

CLÁUDIA VIEIRA PRUDÊNCIO

**INIBIÇÃO DE *Salmonella* Typhimurium POR
BOVICINA HC5 ASSOCIADA A AGENTES
QUELANTES E TENSOATIVOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA – MG
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

CLÁUDIA VIEIRA PRUDÊNCIO

**INIBIÇÃO DE *Salmonella* Typhimurium POR
BOVICINA HC5 ASSOCIADA A AGENTES
QUELANTES E TENSOATIVOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 11 de dezembro de 2009.

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Conselheiro)

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos

Pesq. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof. Sukarno Olavo Ferreira

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos apenas
começando,
A certeza de que é preciso continuar,
E a certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Fazer do medo uma escada,
E fazer do sonho uma ponte.”*

Fernando Sabino

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por ter guiado todos os meus passos ao longo desta jornada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela infraestrutura para realização dos experimentos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha mãe, Maria Zulma, pelas orações, pelo carinho, apoio e incentivo em todas as horas, principalmente nas mais difíceis.

Ao meu pai, José Mauro, pela incalculável confiança depositada em mim e pelo exemplo de vida. Vocês foram fundamentais para essa conquista! Amo muito vocês!

Aos meus familiares, em especial Tia Lá e Tia Nê, pelas brincadeiras nos momentos mais complicados, por entenderem minha ausência nas reuniões de família e pelo auxílio de todas as horas.

Aos amigos, em especial, à Fernanda (Dan), pela preocupação, apoio, confiança e pela curiosidade nas longas conversas, mesmo quando os assuntos eram de alto nível microbiológico!

À professora Maria Cristina, pela orientação, dedicação, incentivo e paciência, especialmente em meus momentos de crise. Aprendi muito com você!

Aos professores Hilário e Tótola, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e sugestões durante os experimentos.

Aos colegas do laboratório de Anaeróbios, pelo auxílio no cultivo do *Streptococcus bovis* HC5 e na extração da bacteriocina.

Ao senhor Monteiro, do laboratório de Ruminantes, pelo auxílio na liofilização dos extratos de bovicina.

À Jaqueline, do laboratório de Genética, pelo auxílio na liofilização das amostras e pelo empréstimo de materiais.

Ao José Maria, pelo auxílio incalculável nas análises estatísticas.

Ao professor Sukarno, pela disponibilidade e sugestões na realização das fotos de microscopia de força atômica.

Aos colegas do laboratório de Alimentos, pelo empréstimo de materiais nos momentos de aperto e por tornarem os momentos no laboratório menos cansativos e mais alegres.

Aos funcionários e estagiários do Departamento, senhor Cesário, José Carlos, Eduardo e Maíra, pelo auxílio na esterilização e lavagem dos materiais.

À Érica, Shisley e Bruna, pelo carinho na acolhida, amizade e por minimizarem as dificuldades do meu retorno a Viçosa. Vocês se tornaram parte da minha família!

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

Biografia

CLÁUDIA VIEIRA PRUDÊNCIO, filha de José Mauro Prudêncio Vieira e Maria Zulma Vieira, nasceu em Janaúba, Minas Gerais, em 30 de abril de 1984.

Em maio de 2002 iniciou o curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se, com louvor, em outubro de 2006.

Em agosto de 2007 iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola no Departamento de Microbiologia na Universidade Federal de Viçosa, na área de Microbiologia de Alimentos.

Sumário

Lista de figuras	ix
Lista de quadros	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
1 – Introdução	01
2 – Revisão de Literatura	03
2.1 – Utilização de bacteriocinas em alimentos	04
2.2 – Uso de bacteriocinas de bactérias gram-positivas em bactérias gram-negativas	07
2.3 – Classificação e estrutura das bacteriocinas	08
2.3.1 – Bacteriocinas de bactérias gram-positivas	08
2.3.2 – Bacteriocinas de bactérias gram-negativas	10
2.4 – Mecanismo de ação das bacteriocinas	10

