



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Daniela Sofia Pinto Morgado Loureiro

Estudos da bacteriocina produzida
por *Lactobacillus plantarum* B391 para potencial utilização na
Indústria

Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professor Doutor Paulo Fernandes

e co-orientação de

Professora Doutora Joana Santos

Novembro, 2015

RESUMO

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse por parte dos consumidores, por alimentos mais seguros e naturais, compostos por produtos de alta qualidade nutricional e organoleticamente, sem aditivos químicos, minimamente processados e com amplo tempo de prateleira. Deste modo, existe a necessidade de desenvolver alternativas de conservação cada vez melhores, para que aliadas às tecnologias existentes seja possível disponibilizar à população alimentos de alta qualidade e mais seguros sob o ponto de vista da segurança alimentar. A utilização de bacteriocinas enquanto agentes naturais, que auxiliam na promoção da segurança alimentar nomeadamente, através da inibição do crescimento de microrganismos patogénicos, tem sido refletida em muitos e diversos trabalhos.

Neste estudo foram empregues metodologias para a caracterização da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 com vista à sua potencial utilização na indústria alimentar como bioconservante. Estas metodologias envolveram estudos da influência da temperatura na capacidade de produção da bacteriocina; da estabilidade térmica e da influência do pH, quer na atividade quer na resistência da bacteriocina; da utilização direta da bacteriocina em alimentos e da utilização da bacteriocina em películas para uso alimentar.

Os resultados obtidos demonstraram que este peptídeo, com aproximadamente 6 kDa, é termo estável e tem um elevado efeito anti-*Listeria*, tendo sido demonstrado que o mesmo é exercido numa ampla gama de pH. No que respeita às aplicações alimentares, demonstrou ter uma razoável estabilidade ao longo do tempo quando armazenada a temperaturas de refrigeração. A sua aplicação numa matriz alimentar, propositadamente contaminada com *Listeria monocytogenes* e a sua aplicação em películas de uso alimentar para controlo deste agente patogénico demonstraram ser promissoras, tendo resultado numa clara inibição do desenvolvimento deste agente patogénico ou mesmo numa redução da sua carga no alimento. Os estudos realizados revelaram que a

bacteriocina B391 tem potencial para futura utilização em produtos alimentares, sendo ainda necessário a realização de estudos adicionais que permitam garantir uma utilização segura e otimizada desta molécula ou da sua estirpe produtora.

ABSTRACT

In recent years, there has been increasing interest from consumers for safety and natural foods, consisting of products of high organoleptic and nutritional quality, without chemical additives, minimally processed and with extended shelf life. There is a need to develop better alternative conservation methods, that with the existing technologies can offer to consumers, a high quality and safe food. The use of bacteriocins, as natural agents, which help promoting food safety, namely, by inhibiting the growth of pathogenic microorganisms is a topic reflected in many research activities nowadays.

In this study, the partial characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* B391 regarding its potential use in the food industry as biopreservative has been performed. Most of the tests were focused on the thermal stability and the pH influence, on bacteriocin activity. The use of the bacteriocin *ex-situ* in foods and use of the bacteriocin in films for food packaging has also been performed

The results showed that this peptide of approximately 6 kDa, is thermostable and has a strong anti-*Listeria* effect, in a wide pH range. With regard to the food applications, it has proved reasonably stable over time when stored at refrigeration temperatures. Its application has been tested in a dairy product by direct incorporation, showing high stability for almost 3 months, preventing the development of a *Listeria monocytogenes* culture spiked on the cheese used as matrix. The direct use in a film for food packaging showed also its potential to control the development of this pathogen in pork meat.

Studies have shown that the bacteriocin B391 has potential future use in food products. Yet, further studies are still needed to guarantee safe use of this compound as well as optimize its use.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Paulo Fernandes, pela orientação segura, oportunidade de aprendizagem e confiança depositada em mim no decorrer da realização deste trabalho. Tenho ainda a agradecer a disponibilidade constante durante a correção do mesmo.

Ao Eng.º Vítor Monteiro pelo apoio durante a realização da parte prática, auxílio nos momentos de dúvidas e todos os conhecimentos transmitidos.

À Carla Ramos e à Luísa Imperadeiro quero a agradecer toda a paciência, disponibilidade e incentivo.

Às minhas colegas de Mestrado quero agradecer toda a ajuda prestada e todos momentos agradáveis de descontração.

Aos meus familiares e amigos, em particular à minha querida mãe, um muito obrigada, pelo amor, respeito, reconhecimento, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

Em especial, quero dedicar este trabalho ao meu avô Domingos Morgado por ter acreditado nas minhas capacidades e por me ter incentivado enquanto lhe foi possível. Agora, apesar de já não estar fisicamente presente, sei que a sua presença espiritual me guiou e me deu forças para terminar esta etapa. Sei que de onde ele estiver sente orgulho de mim por ver que consegui, pois foi com imensa alegria que recebeu a notícia do seu neto.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.2. Bacteriocinas.....	6
1.2.1. Bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL)	9
1.3. Principais aplicações de bacteriocinas.....	14
1.3.1. Generalidades	14
1.3.2. Aplicação na indústria alimentar.....	15
1.3.3. Bacteriocinas utilizadas na indústria alimentar	18
2. Enquadramento do trabalho realizado.....	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
2.3. Metodologia.....	20
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1. Manipulação e regeneração das estirpes bacterianas	21
3.2. Purificação parcial da bacteriocina produzida por <i>Lactobacillus plantarum</i> B391.....	21
3.3. Análise eletroforética da bacteriocina parcialmente purificada.....	22
3.4. Estabilidade da bacteriocina B391 parcialmente purificada a diferentes temperaturas ao longo do tempo	23
3.5. Estudo da adesão da bacteriocina B391 ao filme para embalagens alimentares	24
3.5.1. Determinação da quantidade de bacteriocina B391 aderida ao filme	24
3.6. Efeito da bacteriocina B391 contra <i>Listeria monocytogenes</i> B218	25
3.6.1. Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 a diferentes temperaturas.....	25
3.6.2. Influência da bacteriocina B391 no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em queijo	25

3.6.3.	Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em carne fresca	26
3.6.4.	Influência do CFS B391 no crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i> B218	28
3.7.	Adsorção da bacteriocina B391 às células produtoras.....	28
3.8.	Quantificação de proteína – Método de Lowry	29
3.9.	Produção da bacteriocina de <i>Lactobacillus plantarum</i> B391	30
3.9.1.	Produção da bacteriocina B391 ao longo do tempo a 4°C	30
3.10.	Estabilidade e atividade da bacteriocina em função do pH e do tratamento térmico	31
4.	Resultados e discussão	32
4.1.	Estudo da produção da bacteriocina de <i>Lactobacillus plantarum</i> B391 ..	32
4.2.	Adsorção da bacteriocina B391 às células produtoras.....	35
4.3.	Caracterização da bacteriocina B391.....	36
4.3.1.	Determinação da massa molecular relativa da bacteriocina B391	36
4.3.2.	Estabilidade da bacteriocina B391 parcialmente purificada a diferentes temperaturas ao longo do tempo	37
4.3.3.	Estabilidade e atividade da bacteriocina em função do pH e do tratamento térmico.....	39
4.4.	Influência da bacteriocina B391 no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218	41
4.4.1.	Efeito da temperatura	41
4.4.2.	Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i> B218.....	45
4.4.3.	Estudo da adesão da bacteriocina B391 parcialmente purificada a uma película para embalagens alimentares	49
4.4.4.	Crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em queijo na presença da bacteriocina B391 parcialmente purificada	51
4.4.5.	Crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em carne de porco fresca na presença de uma película contendo bacteriocina B391 parcialmente purificada	52
5.	Conclusão.....	55
6.	Bibliografia.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Inoculação da carne com <i>L. monocytogenes</i> B218 (10^5 UFC/mL)..	27
Figura 2 – Colocação da película, previamente imersa em bacteriocina B391 parcialmente purificada, sobre a superfície da carne	27
Figura 3 – Produção da bacteriocina B391 a 4, 22 e 30°C, ao longo do tempo	32
Figura 4 - Produção da bacteriocina B391 e contagem do número de células (\log_{10}) de <i>L. plantarum</i> B391 viáveis, a 4°C e ao longo do tempo	34
Figura 5 – Ação inibidora da bacteriocina B391 após electroforese em gel de tricina SDS-PAGE. 1 – Marcador molecular; 2 – Bacteriocina B391 parcialmente purificada	37
Figura 6 - Comportamento da bacteriocina B391 a diferentes temperaturas ao longo do tempo.....	38
Figura 7 – Estabilidade da bacteriocina B391 quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH	40
Figura 8 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em BHI a 4°C. Ensaio I	41
Figura 9 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em BHI a 4°C. Ensaio II	42
Figura 10 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em BHI a 22°C. Ensaio I	42
Figura 11 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em BHI a 22°C. Ensaio II	43
Figura 12 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em BHI a 30°C. Ensaio I	43
Figura 13 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em BHI a 30°C. Ensaio II	44
Figura 14 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da <i>L. monocytogenes</i> com concentração 10^7 UFC/mL	46
Figura 15 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da <i>L. monocytogenes</i> com concentração 10^6 UFC/mL	46

Figura 16 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da <i>L. monocytogenes</i> com concentração 10^5 UFC/mL	47
Figura 17 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da <i>L. monocytogenes</i> com concentração 10^4 UFC/mL	47
Figura 18 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da <i>L. monocytogenes</i> com concentração 10^3 UFC/mL	48
Figura 19 – Atividade anti- <i>Listeria</i> do filme contendo bacteriocina parcialmente purificada por cromatografia usando uma coluna SepPack C18 – Fração E3 [eluição com solução de TAA a 25mM e pH 6,5 e 40% (v/v) de isopropanol] ..	50
Figura 20 – Atividade anti- <i>Listeria</i> do filme contendo bacteriocina parcialmente purificada por cromatografia usando uma coluna SepPack C18 – Fração E4 [eluição com solução de TAA a 25mM e pH 6,5 e 60% (v/v) de isopropanol] ..	50
Figura 21 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em queijo fresco a 4°C. Valores obtidos através do calculo da média das contagens efectuadas, sendo que não se observaram diferenças superiores a 15% entre os duplicados.	51
Figura 22 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em carne fresca a 4°C. Ensaio I	54
Figura 23 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da <i>Listeria monocytogenes</i> B218 em carne fresca a 4°C. Ensaio II	54

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

APT – Água Peptonada Tamponada

ASAE – Autoridade para a Segurança Alimentar e Económica

BHI – Meio de cultura *Brain Heart Infusion*

CFS – *Cell Free Supernatant*

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

ESTG – Escola Superior de Tecnologia e Gestão

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

kDa – Kilo-Dalton

MRSA – Meio de cultura *Man, Rogosa e Sharpe Agar*

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MRSB – Meio de cultura *Man, Rogosa e Sharpe Broth*

OD – Densidade Ótica

PA/EVOH/PE – Poliamida / Copolímero etileno-álcool vinílico / Polietileno

PS – Peptona Sal

QPS – *Qualified Presumption of Safety*

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TSA – Meio de cultura *Tryptone Soy Agar*

UA – Unidades Arbitrárias

UFC – Unidades Formadoras de Colónia

UMA – Unidade de Microbiologia Aplicada

VRE – *Vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, devido à procura de uma melhor qualidade de vida, os consumidores estão, constantemente, preocupados com possíveis efeitos adversos à saúde provenientes da presença de aditivos químicos nos alimentos. Deste modo, tem aumentado o interesse por parte dos consumidores, por alimentos seguros e mais naturais, compostos por produtos de alta qualidade nutricional e organolética, sem aditivos químicos, minimamente processados, com amplo tempo de prateleira e em alguns casos por conterem propriedades terapêuticas. Alimentos assim designados por “biológicos”, “naturais”, “probióticos”, “isentos de aditivos”, têm atualmente mais procura do que nunca, prevendo-se que esta venha a ter uma tendência de crescimento (Castro *et al.*, 2011; Schulz *et al.*, 2003).

Muitos alimentos são perecíveis por natureza e necessitam de proteção contra microrganismos indesejáveis, quer sejam deteriorantes ou patogénicos, que possam surgir durante o seu processamento, armazenamento e distribuição a fim de lhes assegurar o tempo de prateleira desejado. Como os produtos alimentícios são comercializados, frequentemente, em zonas distantes do seu local de produção, por questões de segurança, o prazo de validade destes produtos deve ser estendido (Holley & Patel, 2005).

O aumento do tempo de prateleira dos alimentos, conservando as suas propriedades organoléticas e nutricionais originais é uma preocupação de grande atualidade em todo o mundo, até pelos complexos circuitos de distribuição que se verificam nos dias de hoje (Sousa *et al.*, 2012).

Esta desejada extensão do tempo de prateleira, tem naturalmente que ser compatível com as rigorosas exigências em termos de segurança alimentar, questões que assumem particular relevância até pela repercussão que podem ter ao nível da saúde pública. Assim, e desde há muito tempo, a indústria utiliza vários e diferentes métodos para prevenir ou inibir o crescimento microbiano tais como (entre muitos outros) a refrigeração, o congelamento, a secagem, a cura, os processos de conserva, embalagens a vácuo, embalagens com

atmosferas modificadas, embalagens contendo agentes antimicrobianos, fermentação e utilização de conservantes. As bacteriocinas possuem também um elevado potencial a este nível, sendo atualmente uma área de estudo em franca evolução (Galvez *et al.*, 2007; Gram *et al.*, 2002).

A contaminação de alimentos por bactérias patogénicas, como por exemplo, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, é também um problema para a indústria alimentar, com índices de morbilidade que, mesmo em países desenvolvidos, são ainda relevantes, tal como é patente do relatório disponibilizado pela EFSA relativamente a zoonoses na Europa (EFSA & ECDC, 2015). Deste modo, existe a necessidade de desenvolver alternativas de conservação cada vez melhores, para que aliadas às tecnologias existentes seja possível disponibilizar à população alimentos de melhor qualidade e mais seguros sob o ponto de vista da segurança alimentar (Schulz *et al.*, 2003).

Com este intuito, a bioconservação é uma alternativa bastante promissora. Consiste em explorar a capacidade dos microrganismos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. Constitui uma alternativa tecnológica para a produção de alimentos tornando-os mais competitivos, devido à ampliação da vida útil e ao reforço na segurança dos produtos alimentares por meio da microflora natural ou controlada, principalmente de bactérias lácticas e dos seus produtos antimicrobianos (Vásquez M *et al.*, 2009).

A fermentação láctica é um exemplo da bioconservação, que apesar de ser antiga, é até hoje, amplamente empregue na indústria alimentar. Os produtos finais do metabolismo das bactérias usadas nesta técnica, tais como, ácido láctico e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono e bacteriocinas, podem atuar como bioconservadores, alterando as propriedades intrínsecas de alimentos e inibindo microrganismos deteriorantes e patogénicos (Deegan *et al.*, 2006).

Nos últimos anos a grande parte dos estudos sobre bioconservação está concentrada nas bacteriocinas, mais concretamente na sua deteção, produção, purificação, nos mecanismos de ação, na caracterização bioquímica, nas

propriedades antimicrobianas, nos microrganismos inibidores ou sensíveis e na sua aplicação com êxito na bioconservação de alimentos (Vásquez M *et al.*, 2009).

Deste modo, a aplicação de bacteriocinas para melhorar a qualidade microbiológica e a segurança dos alimentos tem suscitado muitas pesquisas nos últimos anos e desta forma, um grande número de bacteriocinas têm sido isoladas e caracterizadas, mais concretamente, a partir de bactérias ácido lácticas, porém, é importante lembrar que estas substâncias antimicrobianas dificilmente poderão substituir as boas práticas de fabricação fundamentais para a produção de alimentos seguros (Gaamouche *et al.*, 2014; Hajikhani *et al.*, 2007).

O reconhecimento das questões ligadas à importância da higiene e das boas práticas na manipulação de alimentos, para a salvaguarda da saúde pública, está comprovado pela existência de legislação nacional e regulamentação europeia.

A União Europeia tem desenvolvido várias iniciativas legislativas com o intuito de assegurar um elevado nível de proteção da saúde pública. Em 2002, com a aprovação do Regulamento (CE) N°178/2002, foi dado início a um novo período legislativo relativo à higiene e segurança alimentar. Este regulamento determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.

Em 2006 entrou em vigor um novo pacote de legislação cujo diploma fundamental é o Regulamento (CE) N° 853/2004. No entanto, o pacote legislativo é mais completo, devendo ainda ter-se em consideração e particular atenção aos princípios, definições e regras estabelecidas em cada documento. Deste pacote faz parte o Regulamento da Comissão (CE) N° 2073/2005 de 15 Novembro de 2005 relativo aos critérios microbiológicos para géneros alimentícios.

O Regulamento (CE) Nº 1333/2008 prevê o estabelecimento de uma lista de aditivos alimentares aprovados para utilização nos géneros alimentícios bem como as respetivas condições de utilização.

É de importância referir que os órgãos envolvidos na implementação e controlo do cumprimento dos regulamentos são a Comissão do Codex Alimentarius a nível mundial, a EFSA a nível europeu e a nível nacional a ASAE.

1.1. *Listeria monocytogenes*

O microrganismo *L. monocytogenes* é um patogénico que causa uma doença de origem alimentar conhecida como listeriose e encontram-se entre as mais importantes causas de morte devido a infeções alimentares, mesmo em países industrializados (Ramaswamy *et al.*, 2007).

A espécie *L. monocytogenes* é oportunista e ubíqua no meio ambiente, sendo comumente encontrada em vários nichos tais como solos, plantas, água, numa grande variedade de alimentos, por exemplo carne e laticínios e ainda em fezes de seres humanos e de animais (Farber & Peterkin, 1991; Liu, 2006; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). É capaz de sobreviver e crescer a temperaturas de refrigeração, em alimentos embalados a vácuo e/ou em atmosfera modificada o que torna os alimentos prontos para consumo e com prazo de validade alargado, numa potencial fonte de infeção. Caso o processamento do alimento não inclua uma etapa de tratamento térmico, este microrganismo patogénico pode permanecer no produto (Lambertz *et al.*, 2012).

A *L. monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, desprovido de capsula, anaeróbio facultativo, não formador de esporos, consegue crescer e/ou sobreviver numa vasta gama de temperaturas compreendida entre os -0,4 e 50°C. Possui flagelos à temperatura ambiente, porém perde a motilidade a 37°C. É uma bactéria catalase positiva e oxidase negativa (Farber & Peterkin, 1991; Ramaswamy *et al.*, 2007; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

É relativamente tolerante ao cloreto de sódio (consegue crescer em ambientes com concentrações salinas até 10%) e consegue crescer a valores de pH entre 4,5 e 9 (Ryser & Marth, 2007; Sleator *et al.*, 2003; Vera *et al.*, 2013).

