBE P.A., BURTON J.P., JACK R.W., TAGG, J.R. The diversity of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. In: **Riley MA, Chavan M (eds)**, New York: Springer Inc. Evolution and ecology of bacteriocins, p. 45-92, 2007.

HOBEN, H.J., SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* ssp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44 (5), p. 1246-1247, 1982.

HÖRMANNSPERGER, G., HALLER, D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immunesystem: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300 (1), p. 63-73, 2010.

IVANOVA, I., KABADJOVA, P., PANTEV, A., DANOVA, S., DOUSSET, X. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* b14 isolated from Boza-Bulgarian traditional cereal beverage. **Biocatalysis**, v. 41 (6), p. 47-53, 2000.

JAYARAO, B.M., OLIVER, S.P., TAGG, J.R., MATTHEUS, K.R. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions. **Epidemiology and Infection**, v. 107 (3), p. 543-555, 1991.

JUSTÉ, A., THOMMA, B.P.H.J., LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v. 25 (6), p. 745-761, 2008.

KANG, P., TOMS, D., YIN, Y., CHEUNG, Q., GONG, J., LANGE, K.D., LI, J. Epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* enhances intestinal development of early-weaned pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 140 (4), p. 806-811, 2010.

KELLY, W., DAVEY, G., WARD, L. Characterization of Lactococci isolated from minimally processed fresh and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45 (2), p. 85-92, 1998.

KHEADR, E., ZIHLER, A., DABOUR, N., LACROIX, C., LE BLAY, G., FLISS, I.
Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic in vitro model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109 (1), 54-64, 2010.

KIM, H.J., CAMILLERI, M., McKINZIE, S., LEMPKE, M.B., BURTON, D.D., THOMFORDE, G.M., ZINSMEISTER, A.R. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 17 (7), 895-904, 2003.

KIMOTO, H., NOMURA, M. KOBAYASHI, M., MIZUMACHI, K., OKAMOTO, T.
Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49 (11), p. 707-711, 2003.

KIMOTO-NIRA, H., KOBAYASHI, M., NOMURA, M., OKAMOTO, T., FUJITA, Y.
Factors for bile tolerance in *Lactococcus lactis*: Analysis by using plasmid variants. **Folia Microbiologica**, v. 54 (5), p. 395-400, 2009.

KLAENHAMMER, T.R., BARRANGOU, R., BUCK, B.L., AZCARATE-PERIL, M.A., ALTERMANN E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29 (3), p. 393-409, 2005.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12 (1), p. 39-86, 1993.

KLIJN, N., WEERKAMP, A.H., DE VOS, W.M. Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61 (7), p. 2771-2774, 1995.

KUCEROVÁ, K., CHUMCHALOVÁ, J., MÍKOVÁ, K., CUPÁKOVÁ, S., KARPÍSKOVÁ, R., LINDA, H. Screening of lactic acid bacteria for antimicrobial properties from mayonnaise-based products and raw materials. **European Food Research Technology**, v. 226 (1-2), p. 265-272, 2007.

KWAADSTENIET, M., FRASER, T., REENEN, C.A., DICKS, L.M.T. Bacteriocin T8, a novel class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72 (7), p. 4761-4766, 2006.

KWAADSTENIET, M., TEN DOESCHATE, K., DICKS, L.M.T. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74 (2), p. 547-549, 2008.

LARSSON, M., MINEKUS, M., HAVENAAR, R.. Estimation of the bioavailability of iron and phosphorus in cereals using a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74 (1), p. 99-106, 1997.

LEWUS, C.B., MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13 (2), p.145-150, 1991.

LIU, L.S., JIN, T., COFFIN, D.R., LIU, C.-K., HICKS, K.B. Poly(lactic acid) membranes containing bacteriocins and EDTA for inhibition of the surface growth of gram-negative bacteria. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117 (1), p. 486-492, 2010.

LUBELSKI J., RINK, R., KHUSAINOV, R., MOLL, G.N., KUIPERS, O.P. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 65 (3), p. 455-476, 2008.