2.4.1 – Bacteriocinas de bactérias gram-positivas	10
2.4.2 – Bacteriocinas de bactérias gram-negativas	13
2.5 – Bovicina HC5	14
3 – Material e métodos	16
3.1 – Micro-organismos e condições de cultivo	16
3.2 – Preparo e determinação da atividade de bovicina HC5	16
3.3 – Preparo das soluções de agentes quelantes e tensoativos	17
3.4 – Testes de concentração mínima inibitória (CMI)	17
3.5 – Efeito de bovicina HC5 associada a agentes quelantes e, ou tensoativos	18
3.6 – Avaliação da morfologia de células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 tratada com solução de bovicina HC5 e EDTA	19
3.7 – Avaliação da morfologia do envelope celular de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 tratada com solução de bovicina HC5 e EDTA	19
3.8 - Avaliação da perda de potássio de células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA	20
3.9 - Avaliação do efeito bactericida de bovicina HC5 associada ao EDTA em células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	21
3.10 – Análise de dados	21
4 – Resultados e discussão	22
4.1 – CMI dos agentes quelantes	22
4.2 – CMI dos agentes tensoativos	26

4.3 – Efeito de bovicina HC5 associada a agentes quelantes	27
4.4 – Efeito de bovicina HC5 associada a agentes tensoativos	37
4.5 - Morfologia das células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA	37
4.6 - Morfologia do envelope celular das células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA	39
4.7 – Perda de potássio de células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA	45
4.8 – Efeito bactericida de bovicina HC5 associada ao EDTA em células de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	47
5 – Conclusões	49
6 – Referências bibliográficas	50

Lista de Figuras

- Figura 1. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e EDTA ($1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$), incubada a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. 28
- Figura 2. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e citrato de sódio (100 mmol.L^{-1}), incubada a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. 31
- Figura 3. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e dietanolamina (DTA) (50 mmol.L^{-1}), incubada a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. 32
- Figura 4. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e ácido nitrilo-tri-acético (NTA) ($6,25 \text{ mmol.L}^{-1}$), incubada a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. 32

- Figura 5. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e ácido glucônico (100 mmol.L⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 24 horas. 33
- Figura 6. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e fosfato de potássio (100 mmol.L⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 24 horas. 34
- Figura 7. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e acetato de cálcio (12,5 mmol.L⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 24 horas. 35
- Figura 8. Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e ácido láctico (7,0 mmol.L⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 24 horas. 35
- Figura 9. Células de *Salmonella* Typhimurim ATCC 14028 observadas em microscopia de varredura (Aumento de 7000 x). A) em tampão fosfato de sódio; B) em tampão fosfato de sódio acrescido de EDTA (1,6 mmol.L⁻¹) e bovicina HC5 (100 AU.mL⁻¹). 38
- Figura 10. Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 observadas por microscopia de força atômica. Varredura de 2 µm. A) cultivadas em caldo BHI por 24 horas; B) suspensas em tampão fosfato de sódio por 24 horas. 40
- Figura 11. Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium

ATCC 14028 suspensas observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-L-lisina. A) cultivadas em caldo BHI por 12 horas; B) cultivadas em caldo BHI acrescido de bovicina HC5 (100 AU.mL⁻¹) e EDTA (1,6 mmol.L⁻¹) por 12 horas. Varredura de 2 µm. 41

Figura 12. Detalhes da superfície celular de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-L-lisina. A) cultivadas em caldo BHI por 12 horas; B) cultivadas em caldo BHI acrescido de bovicina HC5 (100 AU.mL⁻¹) e EDTA (1,6 mmol.L⁻¹) por 12 horas. Varredura de 2 µm. 42

Figura 13. Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em tampão fosfato de sódio acrescido de bovicina HC5 (100 AU.mL⁻¹) e EDTA (1,6 mmol.L⁻¹) observadas por microscopia de força atômica. A) após 3 horas. Varredura de 2 µm. B) Após 6 horas. Varredura de 2 µm. C) Após 12 horas. Varredura de 5 µm. 43

Figura 14. Perfil topográfico de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetidas a tratamento com bovicina HC5 (100 AU.mL⁻¹) e EDTA (1,6 mmol.L⁻¹) por 12 horas em caldo BHI. 45

Figura 15. Extravasamento de potássio extracelular de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetidas a tratamento com bovicina HC5 (100 AU.mL⁻¹) e EDTA (1,6 mmol.L⁻¹), incubada a 35 ± 2°C por 60 minutos. 46

Figura 16. Contagens de *Salmonella* Typhimurium tratada com

EDTA ($1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$) e bovicina HC5 (50 e 200 AU.mL^{-1}) incubada a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 540 minutos. A linha pontilhada indica o limite de detecção da técnica.