Em termos de segurança alimentar, considera-se que os alimentos em que os níveis não são superiores a 100 UFC/g constituem um risco pouco significativo. Assim, o critério microbiológico da União Europeia para *L. monocytogenes* é definido como ≤ 100 UFC/g para os produtos prontos para consumo disponíveis no mercado (EFSA & ECDC, 2014).

Os critérios estabelecidos pelo Regulamento da Comissão (CE) Nº 2073/2005 para *L. monocytogenes*, abrangem principalmente os produtos prontos para consumo e exigem:

- *Ausência de L. monocytogenes em 25 g para alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específicos;*
- *Níveis inferiores a 100 UFC/g de L. monocytogenes, durante o período de vida útil para outros alimentos prontos para consumo;*
- *Em alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de L. monocytogenes esta deve estar ausente em 25 g antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu. Contudo, se o operador conseguir demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 UFC/g até ao termo do seu período de vida útil, este critério não se aplica;*
- *Para alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de L. monocytogenes, o critério microbiológico a ser aplicado depende da fase da cadeia alimentar e se o fabricante consegue demonstrar que o produto não excederá o limite de 100 UFC/g até ao fim do seu período de vida útil.*

1.2. Bacteriocinas

A maioria, senão todas as bactérias, possuem um sistema de defesa muito peculiar, pois estas produzem várias substâncias no decurso do seu crescimento, que podem ser inibitórias tanto para si quanto para outras bactérias. Essas substâncias poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático. Tais substâncias incluem (Jack *et al.*, 1995; Riley & Wertz, 2002; Schulz *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2003):

- toxinas;
- enzimas bacteriolíticas como lisostafina, fosfolipase A e hemolisinas;
- subprodutos das vias metabólicas primárias como ácidos orgânicos, amónia e peróxido de hidrogénio e vários outros metabólitos secundários;
- antibióticos como a garamicina, valinomicina e bacitracina, que são sintetizadas por complexos multienzimáticos (a sua biossíntese, ao contrário das bacteriocinas, não é diretamente bloqueada por inibidores ribossomais da síntese de proteínas);
- bacteriocinas (são proteínas antimicrobianas ou complexos proteicos, usualmente um peptídeo, ativo contra espécies bacterianas).

Deste grupo de substâncias destacam-se as bacteriocinas. Relata-se que o pioneiro nas pesquisas das bacteriocinas foi André Gratia o qual em meados de 1925 publicou um estudo em que relata a capacidade de inibição, do crescimento microbiano, promovida por uma estirpe de *Escherichia coli* sobre outras estirpes da mesma espécie. Estas substâncias responsáveis por esta atividade antimicrobiana foram denominadas de 'colicinas'. Mais tarde com a descoberta de que a produção destes compostos não se restringia apenas ao grupo de coliformes, foi proposto o termo 'bacteriocinas' para designar as proteínas antimicrobianas produzidas por microrganismos. Em 1928, segundo Rogers, constatou-se a capacidade de algumas estirpes de *Lactococcus* spp. para promover a inibição de outras bactérias lácticas. Somente em 1947, Marttick e Hirsch concentraram uma substância inibidora produzida por uma

estirpe de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que apresentava uma grande atividade antimicrobiana, denominando-a de nisina, a bacteriocina mais utilizada hoje em dia (Cotter *et al.*, 2005; Sabo *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2008). Desde então, têm sido mencionados inúmeros estudos referentes a microrganismos produtores de bacteriocinas.

As bacteriocinas podem ser definidas como pequenos peptídeos com atividade antimicrobiana, sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e libertadas para o meio extracelular. Esta produção ocorre de forma natural durante a fase logarítmica do crescimento microbiano ou no final desta (no início da fase estacionária). Têm uma ação inibitória contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (Cotter *et al.*, 2005). Sabe-se, também, que numa única bactéria, podem ser produzidos diversos peptídeos com estas características (Lee & Kim, 2011).

Contudo, o mecanismo de produção destes agentes antimicrobianos ainda não está bem compreendido. Possivelmente a sua produção está relacionada com uma estratégia competitiva altamente específica contra outras bactérias, eliminando potenciais oponentes e aumentando o número de nutrientes disponíveis no meio ambiente para o seu próprio crescimento, permitindo assim dominar e estabelecer-se num dado nicho ecológico. (Eijsink *et al.*, 2002; Lee & Kim, 2011; Turovskiy *et al.*, 2007).

Existe uma grande diversidade de bacteriocinas, sendo que estas podem ser classificadas quanto ao seu tamanho, alvo microbiano, modo de ação e mecanismos de imunidade, sendo ainda divididas em bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (Galvez *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2007; Heng *et al.*, 2007).

As bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas são mais abundantes e mais diversificadas do que as produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Estas diferem das produzidas pelas Gram-negativas de dois modos (Maqueda *et al.*, 2008; Riley & Wertz, 2002):

- 1) A produção de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas não implica um efeito letal para a célula produtora;
- 2) As bactérias Gram-positivas têm mecanismos de regulação específica da expressão das bacteriocinas.

No grupo das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas, as colicinas e microcinas produzidas por *Escherichia coli* são as mais estudadas. Todas as bacteriocinas de bactérias Gram-negativas são proteínas de grande massa molecular no qual variam, dependendo da função, entre aproximadamente, 100 e 700 aminoácidos (Riley & Wertz, 2002). Apresentam três mecanismos de ação: 1) formação de poros na membrana citoplasmática; 2) degradação do DNA celular; 3) inibição da síntese proteica. Porém os seus espectros de inibição são muito estreitos relativamente às bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas, além de que, na maioria das vezes, tanto a célula produtora destas bacteriocinas como as bactérias que são sensíveis a elas pertencem à mesma família ou à mesma espécie (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013).

Relativamente às bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, a maioria dos estudos estão centrados nas bactérias ácido lácticas por produzirem uma vasta variedade de bacteriocinas de diferentes tamanhos, estruturas, propriedades físico-químicas e espectros de inibição (Yang *et al.*, 2014).

Relativamente ao espectro de inibição das bacteriocinas, a maioria é ativa contra bactérias Gram-positivas. Isto poderá dever-se ao facto das bactérias Gram-negativas possuírem uma membrana externa que funciona como uma barreira permeável para célula, o que dificulta e/ou impede que as bacteriocinas alcancem a membrana citoplasmática. Porém há estudos que relatam a combinação da bacteriocina com compostos que provocam lesões na membrana celular das bactérias Gram-negativas, como por exemplo, agentes quelantes (como o EDTA), permitindo assim a entrada da bacteriocina (Parada *et al.*, 2007).

1.2.1. Bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL)

As bactérias lácticas ou bactérias ácido lácticas (BAL) abrangem um grupo de microrganismos com diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes e que estão presentes em habitats ricos em nutrientes como alimentos, principalmente produtos lácteos, carne e vegetais, sendo também constituintes normais da flora microbiana dos tratos respiratório, intestinal e urogenital tanto do homem como de animais (Savadogo *et al.*, 2006).

São caracterizadas por serem bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete ou esférica, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativa, desprovidas de citocromos, anaeróbias tolerantes, fastidiosas, tolerante aos ácidos, não reduzem os nitratos a nitritos e apresentam um metabolismo fermentativo sendo o ácido láctico o principal produto final da fermentação (Axelsson, 2004; Sabo *et al.*, 2014). Podem ser mesofílicas (temperatura ótima de crescimento 30°C) ou termofílicas (temperatura ótima de crescimento 42°C) e o seu pH ótimo de crescimento é entre 4.0 e 4.5 (Sabo *et al.*, 2014).

Normalmente as BAL são usadas na indústria alimentar com fins tecnológicos, sendo acidificantes, tolerantes aos sais biliares e produtoras de substâncias antimicrobianas designadamente ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), peróxido de hidrogénio, enzimas, metabolitos de baixo peso molecular e bacteriocinas (O'Sullivan *et al.*, 2002).

As BAL com maior importância para a indústria alimentar, pertencem aos géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Saba *et al.*, 2014).

O *Lactobacillus* spp. é um dos géneros mais importantes no grupo das BAL. Engloba um número considerável de diferentes espécies que apresentam um certo grau de diversidade (como *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. brevis*, *L. fermentum*) (Fox *et al.*, 2000; Galvez *et al.*, 2007). Entre estas o *L. plantarum* é uma espécie versátil e flexível, e pode ser encontrada

numa grande variedade de nichos, e frequentemente no trato gastrointestinal humano e de outros animais. Tem sido apontado como um dos microrganismos mais importante na indústria alimentar, pois pode ser encontrado e isolado a partir de produtos lácticos e fermentados, como por exemplo, chucrute (conserva de repolho fermentado), massa lèveada, salsichas, queijos, vinhos, azeitonas (Sabo *et al.*, 2014). Este tipo de bactérias têm também a capacidade de crescer em diferentes temperaturas e valores de pH, toleram o oxigénio e diferentes concentrações de NaCl e nitrito. Tais características fisiológicas são ideais em *culturas starter* para que o seu uso não seja limitado pelas condições do processamento (Galvez *et al.*, 2007).

Algumas bacteriocinas produzidas pelas BAL, inibem não só espécies taxonomicamente próximas como também são eficazes contra agentes patogénicos nos alimentares importantes como a *L. monocytogenes*, assim como outros microrganismos patogénicos Gram-positivos (O'Sullivan *et al.*, 2002).

As bacteriocinas representam um grupo heterogéneo de peptídeos, tendo sido propostos diferentes sistemas de classificação. Em 1993, Klaenhammer propôs um sistema de classificação que diferenciava as bacteriocinas em quatro classes principais (Heng, et al., 2007):

Classe I - Peptídeos de pequena dimensão (<5 kDa) modificados pós-transcricionalmente,

Classe II - Peptídeos de pequena dimensão (<10 kDa) não modificados,

Classe III - Proteínas de cadeia longa (>30 kDa) termo lábeis,

Classe IV - Proteínas complexas conjugadas com lípidos ou glúcidos

Esta separação em quatro classes tem servido de base para a maioria das posteriores propostas de classificação das bacteriocinas. Contudo, existe uma falta de consenso na diferenciação de várias subclasses, particularmente na classe II, além de vários autores proporem a retirada da classe IV por falta de caracterização das moléculas a nível bioquímico (Cotter *et al.*, 2005). Além disso, a descoberta crescente de uma grande variedade de bacteriocinas,

resultou num panorama confuso fazendo com que diferentes investigadores propusessem novos esquemas de classificação. Apesar de todos os esforços, a classificação das bacteriocinas ainda não está bem estabelecida e continua a ser assunto de debate. Nesta tese, optou-se por uma classificação baseada na proposta feita por Sabo (Sabo *et al.*, 2014) assentada na estrutura primária, peso molecular, estabilidade ao calor e organização molecular das bacteriocinas, sendo estas subdivididas em quatro classes, conciliando esta classificação com proposições feitas por outros autores (Cleveland *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Heng *et al.*, 2007):

Classe I ou lantibióticos – consiste em peptídeos termo estáveis com baixo peso molecular (<5 kDa, com aproximadamente 19 a 38 aminoácidos) e são caracterizados pela presença dos aminoácidos com ligação tioéter lantionina e β -metil lantionina e pela presença de resíduos de aminoácidos modificados pós-translacionalmente. Esta classe é subdividida em Ia e Ib. A **subclasse Ia**, que inclui a nisina, é composta por peptídeos catiónicos e hidrofóbicos que tem como mecanismo de ação a formação de poros na membrana citoplasmática das espécies alvo e possuem uma estrutura mais flexível quando comparada com a dos peptídeos da subclasse Ib. A **subclasse Ib** é composta por peptídeos globulares, com uma estrutura mais rígida e apresentam carga neutra ou negativa.

Classe II ou não lantibióticos – é composta por peptídeos termo estáveis, pequenos (<10 kDa, com aproximadamente 37 a 48 aminoácidos), catiónicos e hidrofóbicos e podem ser divididos em três subclasses IIa, IIb e IIc. A **subclasse IIa**, também designada como bacteriocinas tipo pediocina, apresenta bacteriocinas com elevada atividade contra a *Listeria* spp, mais concretamente contra a *L. monocytogenes*. A **subclasse IIb** refere-se às bacteriocinas que necessitam de dois peptídeos diferentes para que tenham um efeito antimicrobiano, por exemplo Lactococcina G e M e a lactacina F. A **subclasse IIc**, são bacteriocinas que não sofrem modificações pós-transcricionais e têm uma estrutura cíclica devido à ligação covalente entre o C e N terminais.

Classe III – é constituída por peptídeos termolábeis e de maiores dimensões (> 30 kDa). Esta classe também é dividida em duas subclasses, IIIa e IIIb. A **subclasse IIIa** é designada por bacteriolisinas, que consiste em enzimas bacteriolíticas que facilitam a morte de estirpes sensíveis a partir da lise celular. A **subclasse IIIb** é constituída por bacteriocinas não líticas.

Classe IV – é composta por bacteriocinas complexas que contêm porções lipídicas ou de hidratos de carbono para além da porção proteica, essenciais á atividade. Contudo, Cleveland e seus colaboradores (Cleveland *et al.*, 2001) propuseram que esta complexidade se trata de artefactos da purificação parcial e não de uma nova classe de bacteriocinas.

O mecanismo de ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas, sendo que depende mais dos fatores relacionados à espécie bacteriana e das condições de crescimento do que propriamente a uma característica relacionada à sua própria molécula. Os mecanismos utilizados pelas bacteriocinas, para comprometer o crescimento de outros microrganismos, podem ter um efeito letal bactericida, sem lise ou com lise celular, ou então um efeito bacteriostático que consiste na inibição da multiplicação microbiana (Schulz *et al.*, 2003).

As bacteriocinas, e em particular os lantibióticos, inibem as células alvo por formação de poros na membrana, esgotando o potencial transmembranar e/ou o gradiente de pH, resultando na perda de conteúdo celular (Cleveland *et al.*, 2001). A natureza dos poros, em termos de tamanho, a estabilidade e a condutividade dos diferentes compostos, podem diferir consideravelmente entre bacteriocinas (Eijsink *et al.*, 2002). As bacteriocinas possuem frequentemente carga positiva com zonas hidrofóbicas, pelo que as interações eletrostáticas com os grupos fosfato de carga negativa das membranas contribuem para a ligação inicial com a célula alvo. A porção hidrofóbica insere-se em direção ao interior da membrana e origina a formação de poros (Cleveland *et al.*, 2001).

A condutividade e estabilidade dos poros induzidos pelos lantibióticos podem ser aumentadas por moléculas de ligação, nomeadamente o lípido II. O lípido II é um precursor peptidoglicano da parede celular e alguns lantibióticos ligam-se

a esta molécula inibindo a síntese da parede celular, levando assim à morte da célula. Alguns lantibióticos como a nisina possuem ambos os mecanismos de ação (formação de poros e ligação ao lípido II), enquanto que, a maioria apresenta apenas um destes mecanismos (Deegan *et al.*, 2006).

Estudos descrevem que para haver produção e secreção de bacteriocinas são necessários pelo menos quatro genes: 1) gene estrutural da bacteriocina, que codifica uma pré-bacteriocina; 2) o gene que lhe confere autoimunidade, este codifica uma proteína específica de imunidade, LanI, que está ligada à parte exterior da membrana citoplasmática e confere imunidade às células produtoras através do bloqueio da formação de poros; 3) um gene que codifica um transportador ABC (cassete de ligação ao ATP) necessário para secreção; 4) um gene que codifica uma proteína assessora da função contínua também necessária para a secreção (Sabo *et al.*, 2014; Deegan *et al.*, 2006)

1.3. Principais aplicações de bacteriocinas

1.3.1. Generalidades

De acordo com Cotter e seus colaboradores (Cotter *et al.*, 2005) pelo menos seis critérios devem ser cumpridos quando se trata da aplicação de bacteriocinas, sendo estes: 1) a estirpe produtora deve ser reconhecida como uma estirpe segura (GRAS – “*Generally Recognized As Safe*” segundo a FDA e QPS – “*Qualified presumption of safety*” de acordo com a EFSA), ou seja, não deve oferecer qualquer risco para os seres humanos; 2) a bacteriocina produzida deve possuir um amplo espectro de inibição contra microrganismos patogênicos, ou pelo menos contra algum patogênico em particular; 3) a bacteriocina deve ser termo estável; 4) não deve apresentar perigo para a saúde pública; 5) a adição da bacteriocina ao produto deve melhorar a conservação e a qualidade do mesmo; 6) deve ter uma ação altamente específica.

Uma grande parte das aplicações das bacteriocinas são relativas à indústria alimentar, mas também há estudos que remetem para outras áreas, por exemplo, na medicina dentária, uma série de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas têm sido testadas para o tratamento e prevenção de cáries causadas por *Streptococcus mutans* (Balakrishnan *et al.*, 2001).

Algumas espécies das bactérias ácido lácticas têm sido usadas como probióticos. Probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados/consumidos em quantidades adequadas, podem trazer benefícios para a saúde do hospedeiro” (Dobson *et al.*, 2012).

Tem sido relatado na literatura, uma grande variedade de benefícios associados ao *L. plantarum* como potencial probiótico. No geral esses estudos relatam que o uso deste microrganismo aumenta a flora intestinal e melhora os sintomas da síndrome do intestino irritável (Sabo *et al.*, 2014). Outro estudo constata que o *L. plantarum* PH04 é eficiente na redução do colesterol e que o consumo de probióticos *L. plantarum* melhora o estado de pessoas mais velhas (Bosch Gallego *et al.*, 2011).

Ainda, ao nível da área da saúde humana, tem sido realizados estudos que indicam que algumas espécies específicas das BAL demonstram possuir propriedades que lhes permitem combater bactérias multirresistentes e infeções bacterianas, como por exemplo, infeções a nível gastrointestinal provocadas por *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* e *Salmonella* (Nishie *et al.*, 2012).

As bacteriocinas também têm sido vistas com potencial interesse no controlo de bactérias patogénicas resistentes a antibióticos, como MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e VRE (*vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*). Existem estudos que comprovam que o *Bacillus pumilus* tem atividade contra MRSA e VRE (Aunpad & Na-Bangchang, 2007).

Algumas pesquisas relativamente às terapias contra o cancro indicaram que certas bacteriocinas demonstraram ter atividade contra células tumorais. Considerando que bacteriocinas são naturalmente e legalmente adicionadas a alimentos, também estas podem ser grandes candidatas a medicamentos contra o cancro. Um estudo verificou, que a colicina A e E1 inibiu o crescimento de 11 linhas de células tumorais humanas e 1 linha padrão de fibroblastos humanos (Yang *et al.*, 2014).