MARAGKOUidakis, P.A., MOUNTZOURIS, K.C., PSYRRAS, D., CREMONESE, S., FISCHER, J., CANTOR, M.D., TSAKALIDOU, E. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130 (3), p. 219-226, 2009.

MARAGKOUidakis, P.A., ZOUMPOPOULOU, G., MIARIS, C., KALANTZOPOULOS, G., POT, B., TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal** v. 16 (3), p. 189-199, 2006.

MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAR, R., HUIS IN'T VELD, J.H.J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal of Dairy Science**, v. 80 (6), p. 1031-1037, 1997.

MARTINS, A.D.O., MENDONÇA, R.C.S., SILVA, D.L., RAMOS, M.S., MARTINS, M.C., DONZELE, J.L., ANDRADE, N.J. Resistência de bactérias lácticas,

isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 5 (1), p. 53-59, 2006.

McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Review**, v. 25 (3), p, 285-308, 2001.

MILLER, P., CHUMCHALOVA, J., McMULLEN, L.M. Nisin-producing *Lactococcus* spp. from mayonnaise-based products and their raw materials. **European Food Research and Technology**, v. 231 (1), p. 137–141, 2010.

MILLETE, M., DUPONT, C., ARCHAMBAULT, D., LACROIX, M. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102 (1), p. 274-282, 2007.

MINEKUS, M.P., MARTEAU, P., HAVENAAR, R., HUIS IN'T VELD, J.H.J. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. **Alternative Laboratory Animal Journal**, v. 23, p. 197-209, 1995.

MITRA, S., CHAKRABARTTY, P.K., BISWAS, S.R. Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8, a nisin producer strain. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43 (2), p. 337-342, 2010.

MITRA, S., CHAKRABARTTY, P.K., BISWAS, S.R. Production of nisin Z by *Lactococcus lactis* isolated from dahi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 143 (1), p. 41-53, 2007.

MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50 (5), p. 511-519, 1998.

MOREIRA, J.L.S., MOTA, R.M., HORTA, M.F., TEIXEIRA, S.M.R., NEUMANN, E., NICOLI, J.R., NUNES, A.C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**, v. 5, p. 15, 2005.

MORELLI, L. Review: In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**, v. 17 (11), p. 1278-1283, 2007.

MOUSSAVI, M., ADAMS, M.C. An in vitro study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations. **Current Microbiology**, v. 60 (5), p. 327-335, 2010.

MULDERS, J.W., BOERRIGTER, I.J., ROLLEMA, H.S., SIEZEN, R.J., DE VOS, W.M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **European Journal of Biochemistry**, v. 201 (3), p. 581-584, 1991.

NES, I.F., YOON, S-S., DIEP, D.B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16 (5), p. 675-690, 2007.

O`FLAHERTY, S., KLAENHAMMER, T.R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut / host. **International Dairy Journal**, v. 20 (4), p. 262-268, 2010.

OELSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300 (1), p. 57–62, 2010.

OLASUPO, N.A., SCHILLINGER, U., NARBAD, A., DODD, H., HOLZAPFEL, W.H. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from Wara, a traditional Nigerian cheese product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53 (2-3), 141-152, 1999.

OSCÁRIZ, J.C.; CINTAS, L.; HOLO, H.; LASA, I.; NES, I.F.; PISABARRO, A.G. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254 (1), p. 108-115, 2006.

PARK, C.W., YOUN, M., JUNG, Y.-M., KIM, H., JEONG, Y., LEE, H.-K., KIM, H.O., LEE, I., LEE, S.W., KANG, K.H., PARK, Y.-H. New functional probiotic *Lactobacillus sakei* Probio 65 alleviates atopic symptoms in the mouse. **Journal of Medicinal Food**, v. 11 (3), p. 405-412, 2008.

PARK, S.H.; ITOH, K.; FUJISAWA, T.; Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95 (2), p. 294-300, 2003.

PENNA, T.C., MORAES, D.A. Optimization Of Nisin Production By *Lactococcus lactis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100 (1-9), p. 775-789, 2002.