48

Lista de quadros

- Quadro 1. Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com agentes quelantes. 23
- Quadro 2. Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com agentes tensoativos. 27
- Quadro 3. Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 associada a agentes quelantes incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas. 29
- Quadro 4. Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em meio BHI submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 associada a agentes tensoativos incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas. 37

Resumo

PRUDÊNCIO, CLÁUDIA VIEIRA, M Sc. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2009. **Inibição de *Salmonella* Typhimurium por bovicina HC5 associada a agentes quelantes e tensoativos.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Hilário Cuquetto Mantovani e Marcos Rogério Tótola.

Uma das novas estratégias desenvolvidas para conservação de alimentos é a bioconservação e dentro deste conceito, o uso de bacteriocinas se destaca por estas serem consideradas ingredientes naturais dos alimentos. Bactérias gram-negativas, geralmente, são resistentes à ação de bacteriocinas de bactérias gram-positivas por essas serem menos permeáveis pela presença da membrana externa, que atua como uma efetiva barreira. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de bovicina HC5 associada a agentes quelantes ou tensoativos sobre o crescimento de *Salmonella* Typhimurium. O crescimento de *Salmonella* foi avaliado em ensaios em microplacas e por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas. A morfologia das células foi observada em microscopia de varredura e de força atômica e o extravasamento de potássio foi mensurado por espectofotometria de chama. Bovicina HC5 não alterou significativamente o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, mas quando associada a agentes quelantes ou tensoativos inibiu ou reduziu a velocidade de crescimento. A associação de bovicina HC5 com EDTA exerceu maior efeito antimicrobiano, por suprimir o crescimento de *Salmonella* na concentração de 50 AU.mL⁻¹ da bacteriocina.

A associação de bovicina HC5 com os quelantes, dietanolamina, ácido glucônico, ácido nitrilotriacético, ácido láctico e citrato de sódio e com os agentes tensoativos, Tween 80 e ramnolípideo, reduziu a velocidade do crescimento bacteriano. Fosfato de potássio e acetato de cálcio foram os únicos agentes avaliados que não apresentaram efeito antimicrobiano, mesmo associados à bovicina HC5. O tratamento com bovicina HC5, independente da presença de EDTA, ocasionou extravasamento de potássio. Concentrações de 50 AU.mL⁻¹ de bovicina HC5 associada a baixas concentrações de EDTA (1,6 mmol.L⁻¹) exerceram efeito bactericida sobre *Salmonella* Typhimurium com redução de três ciclos logarítmicos no número de células viáveis. Células tratadas com bovicina HC5 e EDTA foram visualizadas por microscopia de força atômica e apresentaram alterações no envelope celular, com redução na altura e aumento nas rugosidades. Estes dados demonstraram a possibilidade de utilização de bovicina HC5 no controle de *Salmonella* Typhimurium desde que associada a substâncias que desestremem a membrana externa.

Abstract

PRUDÊNCIO, CLÁUDIA VIEIRA, M Sc. Universidade Federal de Viçosa, december, 2009. **Inhibition of *Salmonella Typhimurium* by bovicin HC5 associated with chelating agents and surfactants.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee members: Hilário Cuquetto Mantovani and Marcos Rogério Tótola.