1.3.2. Aplicação na indústria alimentar

Como já foi mencionado, atualmente os consumidores estão cada vez mais atentos ao risco que constitui a presença de aditivos químicos e de microrganismos patogénicos nos alimentos, despertando assim o interesse pela procura de conservantes naturais. Esta perceção, em conjunto com a exigência crescente de alimentos minimamente processados com vida de prateleira prolongada, tem estimulado a pesquisa para encontrar conservantes naturais e eficazes (Balciunas *et al.*, 2013).

As bacteriocinas produzidas pelas BAL, podem ser consideradas conservantes naturais, pois têm a capacidade de aumentar a segurança alimentar, reduzindo a prevalência de doenças associadas à contaminação dos alimentos (Vásquez

M *et al.*, 2009). Por este motivo o campo principal de aplicação atual das bacteriocinas é na indústria alimentar.

A adição destes microrganismos nos alimentos apresenta cinco objetivos principais desejáveis: 1) melhorar a segurança do produto através do controlo de agentes patogénicos pela competição entre eles, 2) prolongar a vida útil do produto pela inibição de microrganismos deteriorantes, 3) diversificar o produto, modificando a matéria-prima, a fim de se obterem novas propriedades sensoriais, 4) reduzir o uso de conservantes químicos; 5) promover benefícios à saúde humana através de efeitos positivos na flora microbiana intestinal (Bernardi *et al.*, 2010).

Têm sido propostas diversas estratégias para a aplicação das bacteriocinas nos alimentos, sendo que estas são baseadas na adição de preparações produzidas *ex situ* ou na produção *in situ* das estirpes produtoras de bacteriocinas.

As bacteriocinas podem ser aplicadas nos alimentos pelo menos de três formas diferentes: 1) os alimentos podem ser inoculados por uma estirpe produtora de bacteriocina apropriada para a produção de bacteriocinas *in situ*, como cultura *starter*, que pode ser usada em substituição das tradicionais, ou em simultâneo; 2) pode ser adicionada, ao alimento, sob a forma de um ingrediente concentrado, resultante da fermentação de uma cultura produtora, 3) pela adição direta de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas como conservante alimentar (Cotter *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2008). As *culturas starter* são definidas como preparações que contêm microrganismos vivos ou em estado latente que se desenvolvem pela fermentação de um determinado substrato presente no meio, sendo geralmente aplicadas com o propósito de alterar de forma benéfica as propriedades dos alimentos, dentro dos quais, as carnes e os produtos fabricados à base de carnes, queijos e outros laticínios (Bernardi *et al.*, 2010).

A produção de bacteriocinas *in situ* oferece mais vantagens quando comparada com as preparações produzidas *ex situ*. No entanto, é necessária uma seleção cuidadosa das estirpes de modo a garantir a sua adaptação ao ecossistema particular do alimento (Balciunas *et al.*, 2013)

A atividade das bacteriocinas pode ser reduzida pela, ligação destas a componentes dos alimentos, adsorção às células ou proteínas, atividade das proteases e/ou outras enzimas (Balciunas *et al.*, 2013). Para além das interações com os componentes dos alimentos, as bacteriocinas podem ser afetadas pelas condições de processamento e de armazenamento do produto como o pH e a temperatura (Deegan *et al.*, 2006).

A eficiência inibitória das bacteriocinas também está relacionada com o nível de contaminação do alimento com microrganismo patogénico ou deteriorante. Se a contaminação inicial for muito alta, a bacteriocina pode ser incapaz de impedir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes (Balciunas *et al.*, 2013)

No entanto, a aplicação de bacteriocinas “*per se*” nos alimentos pode não ser suficiente para os proteger de contaminações, daí ser comum o uso de outros agentes conservantes em simultâneo (Abriouel *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2011).

Também tem sido estudada a hipótese de incorporar bacteriocinas, produzidas *ex situ*, em embalagens ativas para alimentos. Um estudo realizado por Barbosa e colaboradores (Barbosa *et al.*, 2013) avaliou o efeito da nisina incorporada em filmes de celulose, utilizadas para o acondicionamento de mangas, que foram previamente inoculadas com estirpe de *S. aureus* e *L. monocytogenes* e observou-se uma clara redução do número de células viáveis das estirpes patogénicas utilizadas.

1.3.3. Bacteriocinas utilizadas na indústria alimentar

Mais de 500 bacteriocinas foram identificadas, mas apenas a nisina e a pediocina PA-1 são comercializadas atualmente como conservantes alimentares, sendo a nisina a única bacteriocina aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Guerreiro *et al.*, 2014).

A pediocina PA-1 produzida por *Pediococcus acidilactici*, comercializada como Alta® 2341, tem elevada atividade anti-*Listeria* e é utilizada como um composto nos processos de fermentação (Sabo *et al.*, 2014).

A nisina é uma bacteriocina da classe dos lantibióticos produzida pelo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, uma bactéria amplamente utilizada na indústria de alimentos como cultura *starter* na composição de fermentos lácticos para o processamento de queijos. Porém as suas utilizações são limitadas, devido à sua baixa atividade em pH neutro e alcalino (Schulz *et al.*, 2005).

A introdução da nisina para uso comercial ocorreu na Inglaterra em 1953, e no ano de 1988 foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o uso como conservante em alimentos e reconhecida como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Tornou-se então a primeira bacteriocina aprovada para uso comercial em aplicações alimentares no processamento de leite e derivados e atualmente o seu uso é aprovado em mais de 50 países (Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006).

Tem um espectro de ação limitado, sendo ativa contra alguns microrganismos Gram-positivos, como *Lactococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Listeria* spp, *Mycobacterium* spp, células vegetativas e esporos de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp.. Normalmente a nisina não tem ação inibitória contra microrganismos Gram-negativos devido à constituição da sua membrana celular. Contudo, estudos relatam que o uso, por exemplo, de agentes quelantes, em simultâneo com a nisina potenciam a sua ação, pois estes causam lesões na membrana celular permitindo que a nisina atinja a célula alvo (Hammou *et al.*, 2010; Martin-Visscher *et al.*, 2011).

A nisina está disponível num concentrado em pó designado de Nisaplin® (Danisco), tendo sido aprovada para a lista de aditivos alimentares Europeia no início dos anos 80 com o número E234. Através do Anexo II do Regulamento (UE) N° 1129/2011, que serve de complemento ao Regulamento (CE) N° 1333/2008, é possível ter acesso aos alimentos e aos respetivos teores máximos de nisina permitidos.

O estudo das bacteriocinas e o frequente isolamento e caracterização de novas potenciais bacteriocinas levou à criação de uma base de dados de acesso livre, a Bactibase, que contém mais de 200 bacteriocinas, com o objetivo principal de organizar toda a informação referente aos vários tipos de bacteriocinas produzidas por diferentes bactérias. Tem como finalidade, otimizar a aplicação das bacteriocinas na indústria alimentar como bioconservante, aumentando assim a segurança dos alimentos e ainda auxiliar os investigadores no desenvolvimento de novas bacteriocinas ou novos fármacos com aplicação neste caso na medicina (Hammami *et al.*, 2010).

2. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO REALIZADO

2.1. Objetivo geral

Caracterização da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 com vista à sua potencial utilização na indústria alimentar.

2.2. Objetivos específicos

Caracterização da atividade e estabilidade da bacteriocina em diversas condições, nomeadamente em relação;

- à influência que a temperatura possui na capacidade do *Lactobacillus plantarum* B391 produzir a bacteriocina;
- à sua estabilidade térmica e correspondente influência do pH, quer na sua atividade quer na sua resistência a altas temperaturas;
- à utilização direta em alimentos, propositadamente contaminados com *Listeria monocytogenes*, para prevenção do crescimento microbiano;
- à utilização em filmes, por adsorção, para inibição do desenvolvimento microbiano em embalagens alimentares.

2.3. Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Microbiologia Aplicada – UMA, do Instituto Politécnico de Viana do Castelo.

O presente trabalho decorre no seguimento de uma bacteriocina já identificada e parcialmente caracterizada no laboratório referido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manipulação e regeneração das estirpes bacterianas

As culturas de *Listeria monocytogenes* B218 (estirpe selvagem, isolada de uma amostra alimentar, coleção UMA, Viana do Castelo, Portugal) e *Lactobacillus plantarum* B391 (estirpe isolada de queijo artesanal, coleção UMA, Viana do Castelo, Portugal) utilizadas para realização deste trabalho encontravam-se criopreservadas a – 20°C em meio BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) e em meio MRSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), respetivamente, com 20% (V/V) de glicerol (Merck, Darmstadt, Germany). As culturas foram regeneradas em 5mL de meio BHI (Biokar) e em meio MRSB (Biokar), a 37°C e a 30°C, respetivamente, durante a noite.

3.2. Purificação parcial da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391

A bacteriocina produzida por *L. plantarum* B391 foi parcialmente purificada, através do método descrito por Todorov (Todorov & Dicks, 2005). Inoculou-se 500mL de MRSB (Biokar) com 10mL da cultura o.n. de *L. plantarum* B391 durante a noite a 30°C. O CFS B391 foi obtido por centrifugação, durante 10 minutos a 3000rpm (Model 6660, Centurion Scientific, UK), da totalidade do volume, em seguida, foi tratado a 80°C durante 10 minutos e precipitado por adição de sulfato de amónio a 40% (Pronalab, Portugal), permanecendo a 4°C até ao dia seguinte. O precipitado foi recolhido por centrifugação durante 20 minutos a 13 000rpm (Mikro 20, Hettich, Germany) e dissolvido em 20mL de tampão acetato de amónio 25mM e pH 6,5 (Panreac, Espanha).

A solução obtida foi sujeita a cromatografia usando uma coluna SepPack C18 (Waters Millipore, MA, EUA). As diferentes frações foram eluídas em solução de tampão acetato de amónio 25mM e pH 6,5 (Panreac) com 20%, 40% e 60% (v/v) de isopropanol (Merck).

Às frações eluídas, efetuaram-se 13 diluições sucessivas (1:2) e mediu-se a atividade inibitória de cada diluição, expressa em UA/mL, de acordo o método *spot-on-the-lawn*, descrito por Stecchini e colaboradores (Stecchini *et al.*, 1995), em placas de Petri ($\varnothing = 90\text{mm}$) com TSA (Biokar) previamente inoculadas, por incorporação, com 100 μL de uma cultura de *L. monocytogenes* B218 a 10⁴ UFC/mL e incubou-se a 30°C durante a noite. As frações que apresentaram maior atividade inibitória foram concentradas, por simples evaporação, em tampão acetato de amônio 25mM e pH 6,5 (Panreac). A atividade em UA/mL foi calculada considerando a diluição onde não se observou nenhum halo de inibição, sendo calculadas pela seguinte fórmula: $2^n \times 100$, em que n = ao número da diluição que não apresente halo de inibição (Guerreiro *et al.*, 2014).

Para efeito de controlo, os meios/reagentes utilizados na purificação parcial da bacteriocina, foram testados quanto à sua atividade inibitória.

3.3. Análise eletroforética da bacteriocina parcialmente purificada

A bacteriocina parcialmente purificada foi sujeita a separação eletroforética em gel de Tricina SDS-PAGE. Este gel, composto por três camadas, (empacotamento, intermédio e separação), foi preparado conforme descrito por Schägger e von Jagow (Schägger & von Jagow, 1987), utilizando o sistema vertical Blue vertical 100, Serva Electrophoresis (Heidelberg, Germany).

As amostras foram preparadas adicionando NR-Sample Buffer (glicerol a 30% (w/v), 12% de SDS (w/v), 1% azul de Coomassie G-250 (Serva), 150 mM Tris-HCl (pH 7,0)) à solução de bacteriocina parcialmente purificada (obtidas como descrito em 3.2) na proporção 3:1. Como padrões de massa molecular foram usados, *Protein Molecular Weight Markers* (LMW) (*low range rainbow*, Bio-Rad) e insulina 3,5mg/mL (Lilly, Houten, Holand) juntos no mesmo poço do gel. Tanto as amostras como os padrões de massa molecular foram previamente incubados durante 1 hora a 37°C.

Colocaram-se as amostras e os padrões de massa molecular (*Marker* LMW + insulina) nos respetivos poços do gel e ligou-se a fonte de alimentação E865 (Consort, Turnhout, Belgium) aplicando, inicialmente, uma corrente de 10mA, 150V durante 20 minutos aproximadamente, fazendo as amostras percorrerem a

primeira camada do gel (gel de empacotamento). Quando as amostras atingiram o gel intermédio aumentou-se a intensidade de corrente para 14mA e quando alcançaram o gel de separação aumentou-se, novamente, a intensidade de corrente para 18mA.

No fim deste processo a metade do gel contendo o marcador foi corada com solução corante de azul de Coomassie (0.025%) (FLUKA, USA) e a outra metade foi colocada, assepticamente, numa placa de *Petri* ($\varnothing= 150\text{mm}$) com TSA (Biokar) e coberta com meio BHI agar, previamente inoculado com *L. monocytogenes* B218 (10^4 UFC/mL) e incubou-se a 30°C durante a noite.

3.4. Estabilidade da bacteriocina B391 parcialmente purificada a diferentes temperaturas ao longo do tempo

Para determinar a estabilidade da bacteriocina parcialmente purificada, esta foi submetida a incubação a 4°C , 22°C , 37°C e 44°C durante 44 dias. A atividade inibitória em UA/mL foi medida (como descrito no ponto 3.2), no 1º, 6º, 15º e 44º dia de incubação.

3.5. Estudo da adesão da bacteriocina B391 ao filme para embalagens alimentares

Este estudo foi realizado, segundo a metodologia descrita por Mauriello (Mauriello *et al.*, 2004). Foi utilizado um filme específico para alimentos (OPEX 55 AB – PA/EVOH (Barrier) /PE). Não foi realizado qualquer tratamento ao filme, sendo este apenas testado quanto à sua esterilidade em meio TSA (Biokar) e posterior incubação a 30°C durante a noite.

3.5.1. Determinação da quantidade de bacteriocina B391 aderida ao filme

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as duas frações resultantes da purificação da bacteriocina que obtiveram maior atividade inibitória (como descrito em 3.2). O filme, anteriormente mencionado, foi previamente cortado em pequenos quadrados (1.5 x 1.5cm) e colocado em placas de *Petri* ($\varnothing = 60\text{mm}$) com bacteriocina suficiente para que este ficasse submerso (1mL), permanecendo assim durante a noite a 4°C. De seguida, o filme foi colocado na câmara de segurança biológica o tempo necessário para a secagem do mesmo a temperatura ambiente (aproximadamente 2 horas a 22°C). Após esse período o filme foi colocado, em condições de assepsia, no centro de uma placa de *Petri* ($\varnothing = 90\text{mm}$) com TSA previamente inoculado, por incorporação, com 100µL de uma cultura de *L. monocytogenes* B218 a 10^4 UFC/mL e incubou-se a 30°C durante a noite (Mauriello *et al.*, 2004).

Em paralelo e após ter sido retirado o filme, foi determinada a atividade residual da solução usada (como descrito em 3.2), para posterior cálculo da quantidade de bacteriocina contida no filme.

Para efeito de controlo, filme (1.5 x 1.5cm) sem qualquer tratamento foi testado quanto à sua atividade inibitória.

3.6. Efeito da bacteriocina B391 contra *Listeria monocytogenes* B218

3.6.1. Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 a diferentes temperaturas

Inoculou-se 500mL de BHI (Biokar) com 5mL de uma cultura o.n de *L. monocytogenes* B218 com 10^5 UFC/mL. Esta cultura foi homogeneizada e antes de ser distribuída por diferentes tubos estéreis com 25mL, foi efetuada uma contagem inicial de *L. monocytogenes* B218. O teste foi realizado em paralelo e em duplicado, usando a cultura de *Listeria monocytogenes* à qual não foi adicionada bacteriocina e uma cultura à qual foram adicionados 100 μ L da bacteriocina, previamente purificada e posterior incubação a 4°C, 22°C e 30°C.

Ao fim de 2, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 200 e 360 horas de incubação foi realizada a quantificação da *L. monocytogenes* B218 presente, por espalhamento em agar TSA (Biokar) e incubação a 37°C durante 48 horas.

3.6.2. Influência da bacteriocina B391 no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em queijo

Este trabalho foi realizado com queijo fresco pasteurizado, da marca Queijos Santiago, obtido num estabelecimento comercial.

Foram colocados 200g de queijo em 4 sacos plásticos estéreis, sendo o saco nº1 o controlo, contendo apenas queijo, no saco nº 2 além do queijo foi adicionado 100 μ L da bacteriocina B391, previamente purificada (como descrito em 3.2), no saco nº 3 foi adicionado 100 μ L de uma cultura o.n. de *L. monocytogenes* B218 com 10^5 UFC/mL e no saco nº 4 foi adicionado 100 μ L de uma cultura o.n. de *L. monocytogenes* B218 com 10^5 UFC/mL e 100 μ L da bacteriocina, previamente purificada (como descrito em 3.2). Todos os sacos foram a incubar a 4°C.

De seguida, foi realizada a quantificação da *L. monocytogenes* B218 presente, em duplicado, pesando 5g de queijo do saco nº 1 (para verificação da existência de contaminação) e do saco nº 3, misturando APT (Merck) até alcançar as 50g,

homogeneizando durante 1 minuto num Stomacher 400 Lab Blender (Seward, London, UK) no máximo da velocidade. De seguida, foram realizadas diluições decimais com PS (Merck) e cada diluição foi plaqueada, por espalhamento, em agar ALOA (Oxoid) e incubação a 37°C durante 48 horas. Esta quantificação foi repetida para todos os sacos, em duplicado, ao fim de aproximadamente 2, 18, 42, 114, 166, 310, 478, 670, 814, 982, 1174 e 1342 horas de incubação.

3.6.3. Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em carne fresca

Este trabalho foi realizado com carne de porco fresca, segundo a metodologia descrita por Mauriello (Mauriello *et al.*, 2004). A carne foi cortada assepticamente numa câmara de segurança biológica, em pequenos cubos (3.3 x 3.3cm) com uma espessura de aproximadamente 1cm. De seguida, foram espalhados por cima de uma das faces da carne, 100µL de uma cultura o.n. de *L. monocytogenes* B218 com 10⁵ UFC/mL (Fig. 1). Posteriormente foi colocado em cima de cada pedaço, película contendo a bacteriocina B391 parcialmente purificada (Fig. 2; como descrito no ponto 3.5.1), película com tampão acetato de amónio 25mM e pH 6,5 (Panreac) e apenas película sem qualquer tratamento, de forma que a superfície da carne ficasse em contato com a película. Os pedaços de carne foram colocados em placas de Petri (Ø= 90mm) e guardados a 4°C. De seguida, foi realizada a quantificação da *L. monocytogenes* B218 presente, juntando a cada pedaço de carne, 100mL de meio Fraser (Oxoid), homogeneizado durante 1 minuto num Stomacher 400 Lab Blender (Seward, London, UK) no máximo da velocidade. De seguida, foram realizadas diluições decimais com PS (Merck) e cada diluição foi plaqueada, por espalhamento, em agar PALCAM (Oxoid) e incubação a 37°C durante 48 horas. Esta quantificação foi repetida, ao fim de aproximadamente 24 e 48 horas de incubação.