PENNA, T.C.V., JOZALA, A.F., NOVAES, L.C.L., PESSOA, A.J., CHOLEWA, O. Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 122 (1-3), p. 619-637, 2005.

PEREIRA, G.H. MÜLLER, P.R., ZANELLA, R.C., LIMA, M.J.C., TORCHIO, D.S., LEVIN, A.S. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital: The lack of effect of measures directed mainly by surveillance cultures and differences in response between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **American Journal of Infection Control**, v. 38 (5), p. 406-409, 2010.

PIPER C., COTTER P.D., ROSS R.P., HILL, C. Discovery of medically significant lantibiotics. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 6 (1), p. 1-18, 2009.

PONCE, A.G., MOREIRA, M.R., DEL VALLE, C.E., ROURA, S.I. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41 (3), p. 432-441, 2008.

PONGTHARANGKU, T., DEMIRCI, A. Online recovery of nisin during fermentation and its effect on nisin production in biofilm reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74 (3), p. 555-562, 2007.

PRANOTO, Y., RAKSHIT, S.K., SALOKHE, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38 (8), p. 859-865, 2005.

RANADHEERA, R.D.C.S., BAINES, S.K., ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43 (1), p. 1-7, 2010.

RAVULA, R.R., SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. **Biotechnology Techniques**, v. 12 (11), p. 819-822, 1998.

REUNANEN, J., SARIS, P.E.J. Survival of nisin activity in intestinal environment. **Biotechnology letters**, v. 31 (8), p. 1229-1232, 2009.

RICHARD C., CANON, K., NAGHMOUCHI K., BERTRAND D., PRÉVOST H., DRIDER D. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. **Food Microbiology**, v. 23 (2), p. 175-183, 2006.

RODGERS, S. Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19 (4), p. 188-197, 2008.

RODRÍGUEZ, J.M., MARTÍNEZ, M.I., HORN, N., DODD, H.M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80 (2), p. 101-116, 2003.

RODRÍGUEZ, N., SALGADO, J.M., CORTÉS, S., DOMINGUÉZ, J.M. Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures produced under different pH conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51 (2), p. 226-233, 2010.

ROSA, C.M., FRANCO, B.D.G.M., MONTVILLE, T.J., CHIKINDAS, M. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolated, *Lactobacillus sake* 2a. **Journal of Food Safety**, v. 22 (1), p. 39-54, 2002.

ROSS, R.P., MILLS, S., HILL, C., FITZGERALD, G.F., STANTON, C. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. **International Dairy Journal**, v. 20 (4), p. 269-276, 2010.

ROY, K., MEYRAND, M., CORTHIER, G., MONNET, V., MISTOU, M.-Y. Proteomic investigation of the adaptation of *Lactococcus lactis* to the mouse digestive tract. **Proteomics**, v. 8 (8), p. 1661-1676, 2008.

SAGUIR, F.M., CAMPOS, I.E.L., MATURANO, C., NADRA, M.C.M. Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assessment of its biochemical activities relevant to flavor development in wine. **International Journal of Wine Research**, v. 1, p. 175-185, 2009.

SAKAR, S. Approaches for enhancing the viability of probiotics: a review. **British Food Journal**, v. 112 (4), p. 329-349, 2010.

SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (3rd edn), **New York**: Marcel Dekker, 633 p., 2004.

SAMELIS, J., BEDIE, G.K., SOFOS, J.N., BELK, K.E., SCANGA, J.A., SMITH, G.C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38 (1), p. 21-28, 2005.

SANDERS, M.E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46 (Suppl. 2), S58-S151, 2008.

SANG, Y., BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. **Animal Health Research Review**, v. 9 (2), p. 227-35, 2008.

SATHE, S.J., NAWANI, N.N., DHAKEPHALKAR, P.K., KAPADNIS, B.P. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103 (6), p. 2622-2628, 2007.

SAVADOGO, A., OUATTARA, C.A.T., BASSOLE, I.H.N., TRAORE, S.A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v. 5 (9), p. 678-683, 2006.