One of the new strategies developed to preserve food is bioconservation and within this concept, the use of bacteriocins stands out for these ingredients are considered natural food. Gram-negative bacteria are generally resistant to the action of bacteriocins of gram-positive for these are less permeable due to the presence of the outer membrane, which acts as an effective barrier. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of bovicina HC5 associated with chelating agents or surfactants on the growth of *Salmonella Typhimurium*. In this work, the growth of *Salmonella* was evaluated in tests on microplates and by count of viable number (CFU) on agar plate. The morphology of the cells was observed in scanning electron microscopy and atomic force and leakage of potassium was measured by flame spectrophotometry. Bovicin HC5 did not significantly alter the growth of *Salmonella Typhimurium*, but when combined with chelating agents or surfactants, it promoted inhibition or reduction in growth rate. The association of bovicin HC5 and EDTA exerted greater antimicrobial effect by suppressing the growth of *Salmonella*, even with the

lower concentration of bovicin HC5 that was used, 50 AU.mL⁻¹. The association of bovicin HC5 with chelating agents, diethanolamine, gluconic acid, nitrilotriacetic acid, lactic acid and sodium citrate and the surfactant, Tween 80 and ramnolipid, reduced the growth rate. Potassium phosphate and calcium acetate did not have antimicrobial effect, even associated with bovicin HC5. Treatment with bovicin HC5, regardless of the presence of EDTA, causes leakage of potassium. Concentrations of 50 AU.mL⁻¹ of bovicin HC5 associated with low concentrations of EDTA (1,6 mmol.L⁻¹) exerted a bactericidal effect on *Salmonella* Typhimurium with a reduction of three logarithmic cycles on cell viable number. Cells treated with EDTA and bovicin HC5 and were visualized by atomic force microscopy and showed changes in their cell envelope, with a reduction in height and increase in roughness. These data demonstrated the possibility of using bovicin HC5 in control of *Salmonella* Typhimurium from that associated with substances that dismantled the outer membrane.

1. Introdução

Bactérias gram-negativas representam uma grande preocupação para a indústria de alimentos, devido ao amplo envolvimento das mesmas em doenças relacionadas a alimentos e aos prejuízos decorrentes de sua multiplicação. *Salmonella* sp. é o principal patógeno relacionado a essas doenças, e cujo aumento da incidência é verificado em todo o mundo, mesmo com os avanços das tecnologias de sanitização e conservação de alimentos.

Por outro lado, os consumidores têm pressionado a indústria por produtos mais saudáveis, menos processados e com uma menor quantidade de aditivos químicos. Visando atender essas demandas surgiram as técnicas de bioconservação, com destaque dentro deste conceito para o uso de bacteriocinas.

Entretanto, bactérias gram-negativas, geralmente, são resistentes a ação de bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas. A explicação para esta resistência está relacionada a presença da membrana externa que impede a difusão da bacteriocina até a membrana plasmática, onde exerceria sua ação. Para permitir a utilização desses peptídeos nesse grupo de bactérias, é necessário submetê-las a algum tratamento que desestruture a membrana externa.

A bovicina HC5 é uma bacteriocina recentemente caracterizada, com ação comprovada sobre bactérias gram-positivas e com características desejáveis para utilização em alimentos como estabilidade ao calor e a baixos valores de pH, além de um amplo espectro antimicrobiano.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de bovicina HC5 associada a agentes quelantes e tensoativos sobre o crescimento de *Salmonella enterica* Typhimurium.

2 – Revisão de Literatura

Apesar dos avanços tecnológicos nos processos de conservação de alimentos, a deterioração microbiana ainda ocasiona perdas econômicas significativas e grande aumento nos custos de produção de alimentos (GÁLVEZ et al., 2007). Além disso, os alimentos podem constituir veículos de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. *Yersinia enterocolitica* e estirpes patogênicas de *Escherichia coli* e *Aeromonas hydrophila*, entre outros (JAY, 2005).

Nos alimentos de origem vegetal, a contaminação inicial está estritamente relacionada com a qualidade da matéria-prima, as práticas agrícolas e as condições de colheita e processamento e influencia diretamente a qualidade do produto final (CORBO et al., 2004).