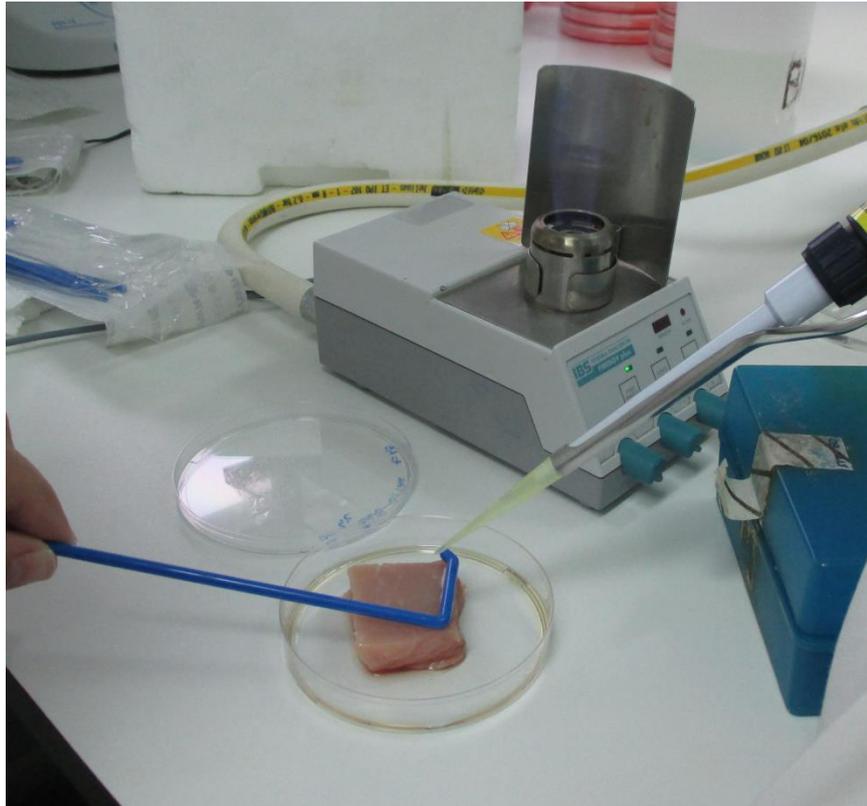


Figura 1 – Inoculação da carne com *L. monocytogenes* B218 (10^5 UFC/mL)

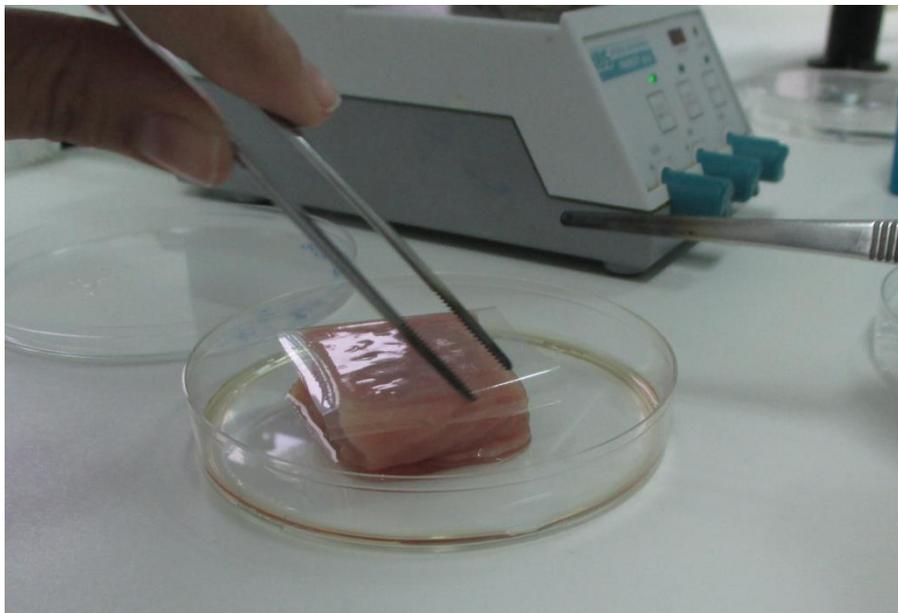


Figura 2 – Colocação da película, previamente imersa em bacteriocina B391 parcialmente purificada, sobre a superfície da carne

3.6.4. Influência do CFS B391 no crescimento da *Listeria monocytogenes* B218

A partir de 10mL de uma cultura o.n. de *L. plantarum* B391 com pH ajustado a 6.0, obteve-se CFS B391 através de centrifugação a 13000rpm durante 10 minutos (Mikro 20, Hettich, Germany) e posteriormente filtrado (Sterile Syringe Filter 0.2 µm, VWR, USA).

Foram feitas diluições decimais do CFS B391, até à 7^a, em 500µL de MRSB (Biokar), em cuvetes plásticas estéreis para espectrofotómetro. Foram adicionados 500µL de cultura o.n. de *L. monocytogenes* B218 com 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ UFC/mL, e incubadas a 30°C. Para cada série foi realizado um controlo do crescimento da *L. monocytogenes* B218 sem CFS B391. Foi realizada a quantificação da *L. monocytogenes* B218 presente, por espalhamento, em agar ALOA (Oxoid) e incubação a 37°C durante 48 horas. Foi medida a densidade ótica de cada cuvete, ao tempo 0 horas, num espectrofotómetro no comprimento de onda de 600nm (Helios gama, Unicam, England). Esta medição foi repetida ao fim de 24 e 48 horas de incubação.

3.7. Adsorção da bacteriocina B391 às células produtoras

Para testar a adsorção da bacteriocina B391 na superfície de células produtoras, foi utilizado o método descrito por Todorov (Todorov & Dicks, 2004). Obteve-se o CFS de uma cultura de *L. plantarum* B391 (10mL), com pH ajustado para 6.0, por centrifugação durante 10 minutos a 13000rpm (Mikro 20, Hettich, Germany). Foi guardado uma porção de sobrenadante para posterior verificação da atividade inibitória (V1) e o *pellet*, lavado 2 vezes com 10mL de tampão fosfato (pH 6.0; 0.1M) (Panreac). Por último, foi realizada uma nova centrifugação durante 10 minutos a 13000rpm (Mikro 20, Hettich, Germany) guardando novamente uma porção de sobrenadante para posterior verificação da atividade inibitória (V2) e o *pellet*, lavado com 10mL de 100mM de NaCl (pH 2.0) em agitação durante 1 hora a 4°C.

De seguida, centrifugou-se durante 30 minutos a 3000rpm a 4°C (Model 6660, Centurion Scientific, UK), retirou-se 1mL de sobrenadante para posterior verificação da atividade inibitória (V3) e ao restante ajustou-se o pH para 7.0 e verificou-se também a atividade inibitória do mesmo. A atividade inibitória em foi medida como descrito no ponto 3.2.

3.8. Quantificação de proteína – Método de Lowry

Este procedimento foi realizado segundo Lowry e seus colaboradores (Lowry *et al.*, 1951) preparou-se uma solução denominada solução de Lowry que consistiu na mistura das soluções A e B na proporção de 50:1. A solução A continha 0.4g de NaOH (Merck) e 2g de Na₂CO₃ (Riedel-de Haën, Germany) em 100mL de água e a solução B continha 0.1g de Tartarato de sódio potássio (Pronalab) e 0.05g de CuSO₄ (Merck) em 10mL de água.

Foi preparada uma solução padrão de albumina sérica bovina (2mg/mL) (VWR, USA), em tubos de plástico de 1mL, usada para a realização de uma curva de calibração contendo 0; 2.5; 5; 7.5; 10; 12.5; 15; 17.5; 20; 25; 30; 35µg de proteína.

Relativamente às amostras usadas para a determinação da concentração de proteína foram utilizadas as duas frações resultantes da purificação da bacteriocina que obtiveram maior atividade inibitória (como descrito em 3.2).

A todas as amostras e padrões de albumina sérica bovina, foi adicionado 1mL da solução Lowry. Após agitação com vortex aguardou-se 15 minutos. De seguida, adicionou-se a cada tubo 100µL de 1.0N do reagente Folin Ciocalteau (Merck), previamente preparado e aguardou-se 30 minutos. Ao fim desse tempo, foram lidas imediatamente as densidades óticas de cada, no comprimento de onda de 750nm por espectrofotometria (Helios gama, Unicam, England).

A concentração de proteína foi calculada a partir de um reta de calibração.

3.9. Produção da bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* B391

Uma cultura o.n. de *L. plantarum* B391 com 10^6 UFC/mL foi centrifugada (Mikro 20, Hettich, Germany) a 13000rpm durante 10 minutos. O *pellet*, após centrifugação e lavagem 3 vezes sucessivas com MRSB (Merck), foi ressuspenso em 2mL de MRSB (Merck). O volume total desta suspensão foram usados para inocular 100mL de MRSB (Merck).

De seguida, foram colocados 30mL desta cultura em 3 tubos de plástico e incubados a 4°C, a 22°C e 30°C. Após 24 horas de incubação, centrifugou-se 1mL da cultura durante 10 minutos a 13000rpm (Mikro 20, Hettich, Germany) das respetivas temperaturas, colocou-se 200µL do sobrenadante num tubo de plástico estéril e submeteu-se a tratamento térmico a 80°C durante 10 minutos (ISO-temp cover, MAXI-GENE, Stuart scintific). Posteriormente foi medida a atividade inibitória em UA/mL (como descrito em 3.2), sendo repetida em diferentes tempos de incubação, até aproximadamente 500 horas de incubação.

Este procedimento foi realizado em triplicado.

3.9.1. Produção da bacteriocina B391 ao longo do tempo a 4°C

Para a realização do presente trabalho prático foi aplicado o procedimento descrito em 3.9 sendo que neste caso inoculou-se 30mL de MRSB (Biokar) com 10mL de cultura o.n. de *L. plantarum* B391 com 10^9 UFC/mL, com a devida lavagem do inóculo com MRSB (Merck) e incubou-se a 4°C. Após 24 horas de incubação, centrifugou-se 1mL da cultura durante 10 minutos a 13000rpm (Mikro 20, Hettich, Germany), colocou-se 200µL do sobrenadante num tubo de plástico estéril e submeteu-se a tratamento térmico a 80°C durante 10 minutos (ISO-temp cover, MAXI-GENE, Stuart scintific). De seguida, foi medida a atividade inibitória (como descrito em 3.2), sendo repetida a diferentes tempos de incubação, até aproximadamente 78 dias de incubação. Em paralelo, foi realizado uma contagem do número de células viáveis de *L. plantarum* B391 em meio MRSA (Biokar) e incubação a 30°C durante a noite.

3.10. Estabilidade e atividade da bacteriocina em função do pH e do tratamento térmico

Inoculou-se 50mL de MRSB (Biokar) com 1mL e cultura o.n. de *L. plantarum* B391 incubou-se a 30°C durante a noite. Mediu-se o pH inicial (Orion 4 star, Thermo Scientific) e retirou-se amostra em quadruplicado (1mL x 4). Acertou-se o pH a 5.0, 6.0, 7.0 e 8.0, retirando as amostras entre cada acerto, como descrito anteriormente. Após obtenção do CFS do *L. plantarum* B391, filtrou-se cada uma das amostras (Sterile Syringe Filter 0.2µm, VWR, U.S.A.). Dois tubos de cada amostra foram submetidos a tratamento térmico (121°C, 20 minutos; Sterilclav AES-28, Raypa), os restantes foram colocados a 4°C. Efetuaram-se diluições sucessivas (1:2) até 11^a e mediu-se a atividade inibitória de cada diluição, através do método descrito em 3.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da produção da bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* B391

A produção da bacteriocina B391 foi estudada a 3 diferentes temperaturas, em meio de cultura MRSB (Merck) tal como descrito em material e métodos (3.9), apresentando-se na figura 3 os respectivos resultados.

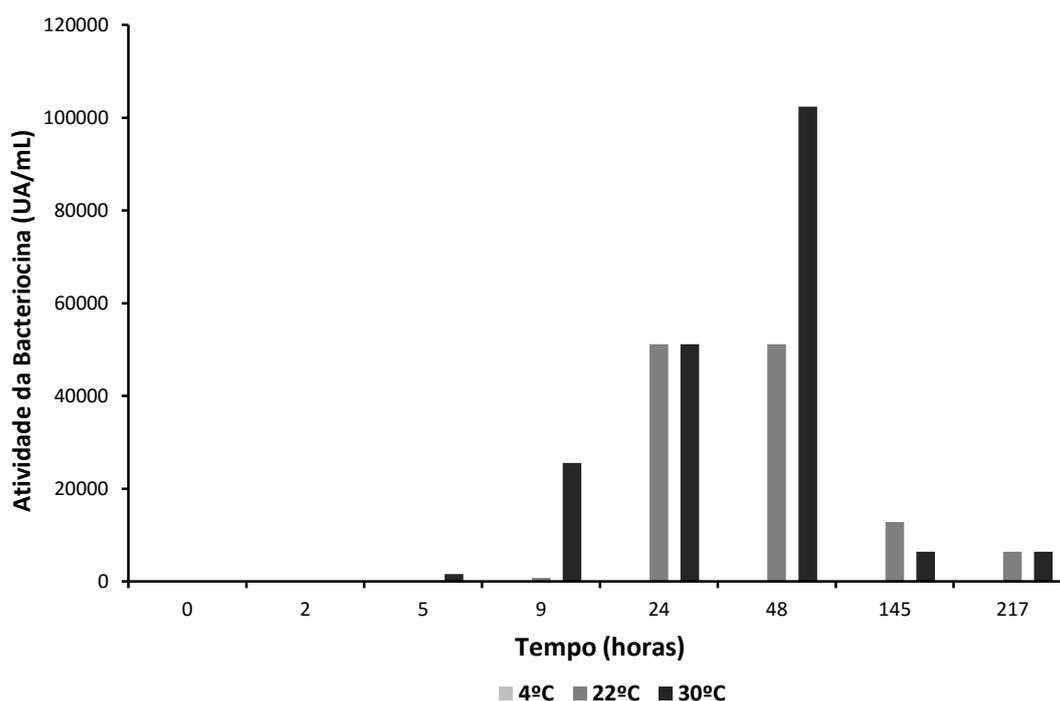


Figura 3 – Produção da bacteriocina B391 a 4, 22 e 30°C, ao longo do tempo

De acordo com os resultados obtidos é claramente evidente que a produção da bacteriocina B391 depende da temperatura (Fig. 3). Independentemente de poder existir uma temperatura ideal para a expressão da bacteriocina, verificou-se que a taxa de crescimento celular nas 3 diferentes temperaturas é desigual, sendo naturalmente superior à temperatura de 30°C. Dessa forma, os níveis de expressão proteica são normalmente superiores nestas condições, pelo que é normal a existência de uma certa correlação entre o aumento da temperatura e o aumento da atividade da bacteriocina no sobrenadante.

A 22°C apenas houve produção após 9 horas de incubação, com uma atividade de 800 UA/mL, atingindo o seu pico máximo de produção após as 24 horas (51200 UA/mL), que se manteve por mais 24 horas, notando-se um decréscimo nas horas seguintes. Em comparação a 30°C, observou-se produção logo após 5 horas de incubação (1600 UA/mL) e após 9 horas verificou-se uma produção de 32 vezes maior do que a 22°C, sendo o seu pico máximo atingido às 48h, com uma atividade de 102400 UA/mL, o que, em relação às temperaturas testadas, demonstrou ser a temperatura ideal. Também, num estudo semelhante constatou-se que esta temperatura (30°C), revelou ser a ideal para a bactéria *L. lactis* WNC20 produzir a sua bacteriocina (Noonpakdee *et al.*, 2003).

A 4°C, com uma população inicial de *L. plantarum* de 10⁶ UFC/mL, não foi possível detetar qualquer atividade antimicrobiana no sobrenadante (Fig. 3). Contudo, quando a concentração de bactérias usada foi superior, na ordem dos 10⁹ UFC/mL, foi possível observar-se que após 7 (168 horas) e 14 dias (336 horas) de incubação houve uma ligeira produção da bacteriocina, com atividade de 400 UA/mL e de 800 UA/mL, respetivamente (Fig. 4). Muito provavelmente esta atividade pode não ser sinónimo de produção ativa por parte da *L. plantarum* B391, uma vez que o crescimento desta espécie bacteriana não é significativo a temperaturas muito baixas, pois a temperatura ótima para o seu crescimento é entre 30-40°C (Salvetti *et al.*, 2012). De facto, a contagem do número de células viáveis de *L. plantarum* B391 a 4°C durante o período de incubação mostra não haver qualquer desenvolvimento assinalável da população microbiana a esta temperatura (Fig. 4). Estes resultados levam a crer que a bacteriocina responsável pela atividade existente poderá ser proveniente de uma produção intracelular que ocorreu antes da incubação a 4°C, sendo posteriormente secretada para o meio, tal como sucedeu com a *Lactobacillus sakei 2a* num estudo realizado por Martinez e seus colaboradores (Martinez *et al.*, 2015).