SETTANNI, L., CORSETTI, A.; Application of bacteriocin in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121 (2), p. 123-138, 2008.

SIMSEK, O.; BUZRUL, S.; AKKOÇ, N.; ALPAS, H.; AKÇELİK, M.; Stress response kinetics of two nisin producer strains *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158 (2), p. 387-397, 2009.

SLEATOR, R.D. Probiotic therapy - recruiting old friends to fight new foes. **Gut pathogens**, v. 2 (5), p. 1-5, 2010.

SLEATOR, R.D., WATSON, D., HILL, C., GAHAN, C.G.M. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. **Microbiology**, v. 155 (5), p. 2463-2475, 2009.

SOLIMAN, L.C., DONKOR, K.K.; Method development for sensitive determination of nisin in food products by micellar electrokinetic chromatography. **Food Chemistry**, v. 119, 802-805, 2010.

STOYANOVA, L.G., SUL'TIMOVA, T.D., BOTINA, S.G., NETRUSOV, A.I. Isolation and identification of new nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from milk. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42(5), 492-499, 2006.

SUN, Z., ZHONG, J., LIANG, X., LIU, J., CHEN, X., HUAN. L. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53 (5), p. 1964-1973, 2009.

TAFRESHI, S.H., MIRDAMADI, S., NOROUZIAN, D., KHATAMI, S., SARDARI, S. Effect of non-nutritional factors on nisin production. *Journal of Biotechnology*, v. 9 (9), p. 1382-1391, 2010.

THOMAS, L.V., CLARKSON, M.R., DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: NAIDU, A.S., (eds). Natural Food Antimicrobial Systems. **California: CRC Press**, 2000. pg. 463-524.

TODOROV, S., ONNO, B., SOROKINE, O., CHOBERT, J.M., IVANOVA, I., DOUSSET, X. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48 (3), p. 167-177, 1999.

TODOROV, S.D., DICKS, L.M.T. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. **Folia Microbiologica**, v. 49 (4), p. 406-410, 2004.

TODOROV, S.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-k to *Listeria* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39 (1), p. 178-187, 2008.

TRIAS, R., BAÑERAS, L., MONTESINOS, E., BADOSA, E. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. **International Microbiology**, v. 11 (4), p. 231-236, 2008.

UHLMAN, L., SCHILLINGER, U., RUPNOW, J.R., HOLZAPFEL, W.H. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16 (2), p. 141-151, 1992.

VERWEI, M., FREIDIG, A. P., HAVENAAR, R., GROTEN, J. P. Predicted serum folate concentrations based on in vitro studies and kinetic modeling are consistent with measured folate concentrations in humans. **Journal of Nutrition**, v. 136 (12), p. 3074-3078, 2006.

WEISS, A., DOMIG, K.J., KNEIFEL, W., MAYER, H.K. Evaluation of PCR-based typing methods for the identification of probiotic *Enterococcus faecium* strains from animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158 (3-4), p. 187-196, 2010.

WILSON-STANFORD, S., KALLI, A., HÅKANSSON, K., KASTRANTAS, J., ORUGUNTY, R.S., SMITH, L. Oxidation of lanthionines renders the lantibiotic nisin inactive. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75 (5), p. 1381-1387, 2009.

WIRAWAN, R.E., KLESSE, N.A., JACK, R.W., TAGG, J.R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72 (2), p. 1148-1156, 2006.

WOHLGEMUTH, S., LOH, G., BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300 (1), p. 03-10, 2010.

YANG, R., JOHNSON, M.C., RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58 (10), p. 3355-3359, 1992.

ZENDO, T., FUKAO, M., UEDA, K., HIGUCHI, T., NAKAYAMA, J., SONOMOTO, K. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67 (7), p. 1616-1619, 2003.

ZENDO, T., NAKAYAMA, J., FUJITA, K., SONOMOTO, K. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104 (2), p. 499-507, 2008.