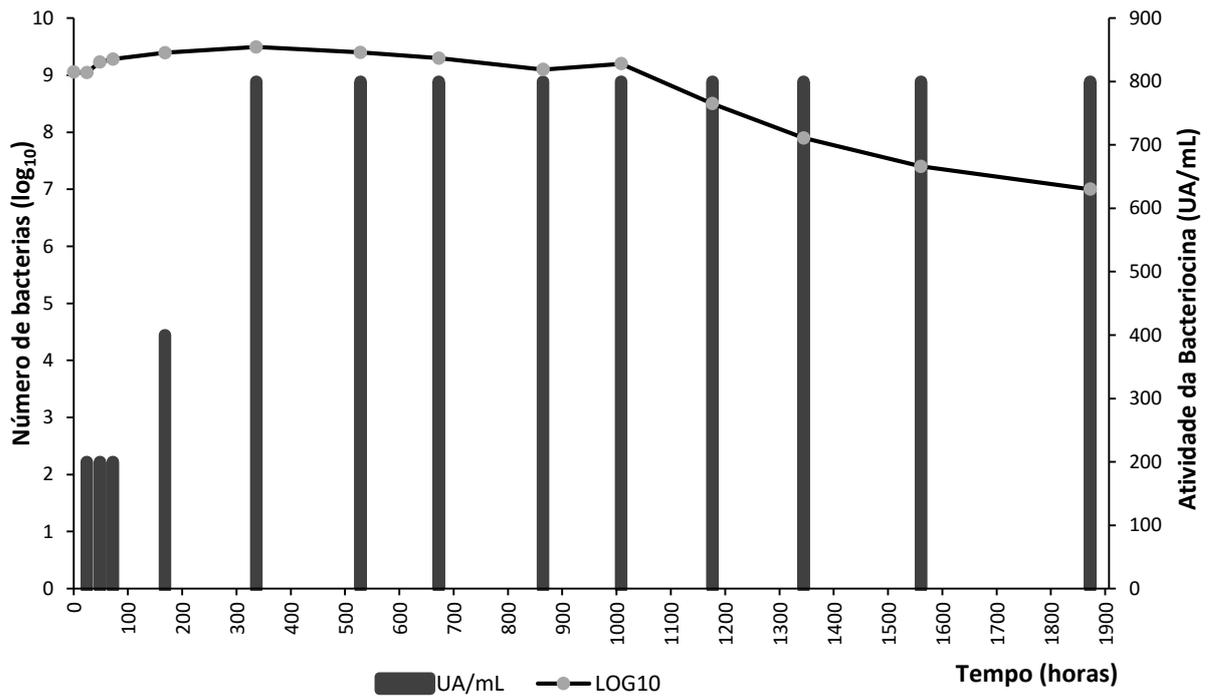


Figura 4 - Produção da bacteriocina B391 e contagem do número de células (\log_{10}) de *L. plantarum* B391 viáveis, a 4°C e ao longo do tempo

4.2. Adsorção da bacteriocina B391 às células produtoras

Algumas bacteriocinas adsorvem-se, em certa medida, à superfície das células do seu produtor, sendo que a pH muito baixo normalmente não ocorre ligação da bacteriocina à superfície das células produtoras. Yang e seus colaboradores (Yang *et al.*, 1992) realizaram um estudo acerca da influência do pH sobre a adsorção da pediocina ACH e da nisina às suas respectivas estirpes produtoras e concluíram que a adsorção destas bacteriocinas, às suas células produtoras, foi fortemente influenciada pelo pH do meio. Relativamente à pediocina ACH, esta foi adsorvida a 100% a um pH de 6,0 a 6,5, enquanto que a pH baixo (1,5) não se observou qualquer adsorção. Quanto à nisina, a adsorção máxima ocorreu a pH 6,5 tendo uma perda completa a pH abaixo de 3,0. Um estudo mais recente realizado por Atrih e seus colaboradores (Atrih *et al.*, 2001), também constatou esta teoria quando observou que a plantaricin C19, produzida por *L. plantarum* C19 demonstrou ter adsorção na gama de pH 5 – 7 e perda completa entre pH 1,5 e 2.

Após tratamento das células de *L. plantarum* B391 (pH 7) com NaCl a pH 2, não se observou qualquer atividade antibacteriana que pudesse resultar da libertação da bacteriocina para o meio em virtude do pH baixo, o que sugere que a mesma não aderiu às células produtoras.

Os resultados publicados relativamente à adsorção de bacteriocinas às células produtoras são variados, dependendo do tipo de bacteriocina e célula produtora. Por exemplo, o estudo realizado por Todorov e Dicks (Todorov & Dicks, 2004), em que o tratamento das células produtoras de bacteriocinas com NaCl a pH baixo, não se observou qualquer atividade das bacteriocinas, sugerindo que não ocorreu adesão das mesmas às superfícies celulares. Este comportamento foi ainda relatado para outras bacteriocinas, nomeadamente, plantaricin ST31, produzida por *L. plantarum* ST31 (Todorov *et al.*, 1999), pediocina ST18, produzido por *Pediococcus pentosaceus* ST18 (Todorov & Dicks, 2005) e bozacin B14, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* B14 (Ivanova, 2000).

4.3. Caracterização da bacteriocina B391

4.3.1. Determinação da massa molecular relativa da bacteriocina B391

A bacteriocina parcialmente purificada foi sujeita a uma eletroforese em gel de tricina SDS-PAGE. Contudo, verificou-se não ser possível visualizar a banda da proteína nem após coloração com azul de Coomassie nem por coloração com nitrato de prata, método muito mais sensível. Esta impossibilidade pode ser devido ao facto de a maioria das bacteriocinas de classe I ou classe II serem polipeptídeos com peso molecular não maior que 10 kDa (Nishie, et al., 2012). Segundo a literatura este comportamento é comum a várias bacteriocinas, como por exemplo, a mesentericin Y015, uma bacteriocina de peso molecular 3 kDa, que quando submetida aos procedimentos convencionais de coloração, como anteriormente indicados, não se obteve qualquer visualização da banda no gel (Hechard *et al.*, 1992). Outra possibilidade é durante o processo de coloração ocorrer uma difusão da bacteriocina no gel de tricina e esta ser eluída, tal como comprovado por Mackay-Carolissen e seus colaboradores (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997).

No entanto, após incubação do gel contendo a proteína separada eletroforéticamente na presença de *L. monocytogenes* B218, foi possível observar de forma inequívoca uma zona de inibição, o que permitiu constatar que o seu peso era cerca de 6 kDa (Fig. 5).

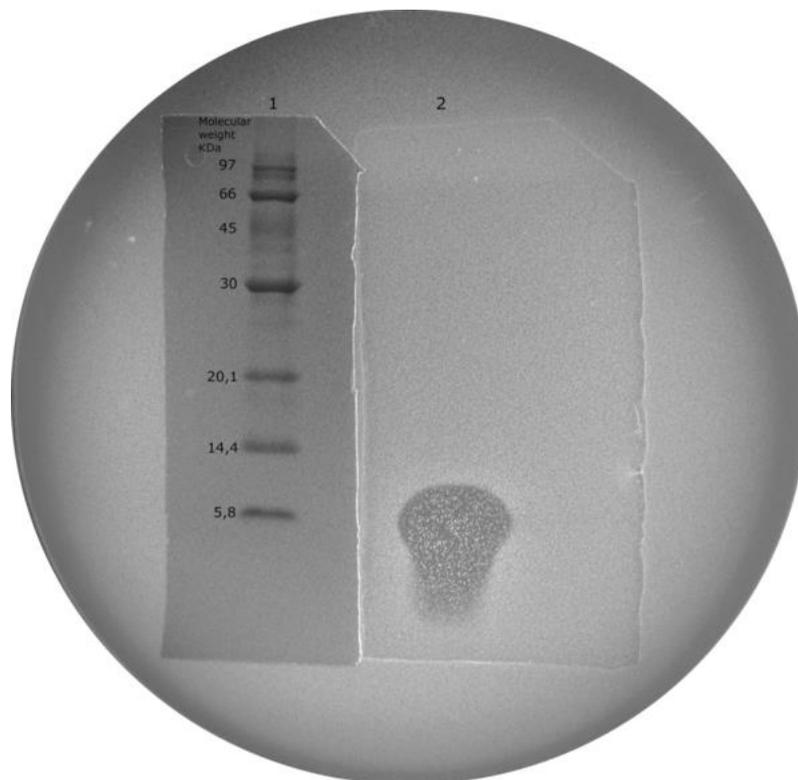


Figura 5 – Ação inibidora da bacteriocina B391 após eletroforese em gel de tricina SDS-PAGE. 1 – Marcador molecular; 2 – Bacteriocina B391 parcialmente purificada

4.3.2. Estabilidade da bacteriocina B391 parcialmente purificada a diferentes temperaturas ao longo do tempo

A estabilidade térmica da bacteriocina em estudo, foi analisada durante um período de 44 dias em quatro diferentes temperaturas, 4°C, 22°C, 37°C e 44°C, como descrito em 3.4. Através da análise da Figura 6 observou-se que à medida que a temperatura aumenta a atividade da bacteriocina diminui, ou seja, a estabilidade da bacteriocina é claramente dependente da temperatura. À temperatura de 4°C constatou-se que houve uma diminuição da atividade de cerca de 87,5% entre o 1º e 6º dia, contudo até ao 44º dia a atividade manteve-se inalterada. Num estudo realizado acerca da estabilidade da bacteriocina produzida por uma bactéria *L. plantarum* B391, armazenada em condições de refrigeração (4°C durante 90 dias), esta demonstrou que apesar de um perfil de atividade baixo, este manteve-se ao longo dos 3 meses (Fatima & Mebrouk, 2013).

No que respeita aos 22°C e 37°C verificou-se que a atividade da bacteriocina sofreu uma diminuição progressiva ao longo dos dias, sendo que ao 15º dia a diminuição foi de 98,4% e 99,8% para 22°C e 37°C, respetivamente, não apresentando qualquer atividade ao 44º dia para nenhuma das temperaturas. Em relação à temperatura de 44°C também se verificou uma diminuição progressiva da atividade da bacteriocina até ao 6º dia, onde apresentava uma atividade quase nula, cerca de 0,2%. Constatou-se ainda que num único dia a atividade da bacteriocina sofreu a mesma diminuição a 44°C que a 4°C em 44 dias.

Num estudo realizado relativamente ao efeito do armazenamento, tempo e temperatura, na atividade da bacteriocina produzida por *L. plantarum* F1, esta demonstrou manter uma boa estabilidade durante 60 dias, acondicionada a 20°C. Contudo, neste mesmo período foi detetada uma perda completa da atividade quando armazenada a 37°C (Ogunbanwo *et al.*, 2003).

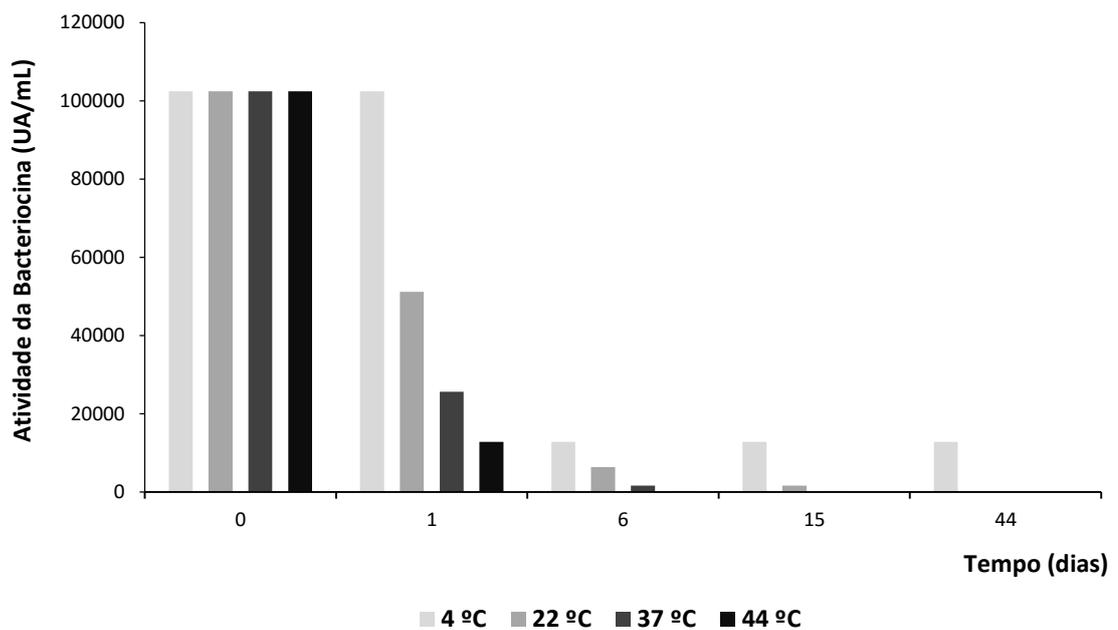


Figura 6 - Comportamento da bacteriocina B391 a diferentes temperaturas ao longo do tempo

4.3.3. Estabilidade e atividade da bacteriocina em função do pH e do tratamento térmico

Constatou-se que as alterações do pH do CFS obtido de *L. plantarum* B391 afeta de modos distintos a sua atividade antimicrobiana. Como se pode observar na Fig. 7, o CFS com pH ajustado na faixa de 3,95 – 8,09 e que não foi sujeito a tratamento térmico, manteve-se ativo em toda a gama de pH testado, sendo a atividade máxima da bacteriocina obtida entre pH 6-7. Estudos existentes acerca de bacteriocinas produzidas por outras estirpes de *L. plantarum* demonstram que estas apresentam um perfil de estabilidade similar ao da bacteriocina em estudo (Atrih, et al., 2001).

Segundo Todorov (Todorov, 2009), a estabilidade da bacteriocina quando submetida a altas temperaturas é uma característica comum para a maioria das bacteriocinas produzidas por *L. plantarum*. Estudos realizados com bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* da mesma espécie, plantaricin LP84 (Suma *et al.*, 1998) e plantaricin C (González *et al.*, 1994), demonstraram ter um comportamento similar. Também Todorov e Dicks (Todorov & Dicks, 2009) descreveram que a bacteriocina ST44AM permaneceu estável a 25, 30, 45, 60 e 100° C durante 120 minutos.

Em outro estudo Todorov e colaboradores (Todorov *et al.*, 2011) referem que a bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* R1333 permaneceu estável após tratamento térmico a 100°C durante 120 minutos a um pH de 5.5.

Os resultados obtidos indicaram que a bacteriocina B391 manteve-se estável após 20 minutos a 121°C, com o tratamento térmico realizado a pH baixo. No entanto, para pH acima de 5, a bacteriocina demonstrou uma elevada termo sensibilidade, pois perdeu quase toda a sua atividade quando exposta a 121°C, denotando-se a perda total da mesma a pH 7, como pode ser observado na Figura 7.

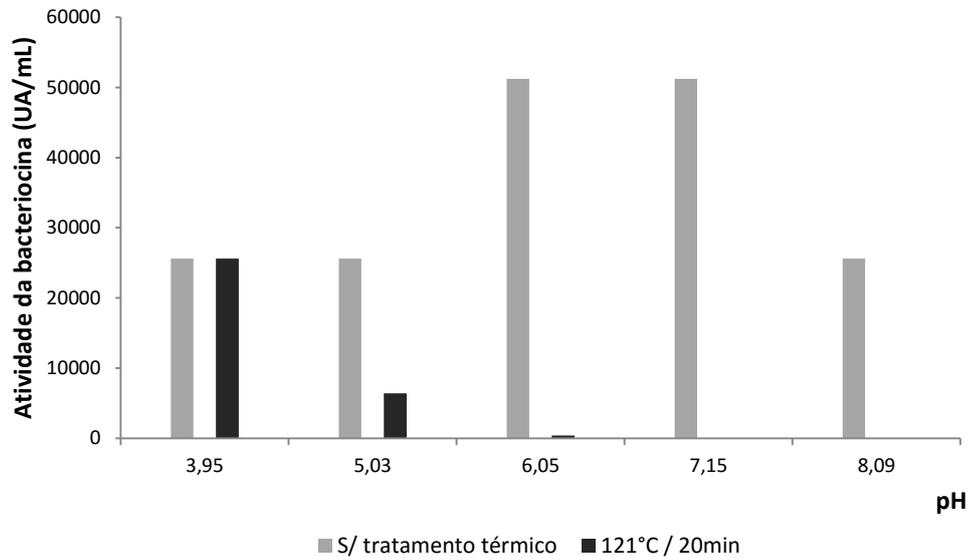


Figura 7 – Estabilidade da bacteriocina B391 quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH

Um estudo realizado com a nisina, produzida por *L. lactis* WNC20, demonstrou ter atividade a valores de pH baixos (3 a 5) quando incubada a 121°C durante 15 minutos, contudo a pH neutro (≥ 7) verificou-se perda total da sua atividade (Noonpakdee *et al.*, 2003). Também a bozacin B14, produzida por *L. lactis*, foi inativada após 10 minutos a 90°C (Ivanova, 2000).

4.4. Influência da bacteriocina B391 no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218

4.4.1. Efeito da temperatura

Foi testado o efeito da temperatura na atividade da bacteriocina B391, parcialmente purificada, no crescimento e viabilidade da *L. monocytogenes* B218 (com 10^5 UFC/mL, em meio BHI) a 3 diferentes temperaturas (4°C, 22°C e 30°C), tal como descrito em 3.6.1.

Os resultados obtidos foram apresentados individualmente pois o presente trabalho foi realizado em duplicado porém em tempos separados. Contudo, verificou-se que o comportamento da *L. monocytogenes* B218 foi muito semelhante em ambos os ensaios (I e II), como se pode comprovar nas figuras seguintes.

A 4°C verificou-se que existe um decréscimo do número de bactérias de *L. monocytogenes* B218 entre as 24 e 100 horas de incubação, tendo ao fim deste período ocorrido uma lenta recuperação por parte da *L. monocytogenes* B218. Contudo só após aproximadamente 500 horas de incubação é que a *L. monocytogenes* B218 na presença da bacteriocina B391 alcança uma população microbiana com níveis semelhantes ao da cultura realizada na ausência de bacteriocina B391 (Fig. 8 e 9).

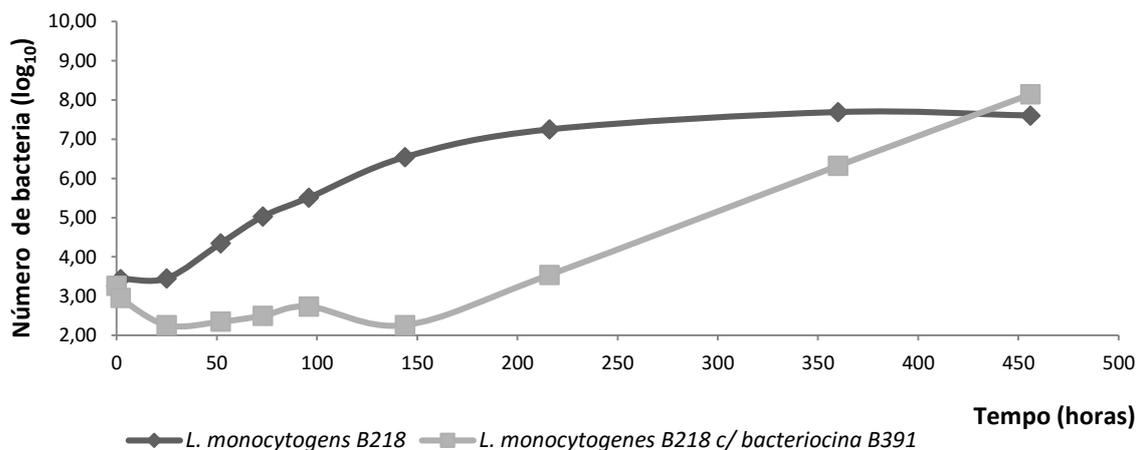


Figura 8 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em BHI a 4°C. Ensaio I

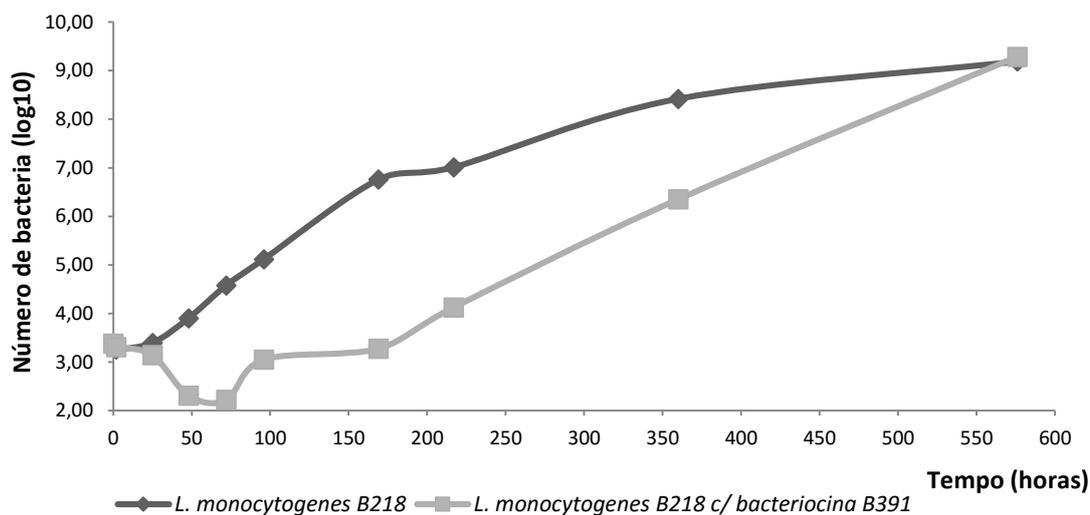


Figura 9 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em BHI a 4°C. Ensaio II

A 22°C o comportamento é substancialmente diferente. Existe de facto um forte retardamento do crescimento inicial, verificando-se uma diferença de 3 logs ao fim de 1 dia de incubação entre a cultura com e sem bacteriocina B391. No entanto, após cerca de 50 horas de incubação, ambas as culturas apresentam uma concentração de células semelhante, o que se mantém durante o resto do período de incubação (Fig. 10 e 11).

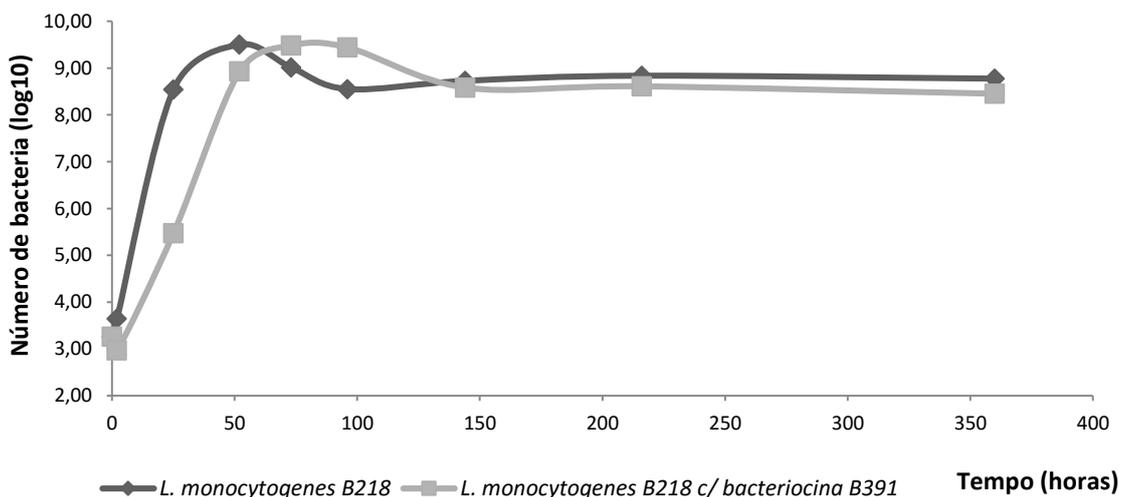


Figura 10 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em BHI a 22°C. Ensaio I

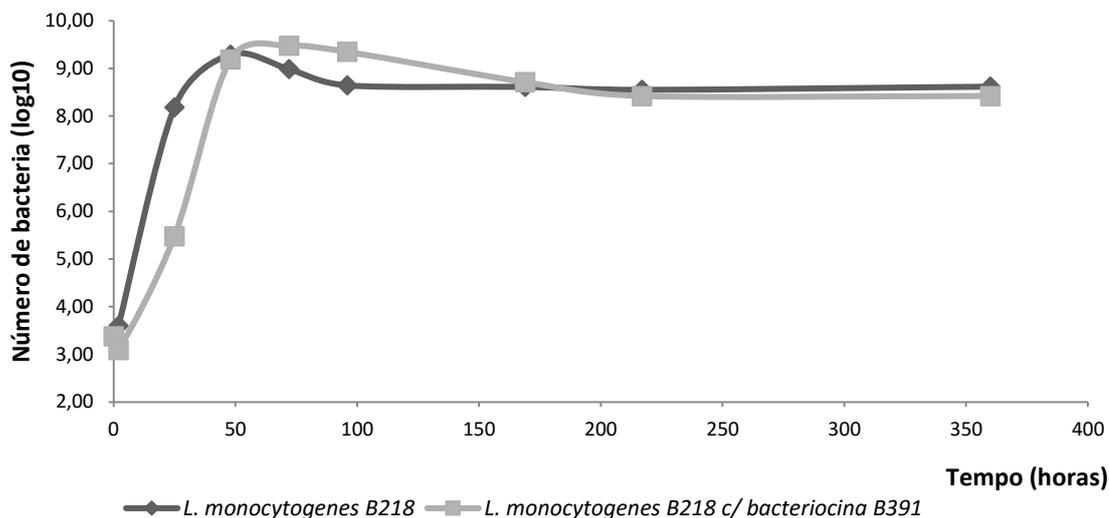


Figura 11 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em BHI a 22°C. Ensaio II

A 30°C o efeito inibitório inicial é menos acentuado do que observado a 22°C, embora presente. No entanto, a recuperação da população ocorre de forma mais rápida mantendo-se níveis idênticos em ambas as culturas, com e sem bacteriocina B391 até ao fim do período de incubação (Fig. 12 e 13).

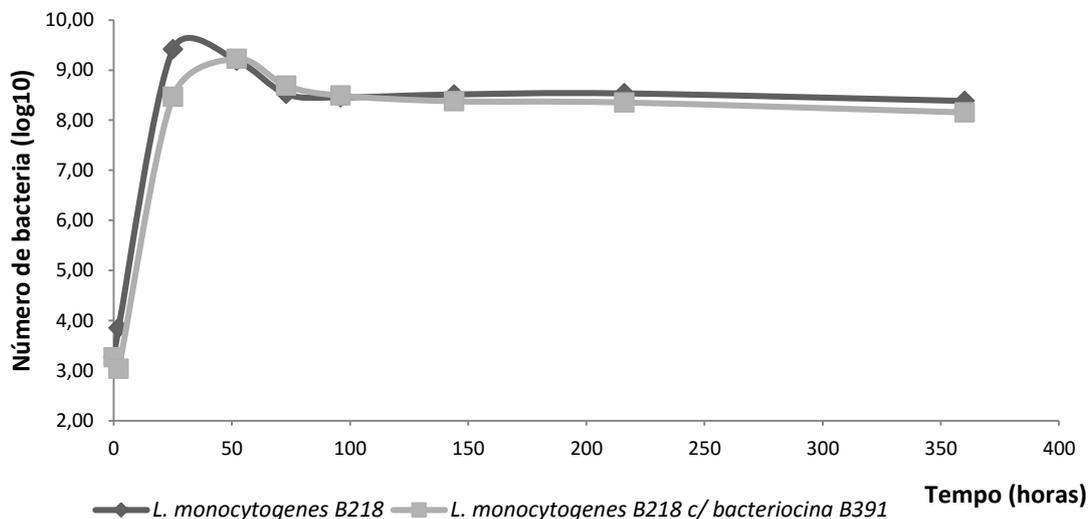


Figura 12 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em BHI a 30°C. Ensaio I

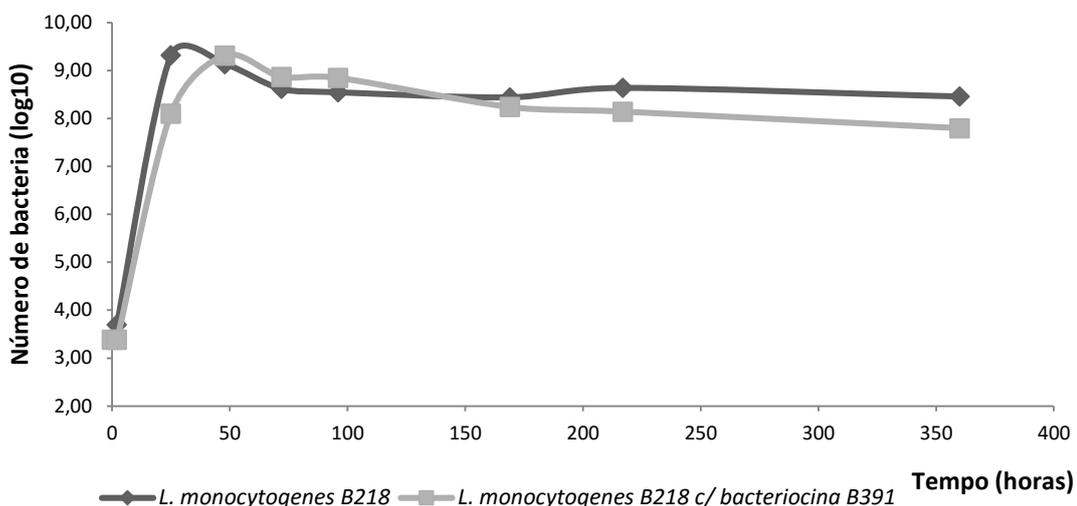


Figura 13 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em BHI a 30°C. Ensaio II

A temperatura ótima de ação da bacteriocina contra a *L. monocytogenes* B218 foi 4°C. Esta é normalmente a temperatura utilizada no armazenamento de uma grande variedade de produtos, por exemplo laticínios e produtos cárneos, motivo pelo qual os ensaios realizados em queijo e em carne foram efetuados a esta temperatura.

De um modo geral os resultados obtidos são o reflexo da perda de atividade da bacteriocina a cada uma das temperaturas. Por exemplo a 4°C, a recuperação da cultura de *L. monocytogenes* B218 tem início, precisamente, a quando da perda significativa da atividade da bacteriocina (Fig. 6). Por si só e como comprovado em 4.3.2 a bacteriocina B391 demonstra ter uma perda da atividade entre o 5º e 6º dia, mantendo-se constante nos restantes dias. Consequentemente, os resultados obtidos a 22°C e 30°C estão em concordância com os obtidos anteriormente para a estabilidade da bacteriocina a diferentes temperaturas (Fig. 6). De facto, a atividade da bacteriocina a estas temperaturas é significativamente afetada, como já demonstrado anteriormente.

Neste ensaio a concentração de *L. monocytogenes* B218 utilizada pode também constituir um fator que interfere na eficácia da bacteriocina. Segundo Galvez e colaboradores (Galvez *et al.*, 2007) o elevado nível de contaminação do meio pode diminuir a atividade da bacteriocina a sua ação contra o desenvolvimento do agente patogénico.

4.4.2. Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da *Listeria monocytogenes* B218

A atividade da bacteriocina B391, obtida a partir do CFS, foi testada na presença de diferentes atividades (UA/mL) e na presença de populações iniciais de *L. monocytogenes* B218 de diferentes concentrações (10^3 UFC/mL – 10^7 UFC/mL).

O efeito da bacteriocina B391 no crescimento da *L. monocytogenes* B218 dependeu quer da concentração inicial da bactéria patogénica quer da atividade da bacteriocina B391. Observou-se, para todas as concentrações de *L. monocytogenes* B218 (Fig. 14 a 18), um efeito na inibição do crescimento que se prolongou até às 48 horas mesmo quando a bacteriocina foi adicionada com uma atividade mínima (apenas 400UA/mL) até na concentração mais elevada (10^7 UFC/mL – Fig. 14). No entanto, o efeito foi mais notório ao fim de 24 horas particularmente para concentrações iniciais de *L. monocytogenes* B218 $\leq 10^5$ UFC/mL (Fig. 16 a 18).

Apesar de se observar que a um aumento da atividade da bacteriocina presente na cultura, corresponde um maior efeito inibitório no crescimento da *L. monocytogenes* B218, na verdade este efeito não apresenta uma relação absolutamente linear e direta, já que a simples duplicação da atividade da bacteriocina B391 não tem um resultado equivalente em termos proporcionais ao nível da inibição da *L. monocytogenes* B218.

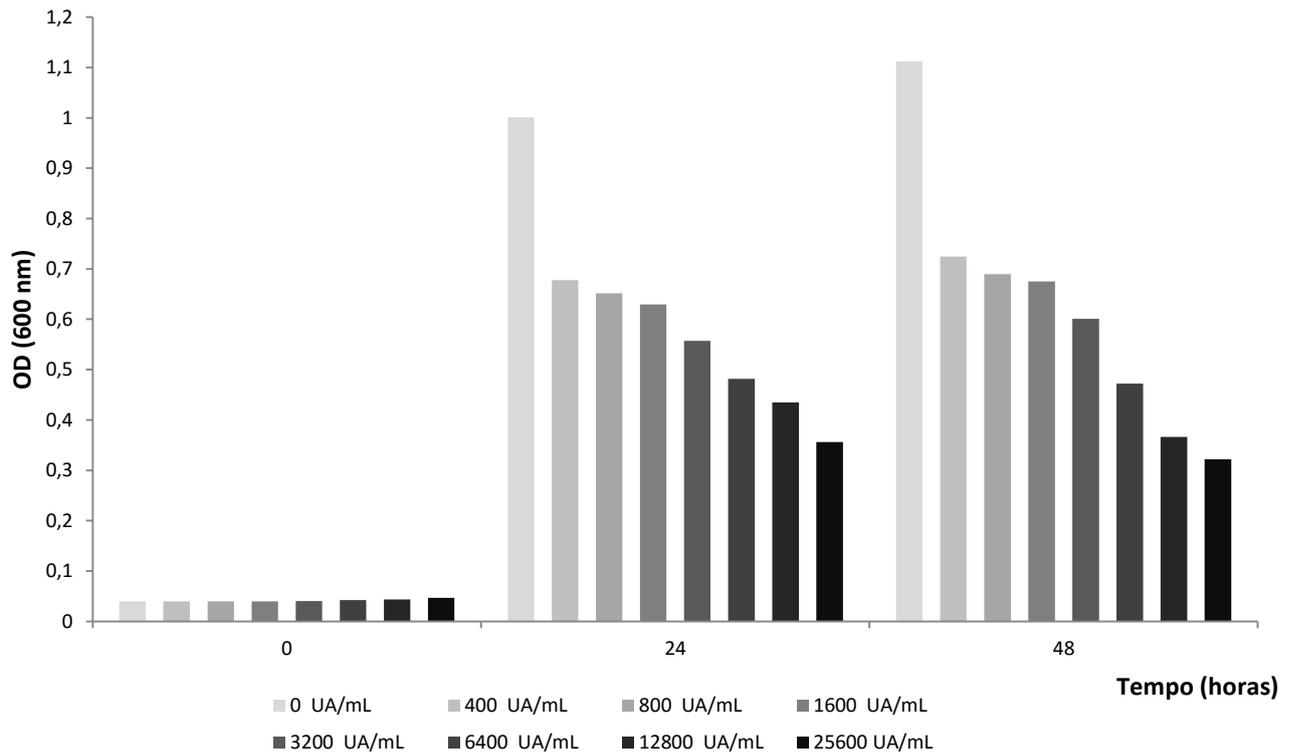


Figura 14 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da *L. monocytogenes* com concentração 10^7 UFC/mL

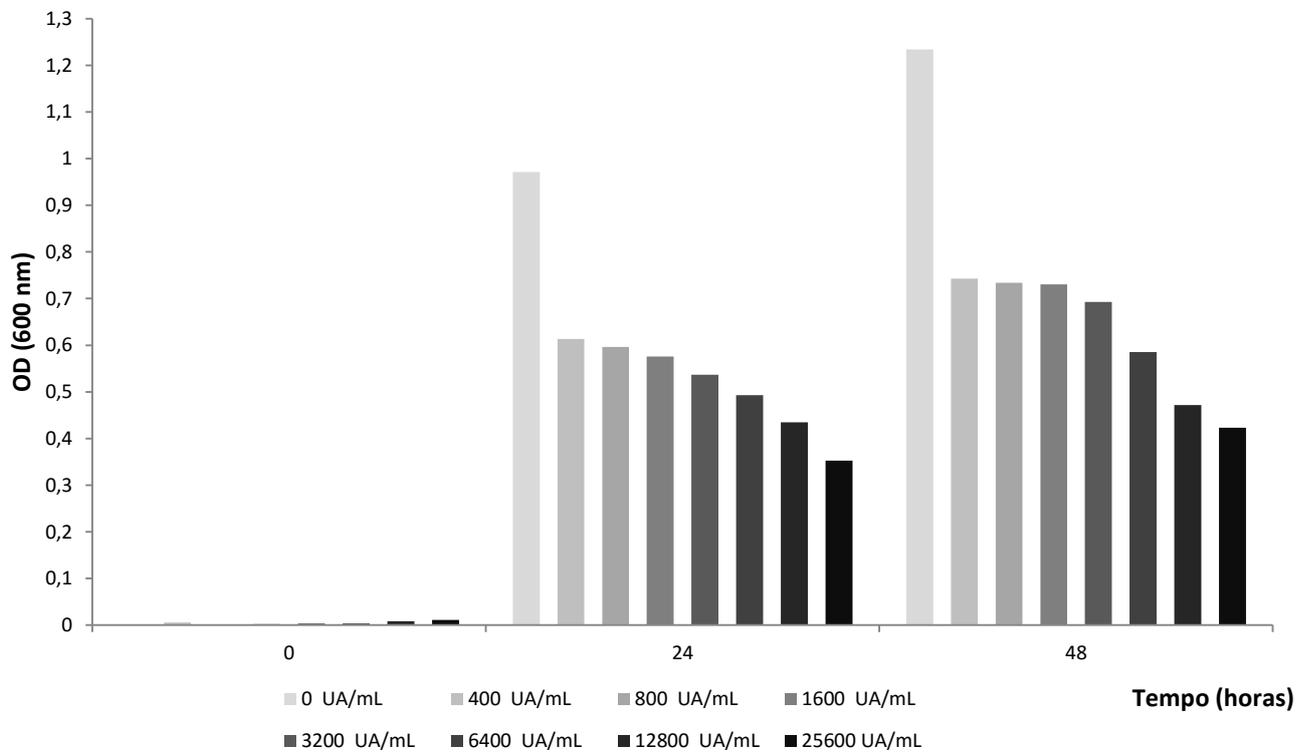


Figura 15 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da *L. monocytogenes* com concentração 10^6 UFC/mL