ANEXO 1

Anotação do sequenciamento genético do 16-23s DNAr de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R

H05 well H05 Placa22_281107 Run01 Cimarron 3.12 579

GACACTGNTGCTAATACTGCACGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACG
GGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATTTGAAACGAATGCTAATACCGCATA
AAAACTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAG
CTAGTTTGGTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCT
GACCGAGCAACGCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGGTAGAGAAGAAGCTTG
GTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAC
GTCTGGTGTAAGGAGCAGTGGGCTACAACCATTTGTATGCATTGGAAACTGGGTTACAGACTTGGACGTGCC
ACGGGAAGCAGAGNAGAAAGTGGGGAAAAATTTTCCCACTGGGTTGGTTAGCCGGGGGTGCACATTGG
CCGTTTAGCATTCACTNNAGCACGAGGAAACCAACAGGGGTTGGCGGAAGCGAGGCGTCTATCC
TTGGGAGGCCCTATGTAACTTAGACGCCANTGAAGGGCTCNAACAGCNGGTTGGGGGGANCGCAAN
AAAGCAGGGAGTTAAGAAATAC

>H06 well H06 Placa22_281107 Run01 Cimarron 3.12 876

GTAAGTAGAGCGCTCTTNTTTGTTAGGCAACCTACTTCGGGTACTCCCAACTCTCCGGTGGTGTGACGGG
CGGTGTGTACAAGGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTT
CATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGTGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACATCACTGTCTC
GCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGG
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAT
CCCGTGTCCCGAAGGAACTTCCTATCTCTAGGAATAGCACGAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG
TTGCTTCGAATTAACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCG
GTCGTAAGTCCCGAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGATACAGAGAACTTATAGCTCCCTACATCTAGC
ACTCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCCTCAGTGT
CAGTTACAGGCCCAGGAGAGCGCTTTCGCCACCGGTGTTCTCCAGTATATTCTACGGCAGTTTACCGG
TACCATGGAATTCACCTCTCCTCTCCTGGACCTCAAGNCTACCCAGGTTCCATGGCTTACAATGGTTGAGCC
CACTGCCTTTTTTACCGGATTTATTAACCAACCTGGGGTTCGTTTTAGCCCCAATAAATCCGGGCGAAGGTC
TGGGACTCACGTTTCGGGTGTGGNACGGTTAATTTTGGCCGGCCCTTCTCGGGGTGGGTAACCGGCC
NTTTGTANAGGTTTCTCCTCTTCAACCAAGGTTTTCTTTTCCACCAGAGTTTACTCAGACGCTTTTTTCTCC
ACNGGGGAGAGCGGAAATTTATTGNGNAACCATCTGTGNCCCNATGGGGGGTGACACAGGGCGCCCC
ACAGGGTGNGCTCGGNTCCCAACATCAAGCGATGNGGTACG

ANEXO 2

Representação dos aminoácidos em código, abreviação, bem como seu códon genético

Código	Abreviação	Aminoácido	Trios de bases (códon) no DNA
A	Ala	Alanina	gct, gcc, gca, gcg
C	Cys	Cisteína	tgt, tgc
D	Asp	Ácido Aspártico	gat, gac
E	Glu	Ácido Glutâmico	gaa, gag
F	Phe	Fenilalanina	ttt, ttc
G	Gly	Glicina	ggg, ggc, gga, ggt
H	His	Histidina	cat, cac
I	Ile	Isoleucina	att, atc, ata
K	Lys	Lisina	aaa, aag
L	Leu	Leucina	tta, ttg, ctt, ctg, cta, ctg
M	Met	Metionina	atg
N	Asn	Asparagina	aat, aac
P	Pro	Prolina	cct, ccc, cca, ccg
Q	Gln	Glutamina	caa, cag
R	Arg	Arginina	cgt, cgc, cga, cgg, aga, agg
S	Ser	Serina	tct, tcc, tca, tcg, agt, agc
T	Thr	Treonina	act, acc, aca, acg
V	Val	Valina	gtt, gtc, gta, gtg
W	Trp	Triptofano	tgg
Y	Tyr	Tirosina	tat, tac