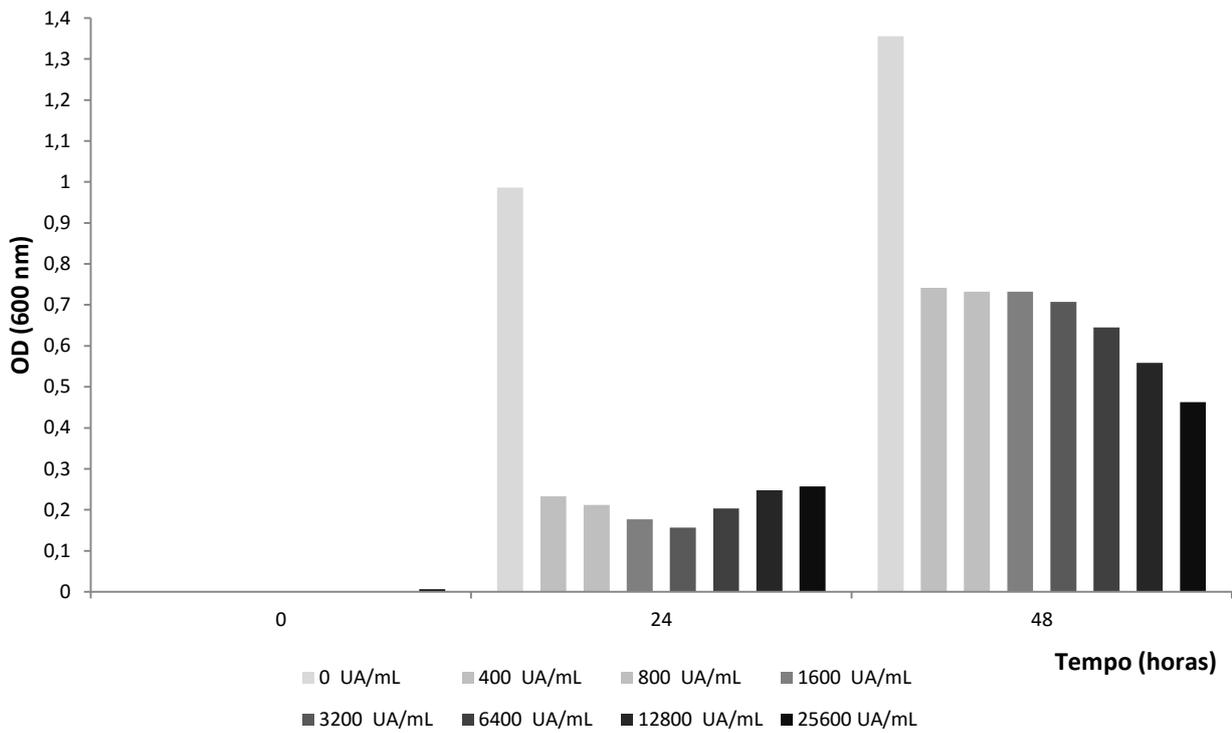


Figura 16 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da *L. monocytogenes* com concentração 10^5 UFC/mL

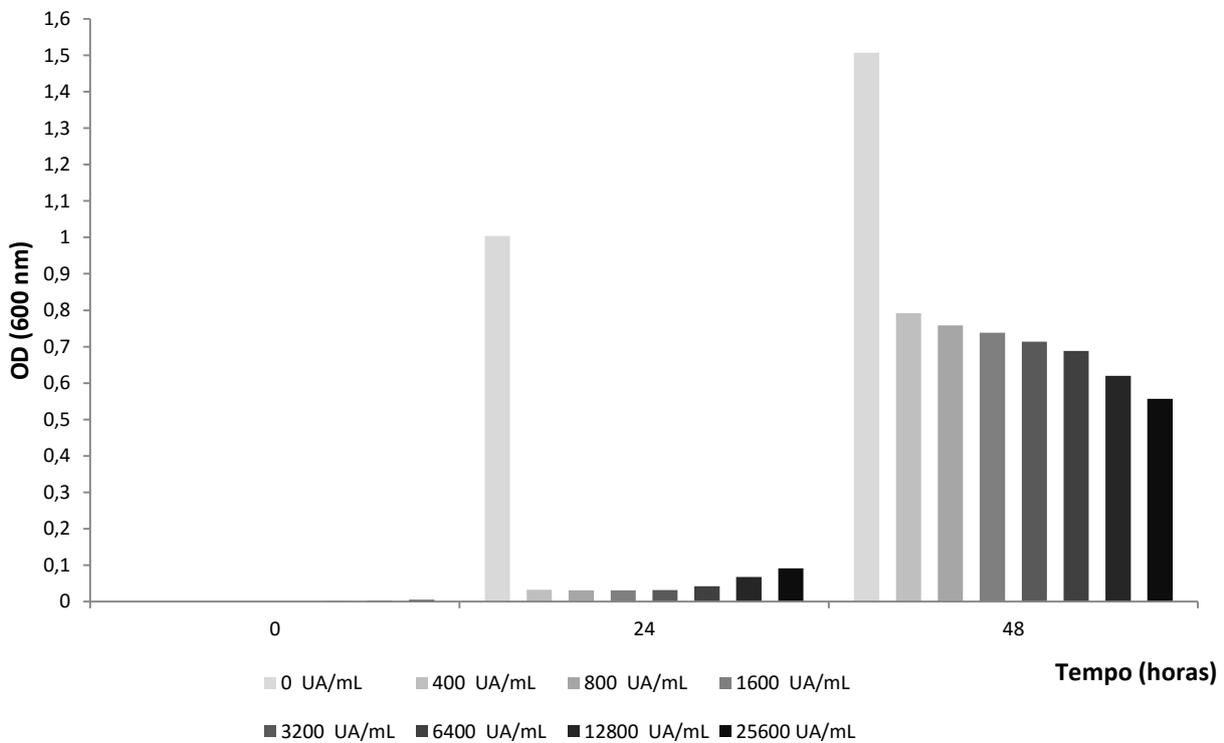


Figura 17 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da *L. monocytogenes* com concentração 10^4 UFC/mL

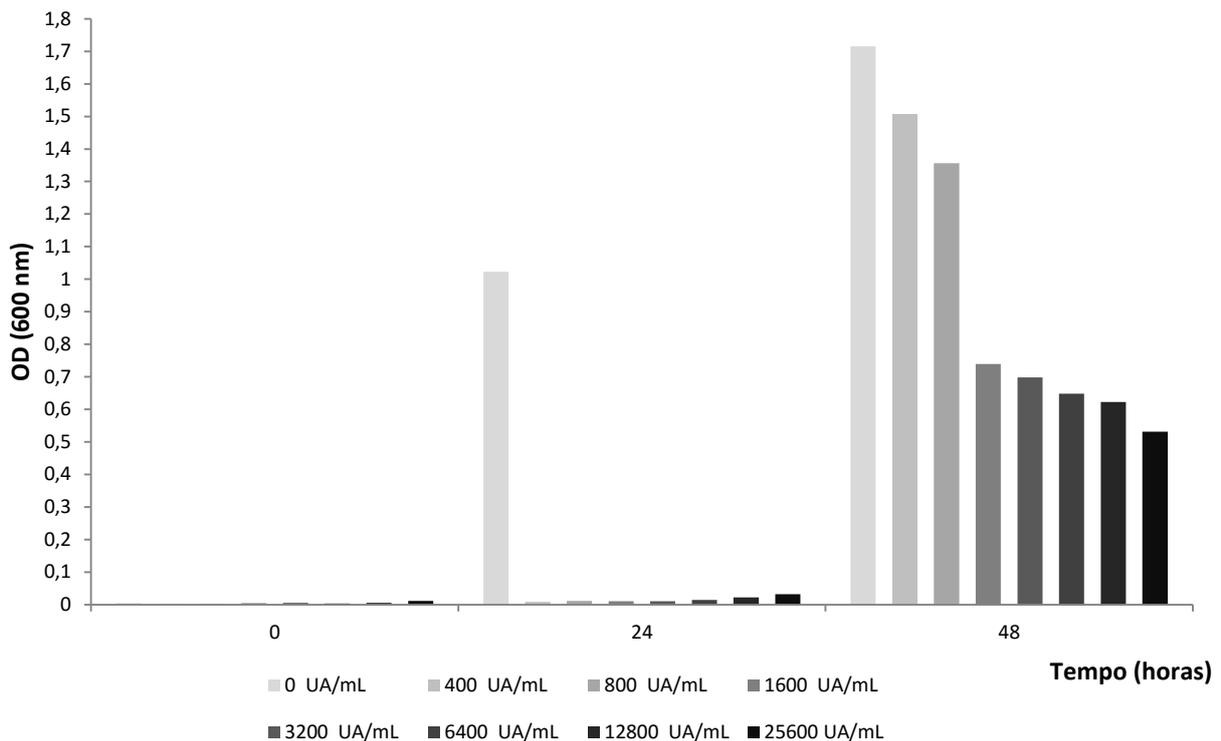


Figura 18 – Efeito da concentração da bacteriocina B391 no crescimento da *L. monocytogenes* com concentração 10^3 UFC/mL

Num estudo semelhante, observou-se o efeito da atividade da bacteriocina R1333 (800 UA/mL), no crescimento da *L. innocua* 2030C e *L. ivannovii* subsp. *Ivannovii* ATCC19119, ambas com concentração inicial de 10^6 UFC/mL. Foi utilizada a O.D. como medida da concentração das células presentes nas culturas. Verificou-se que ao fim de 7 horas, para a *L. innocua* 2030C, a cultura contendo a bacteriocina apresentou uma O.D. de 0.26 e o respetivo controlo de 1.65, para a *L. ivannovii* subsp. *Ivannovii* ATCC19119, no mesmo período, apresentou uma O.D. de 0.45 e o respetivo controlo de 1.7. Em ambos os casos verificou-se que a adição da bacteriocina foi eficaz na inibição das bactérias patogénicas (Todorov *et al.*, 2011).

4.4.3. Estudo da adesão da bacteriocina B391 parcialmente purificada a uma película para embalagens alimentares

Durante o processo de purificação parcial da bacteriocina B391, foram obtidas diferentes frações com atividades diversas consoante a concentração de isopropanol usado na eluição. As frações normalmente com maior atividade são obtidas com 40% (aqui designada fração E3) e 60% (aqui designada fração E4). A fração E4 apresentou apenas uma atividade de cerca de 6% relativamente à atividade da fração E3.

Este ensaio foi executado com base no estudo realizado por Mauriello e seus colaboradores (Mauriello *et al.*, 2004), onde foi estudada a atividade anti-*Listeria* de uma película imersa com uma solução da bacteriocina produzida por *Lactobacillus curvatus* 32Y.

A utilização da fração E3 (Fig. 19) nos estudos de adsorção à película, permitiu demonstrar que esta, após ter sido imersa na solução da fração E3 e posterior secagem antes da devida utilização, obteve uma atividade significativa anti-*Listeria*, verificando-se uma redução da atividade da solução após imersão, em cerca de 50%, perdas originadas pela adsorção da bacteriocina ao filme. Constatou-se ainda que a utilização do filme incubado com bacteriocina provocou a formação de um halo de inibição, em placa de Petri a fração E3, que não era apenas limitado à área da película, indicando uma potencial migração da bacteriocina para o meio de cultura. Comportamento similar foi notado por Mauriello e seus colaboradores (Mauriello *et al.*, 2004) com a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus curvatus* 32Y.

A fração E4 (Fig. 20) foi também testada, no entanto a sua baixa atividade, não permitiu verificar uma ação inibitória significativa da película. Neste caso também não se observou qualquer redução da atividade da solução usada para imersão da película, o que poderá indicar ainda dificuldades de adsorção usando esta fração.



Figura 19 – Atividade anti-*Listeria* do filme contendo bacteriocina parcialmente purificada por cromatografia usando uma coluna SepPack C18 – Fração E3 [eluição com solução de TAA a 25mM e pH 6,5 e 40% (v/v) de isopropanol]



Figura 20 – Atividade anti-*Listeria* do filme contendo bacteriocina parcialmente purificada por cromatografia usando uma coluna SepPack C18 – Fração E4 [eluição com solução de TAA a 25mM e pH 6,5 e 60% (v/v) de isopropanol]

Considerando a redução na atividade da solução usada na incubação da película e a área da mesma, foi possível calcular as unidades arbitrárias da bacteriocina aderida à película imersa na fração E3, obtendo-se 5689 UA/mL por cm² de película.

A solução utilizada na incubação da película (imersa durante 18 horas a 4°C) foi usada para determinar as unidades arbitrárias da atividade antibacteriana, e ainda para o cálculo da concentração de proteína presente, através do método de Lowry. A fração E3 possuía uma concentração proteica de 5,317µg/mL, pelo que se estima que terão sido adsorvidas à película cerca de 71µg/cm² de proteína.

4.4.4. Crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em queijo na presença da bacteriocina B391 parcialmente purificada

Efetuuou-se um ensaio com queijo fresco pasteurizado, inoculado com *L. monocytogenes* B218 com 10^5 UFC/mL na ausência e presença de bacteriocina B391 (tal como descrito em 3.6.2), com o objetivo de verificar qual a influência da mesma no crescimento e viabilidade da bactéria patogénica, obtendo-se os seguintes resultados.

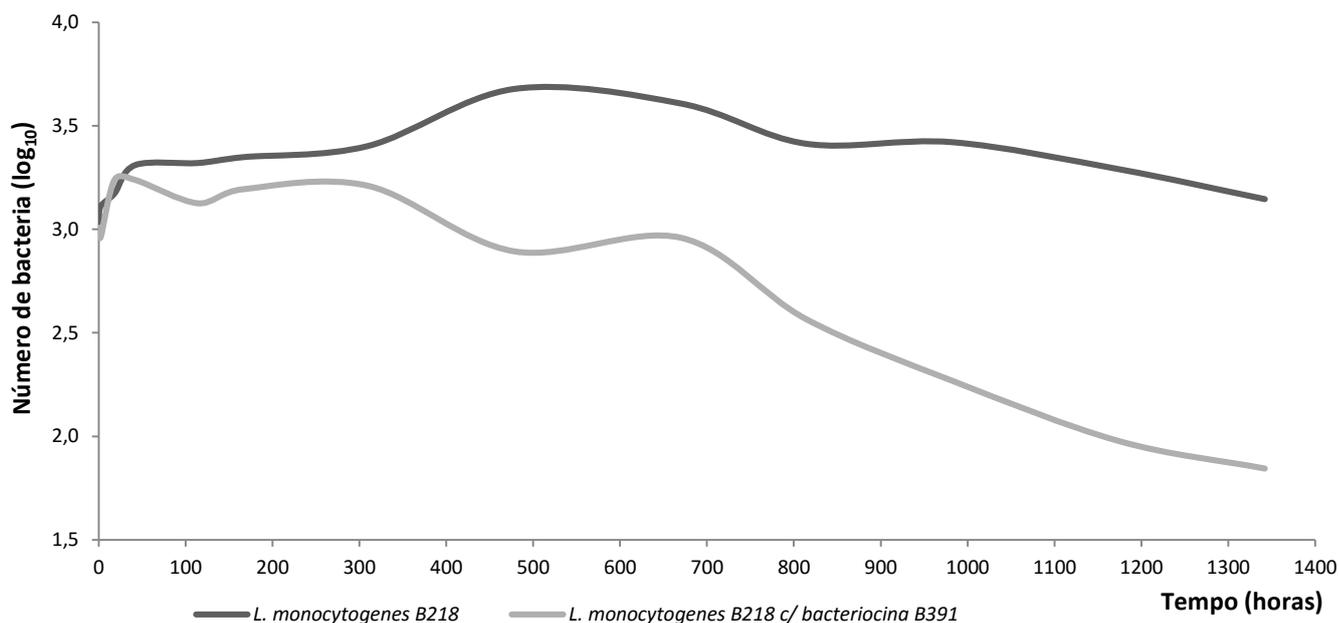


Figura 21 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em queijo fresco a 4°C. Valores obtidos através do cálculo da média das contagens efetuadas, sendo que não se observaram diferenças superiores a 15% entre os duplicados.

Os testes da influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *L. monocytogenes* B218 foram realizados a 4°C, temperatura normalmente usada na armazenagem de um produto perecível como o queijo fresco. Verificou-se uma ação da bacteriocina B391 ao longo de todo o tempo de incubação (cerca de 2 meses), tendo-se constatado de forma clara, não apenas uma inibição no desenvolvimento da *L. monocytogenes* B218 bem como uma evidente redução na sua viabilidade ao longo do tempo, observando-se uma redução na concentração de *L. monocytogenes* B218 em mais de um log. De

notar ainda a utilização, como concentração inicial, uma concentração de *L. monocytogenes* B218 felizmente pouco habitual neste tipo de produtos, sendo bastante superior ao limite legal.

Num estudo realizado por Martinez e colaboradores (Martinez *et al.*, 2015) foi analisado o comportamento da bacteriocina produzida pelo *L. sakei* 2a, em queijo, propositadamente contaminado com dois tipos de *L. monocytogenes*, 4b e 1/2a, à temperatura de 4°C. Durante 28 dias foram recolhidas amostras e ao longo deste período verificou-se que ambas as *L. monocytogenes* sofreram uma diminuição significativa, sendo que ao 28º dia foi registado uma redução de aproximadamente 3 log no caso da *L. monocytogenes* 4b e 2.5 log para a *L. monocytogenes* 1/2a.

4.4.5. Crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em carne de porco fresca na presença de uma película contendo bacteriocina B391 parcialmente purificada

Foi estudado o comportamento da *L. monocytogenes* B218 a 4°C. Após inoculação da carne de porco fresca com a bactéria patogénica foi colocada uma película previamente imersa em bacteriocina B391 parcialmente purificada sob a superfície propositadamente contaminada, como descrito em material e métodos (3.5) e previamente comprovada a eficácia da película como se pôde verificar em 4.4.3.

O presente trabalho foi realizado em duplicado porém em tempos separados e os resultados apresentados individualmente (I e II). Contudo, verificou-se que o comportamento da *L. monocytogenes* B218 foi muito semelhante em ambos os ensaios, como se pode comprovar nas figuras seguintes.

Através da análise dos resultados (Fig. 22 e 23) verificou-se que após 24 horas de incubação houve uma diminuição do número (1 log) de bactérias de *L. monocytogenes* B218, tendo-se a população mantida inalterada após as 48 horas de incubação, o que permitiu constatar que o uso da película previamente imersa em bacteriocina B391 foi eficaz na inibição da *L. monocytogenes* B218.

Este trabalho, tal como já mencionado, foi realizado segundo a metodologia descrita por Mauriello e seus colaboradores (Mauriello *et al.*, 2004), num estudo com vista ao desenvolvimento de filmes de polietileno para embalagens alimentares, utilizando também a carne de porco como matriz. Os resultados obtidos por estes investigadores foram semelhantes aos acima apresentados, pois constataram que as contagens viáveis de *L. monocytogenes* V7 foram menores, em quase 1 log nas primeiras 24 horas de armazenamento a 4°C, quando a carne de porco foi embalada com a película contendo bacteriocina do que quando a carne foi embalada com a película sem qualquer agente antimicrobiano. Convém ainda realçar que tanto no ensaio realizado como no estudo aqui mencionado foi utilizada uma concentração inicial de *L. monocytogenes* bastante elevada em comparação à encontrada habitualmente neste tipo de produtos.

Apesar de os resultados aqui obtidos serem bastante satisfatórios, este método carece de otimização, pelo que estudos complementares deveriam ser efetuados futuramente. Alguns autores testaram o tempo de vida útil da película, e os resultados demonstraram que a atividade anti-*Listeria* era estável ao fim de 4 meses, armazenado a temperatura ambiente (Mauriello *et al.*, 2004). O aumento da concentração da bacteriocina na solução de imersão da película em conjunto com outras substâncias, tais como EDTA, lisozimas, ácido cítrico e ácido láctico pode melhorar o desempenho antimicrobiano da película (Natrajan & Sheldon, 2000). Também a existência de diversos tipos de películas com propriedades diferentes podem eventualmente resultar numa maior capacidade de adsorção da bacteriocina (Mauriello *et al.*, 2004).

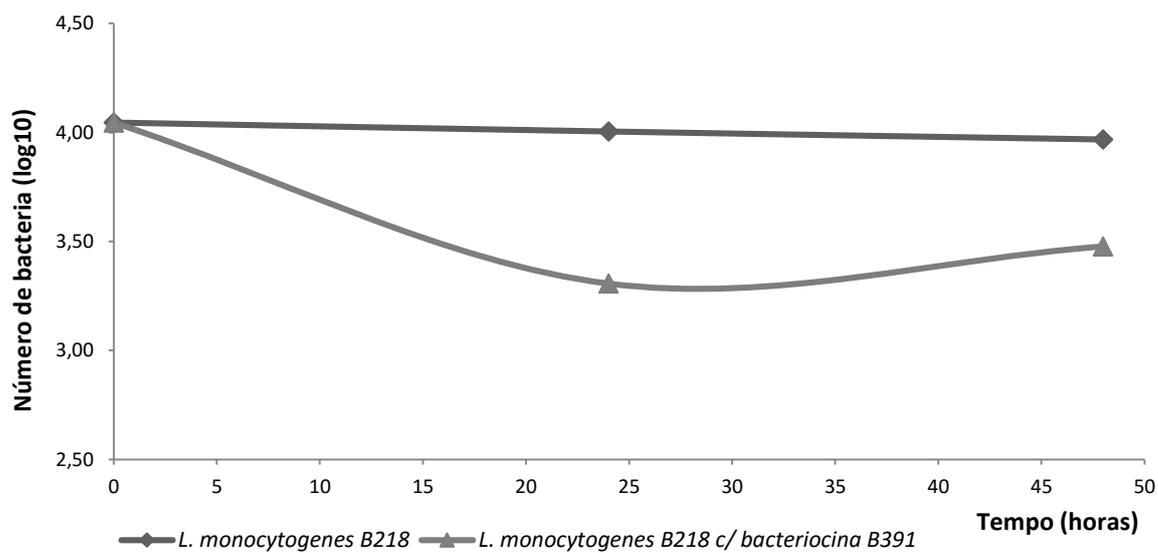


Figura 22 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em carne fresca a 4°C. Ensaio I

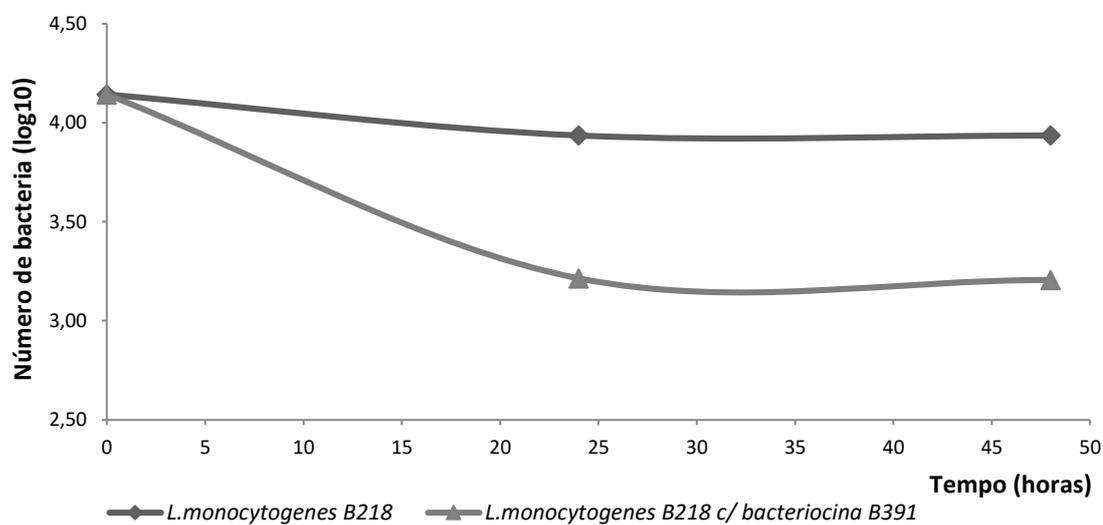


Figura 23 – Influência da bacteriocina B391 parcialmente purificada no crescimento e viabilidade da *Listeria monocytogenes* B218 em carne fresca a 4°C. Ensaio II

5. CONCLUSÃO

O potencial da utilização de bacteriocinas enquanto agentes naturais que ajudam a promover a segurança alimentar, nomeadamente através da inibição do crescimento de microrganismos patogénicos, é imenso, e tal é naturalmente refletido pelo elevado número de estudos que surgem publicados em revistas científicas sobre o isolamento e caracterização de novos peptídeos com atividade antimicrobiana e pelo interesse comercial no desenvolvimento de novas soluções a este nível. No entanto, e apesar de todo o potencial, é absolutamente fundamental e imprescindível uma caracterização cuidadosa e pormenorizada destas moléculas e das estirpes produtoras por forma a garantir os resultados esperados quando as mesmas são aplicadas num alimento específico.

O trabalho desenvolvido e que aqui se apresenta pretende contribuir para uma melhor compreensão dos fatores relacionados com a produção e atuação da bacteriocina B391 (peptídeo previamente identificado no laboratório da UMA) e com isso possibilitar que se equacione num futuro próximo a sua potencial utilização na produção de alimentos e na sua estabilidade microbiológica, através de uma diminuição do risco de crescimento de bactérias patogénicas como a *Listeria monocytogenes*.

Os resultados obtidos experimentalmente permitiram observar que:

- a) a bacteriocina B391 é um pequeno peptídeo com aproximadamente 6 kDa de massa molecular com efeito anti-*Listeria*;
- b) o efeito antimicrobiano da bacteriocina B391 é exercido numa ampla gama de pH, possibilitando assim, a sua utilização direta numa grande variedade de alimentos;
- c) a bacteriocina B391 é extremamente estável ao tratamento térmico, usando temperaturas elevadas, como as temperaturas normalmente usadas para esterilização. No entanto, a sua incorporação em produtos alimentares que necessitem de um tratamento térmico subsequente, apenas deverá ser efetuada, se o pH do mesmo for inferior a 6-7, uma vez que para $\text{pH} \geq 7$ a bacteriocina demonstrou ser termolábil;

- d) a bacteriocina B391 mantém uma razoável estabilidade ao longo do tempo quando armazenada a temperaturas de refrigeração (4°C). A temperaturas próximas da temperatura ambiente (22°C e 30°C), a perda de atividade é muito rápida;
- e) a aplicação da bacteriocina B391 em queijo fresco demonstrou ser promissora. No ensaio realizado verificou-se que esta bacteriocina não só inibiu o desenvolvimento da *Listeria monocytogenes* bem como reduziu claramente a sua viabilidade;
- f) a adsorção da bacteriocina B391 a películas para uso alimentar, abre novas perspectivas relativamente à sua utilização, tendo sido demonstrada a sua eficácia em particular no controlo do crescimento de *Listeria monocytogenes* em carne de porco.

Os estudos efetuados revelam assim, uma potencial e promissora utilização da bacteriocina B391 e eventualmente da sua célula produtora, em produtos alimentares levando a um aumento da segurança desses produtos. Contudo ainda é necessário a realização de estudos adicionais em particular: na caracterização da bactéria produtora, principalmente na existência ou não de fatores de virulência e de genes de resistência a antibióticos; na identificação da bacteriocina, nomeadamente através de microsequenciação para verificar se se trata efetivamente de uma nova molécula; na realização de ensaios complementares com outros filmes/condições para alimentos, que eventualmente poderão ter uma maior capacidade de adsorção da bacteriocina.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abriouel, H., Franz, C. M., Ben Omar, N., & Galvez, A. (2011). Diversity and applications of Bacillus bacteriocins *FEMS Microbiol Rev* (Vol. 35, pp. 201-232). England: 2010 Federation of European Microbiological Societies. Published by Blackwell Publishing Ltd.
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J. G., Lebrihi, A., Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 93-104.
- Aunpad, R., Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr Microbiol*, 55(4), 308-313.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. . In S. Salminen, S. Lahtinen, A. C. Ouwehand & A. V. Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (pp. 30). New York: Marcel Decker.
- Balakrishnan, M., Simmonds, R. S., Tagg, J. R. (2001). Diverse activity spectra of bacteriocin-like inhibitory substances having activity against mutans streptococci *Caries Res* (Vol. 35, pp. 75-80). Switzerland.
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. d. M., Converti, A., Oliveira, R. P. d. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142.
- Barbosa, A. A., Silva de Araujo, H. G., Matos, P. N., Carnelossi, M. A., Almeida de Castro, A. (2013). Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. *Int J Food Microbiol*, 164(2-3), 135-140.
- Bernardi, S., Golineli, B. B., Contreras-Castillo, C. J. (2010). Aspectos da aplicação de culturas starter na produção de embutidos cárneos fermentados. *Braz. J. Food Technol.*, 13(2), 133-140.
- Bosch Gallego, M., Espadaler Mazo, J., Mendez Sanchez, M., Perez Carre, M., Farran Codina, A., Audivert Brugue, S. (2011). [Consumption of the probiotic *Lactobacillus planctarum* CECT 7315/7316 improves general health in the elderly subjects]. *Nutr Hosp*, 26(3), 642-645.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int J Food Microbiol*, 34(1), 1-16.
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., & Campos, C. A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages:

characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci*, 87(4), 321-329.

- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*, 71(1), 1-20.
- Comissão das Comunidades Europeias (2005). Regulamento (CE) N° 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 338.
- Comissão Europeia (2011). Regulamento (UE) N° 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 295.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3(10), 777-788.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058-1071.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol*, 78(1), 1-6.
- EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) (2014). European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12(2).
- EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Center for Disease Prevention and Control). (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1).
- Eijsink, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Holo, H., Nes, I. F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 639-654.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, 55(3), 476-511.
- Fatima, D., Mebrouk, K. (2013). Characterization and determination of the factors affecting anti-listerial bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy milk products. *African Journal of Food Science*, 7(2), 35-44.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of cheese science*: Aspen Publishers.

- Gaamouche, S., Arakrak, A., Bakkali, M., Laglaoui, A. (2014). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(11), 657-666.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120(1-2), 51-70.
- Galvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. B. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 28(2), 125-152.
- González, B., Arca, P., Mayo, B., Suárez, J. E. (1994). Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl Environ Microbiol*, 60(6), 2158-2163.
- Gordon, D., Oliver, E., Littlefield-Wyer, J. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In M. Riley & M. Chavan (Eds.), *Bacteriocins: ecology and evolution* (pp. 5-18): Berlin Springer.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79-97.
- Guerreiro, J., Monteiro, V., Ramos, C., de Melo Franco, B. D., Martinez, R. C., Todorov, S. D. (2014). *Lactobacillus pentosus* B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6(2), 95-104.
- Hajikhani, R., Beyatli, Y., Aslim, B. (2007). Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. *International journal of dairy technology*, 60(2), 105-108.
- Hammami, R., Zouhir, A., Le Lay, C., Ben Hamida, J., Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization *BMC Microbiol* (Vol. 10, pp. 22). England.
- Hammou, F. B., Skali, S. N., Idaomar, M., Abrini, J. (2010). Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6 C. *African Journal of Biotechnology*, 9(8).
- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F., Cenatiempo, Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol*, 138(12), 2725-2731.
- Heng, N., Wescombe, P., Burton, J., Jack, R., Tagg, J. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In M. Riley & M. Chavan (Eds.), *Bacteriocins: ecology and evolution*. (pp. 45-92): Berlin, Springer.
- Holley, R. A., Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.

- Ivanova, I., ADanova, SDousset, X. (2000). 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*, 41, 47–53.
- Jack, RW; Tagg, JR and Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(2), 171-200.
- Karpinski, T. M., Szkaradkiewicz, A. K. (2013). Characteristic of bacteriocines and their application. *Pol J Microbiol*, 62(3), 223-235.
- Lambertz, S. T., Nilsson, C., Bradenmark, A., Sylven, S., Johansson, A., Jansson, L. M. (2012). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *Int J Food Microbiol*, 160(1), 24-31.
- Lee, H., Kim, H. Y. (2011). Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus* *J Microbiol Biotechnol* (Vol. 21, pp. 229-235). Korea South.
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol*, 55(Pt 6), 645-659.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Maqueda, M., Sanchez-Hidalgo, M., Fernandez, M., Montalban-Lopez, M., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria *FEMS Microbiol Rev* (Vol. 32, pp. 2-22). England.
- Martinez, R. C. R., Staliano, C. D., Vieira, A. D. S., Villarreal, M. L. M., Todorov, S. D., Saad, S. M. I. (2015). Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. *Food Microbiology*, 48(0), 143-152.
- Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T., Vederas, J. C. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol Lett*, 317(2), 152-159.
- Mauriello, G., Ercolini, D., La Storia, A., Casaburi, A., & Villani, F. (2004). Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y *J Appl Microbiol* (Vol. 97, pp. 314-322). England.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., Ross, R. P. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2, 299-329.
- Nascimento, M. d. S. d., Moreno, I., Kuaye, A. Y. (2008). Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Braz.J.Food Technol*, 11(2), 120-127.

- Natrajan, N., Sheldon, B. W. (2000). Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella Typhimurium* on fresh broiler skin. *J Food Prot*, 63(9), 1189-1196.
- Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications *Biocontrol Sci* (Vol. 17, pp. 1-16). Japan.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *Int J Food Microbiol*, 81(2), 137-145.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I., Onilude, A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality *Biochimie* (Vol. 84, pp. 593-604). France.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 512-542.
- Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia (2002). Regulamento (CE) Nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 31.
- Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia (2004). Regulamento (CE) Nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139.
- Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia (2008). Regulamento (CE) Nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 354.
- Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P. (2007). *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect*, 40(1), 4-13.
- Riley, M. A., Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application *Annu Rev Microbiol* (Vol. 56, pp. 117-137). United States.
- Ryser, E. T., Marth, E. H. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. CRC Press.

- Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., Oliveira, R. P. d. S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64(0), 527-536.
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 217-226.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N., Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678-683.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.
- Schulz, D., Bonelli, R. R., Batista, C. R. V. (2005). Bacteriocins Produced by *Bacillus* spp. to Conservation and Food Processing (Vol. 16, pp. 403-411): *Alim. Nutr. Araraquara*.
- Schulz, D., Pereira, M. A., Bonelli, R. R., Nunes, M. M., Batista, C. R. V. (2003). BACTERIOCINAS: MECANISMO DE AÇÃO E USO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS. *Alim. Nutr*, 14(2), 229-235.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., Hill, C. (2003). A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 1-9.
- Sousa, L. C. F. S., Sousa, J. S., Borges, M. G. B., Machado, A. V., Silva, M. J. S., Ferreira, R. T. F. V.. (2012). Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos aspectos físico, químico e microbiológico. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 8(1), 19-27.
- Stecchini, M. L., Aquili, V., Sarais, I. (1995). Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis* *Int J Food Microbiol* (Vol. 25, pp. 301-310). Netherlands.
- Suma, K., Misra, M. C., Varadaraj, M. C. (1998). Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int J Food Microbiol*, 40(1-2), 17-25.
- Todorov, S. D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action: producao, organizacao genetica e modo de acao. *Braz J Microbiol*, 40(2), 209-221.
- Todorov, S. D., Dicks, L. M. (2009). Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *Int J Food Microbiol*, 132(2-3), 117-126.
- Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2004). Partial characterization of bacteriocins produced by four lactic acid bacteria isolated from regional South African barley beer. *Annals of Microbiology*, 54(4), 403-413.

- Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40(1), 365-370.
- Todorov, S. D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L. M., van Reenen, C. A., Prevost, H. (2011). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe*, 17(1), 23-31.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J. M., Ivanova, I., Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48(3), 167-177.
- Turovskiy, Y., Kashtanov, D., Paskhover, B., Chikindas, M. L. (2007). Quorum sensing: Fact, fiction, and everything in between *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 62, pp. 191–234). New Jersey: Elsevier Inc.
- Vásquez M, S. M., Suárez M, H., Zapata B, S. (2009). UTILIZACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE. *Revista chilena de nutrición*, 36, 64-71.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, 14(3), 584-640.
- Vera, A., Gonzalez, G., Domínguez, M., Bello, H. (2013). [Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation]. *Revista chilena de infectología: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 30(4), 407-416.
- Yang, R., Johnson, M. C., Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 58(10), 3355-3359.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol*, 5, 241.