A indústria utiliza diferentes estratégias para reduzir a contaminação dos produtos vegetais, mas a sanitização é, até hoje, a mais usada (CHANG & FANG, 2007). Geralmente, esse processo é realizado com uso de cloro, na forma de hipoclorito de sódio ou de cálcio, devido ao seu baixo custo e a alta solubilidade em água (MACEDO et al., 1999). Geralmente, esse processo é realizado com uso de cloro, na forma de hipoclorito de sódio ou de cálcio, devido ao baixo custo e a alta solubilidade em água (MACEDO et al., 1999). No entanto, o efeito bactericida dessas soluções é limitado (UKUKU et al., 2004; CHANG & FANG, 2007), além disso substâncias cancerígenas, dentre as quais os trihalometanos (THM), são formadas por reações químicas do cloro com a matéria orgânica presente na água

(VILLANUEVA et al., 2001). A preocupação com a presença desses compostos tóxicos gera uma busca intensa por processos alternativos de sanitização (ALLENDE et al., 2008), ao mesmo tempo em que diversos países como Holanda, Alemanha, Suíça e Bélgica proíbem o uso deste sanitizante em linhas de produção, como nas de vegetais minimamente processados (CARLIN & NGUYEN-THE, 1999 *apud* RICO et al., 2007).

Uma das novas estratégias desenvolvidas para conservação de alimentos é a bioconservação, que se refere à utilização de micro-organismos e, ou de seus metabólitos para prolongar a vida de prateleira e aprimorar a segurança dos produtos (SCHNURER & MAGNUSSON, 2005; SETTANNI & CORSETTI, 2008). Dentro deste conceito, o uso de bacteriocinas têm se destacado por estas serem consideradas ingredientes naturais dos alimentos (ALLENDE et al., 2007; SETTANNI & CORSETTI, 2008).

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomicamente (MEGHROUS et al., 1999; HÉCHARD & SAHL, 2002), por bactérias gram-negativas e gram-positivas, liberados no meio extracelular que exercem efeito bacteriostático ou bactericida sobre outras bactérias (MEGHROUS et al., 1999). Pertencem a um grupo heterogêneo de peptídeos com variações no espectro de atividade, propriedades bioquímicas, peso molecular, modo de ação e origem genética (ABEE et al., 1995). São consideradas como conservantes naturais por se evidenciar que estas sejam degradadas pelas proteases gastrointestinais (HOLZAPFEL et al., 1995; ALLENDE et al., 2007), podendo assim, serem utilizadas como estratégia para controle de

micro-organismos patogênicos e deterioradores, sem prejuízos aparentes à saúde do consumidor (ALLENDE et al., 2007).

2.1 – Utilização de bacteriocinas em alimentos

Bacteriocinas apresentam grande potencial para utilização em alimentos e, por serem consideradas conservantes naturais, elas atendem a demanda do consumidor por produtos mais frescos e saudáveis (CORBO et al., 2006; ARTÉS et al., 2007; SETTANNI & CORSETTI, 2008).

Além disso, esses peptídeos apresentam diversas características desejáveis como ausência de toxicidade e atividade contra células eucarióticas, tornarem-se inativas durante a digestão e serem, comumente, estáveis ao calor e a baixos valores de pH (GÁLVEZ et al., 2007). Ressalta-se ainda que várias bacteriocinas foram isoladas de bactérias ácido-láticas presentes em alimentos como carnes e produtos lácteos, sendo consumidas por humanos por centenas de anos (CLEVELAND et al., 2001).

Bacteriocinas têm sido reconhecidas como importante instrumento biológico para aumentar a segurança alimentar e minimizar a incidência de doenças relacionadas a alimentos (DEGAN et al., 2006). Sugere-se que esses peptídeos sejam utilizados como uma barreira adicional na cadeia produtiva e não como um processo primário que substitua uma sanitização eficiente, procedimentos de higiene ou de boas práticas de produção (DEGAN et al., 2006).

Existem várias formas para uso de bacteriocinas em produtos alimentares, a produção *in situ*, em que são acrescidas culturas produtoras de bacteriocinas, ou a aplicação *ex situ*, em que são adicionados suplementos purificados de bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2007). Uma nova estratégia que tem sido pesquisada é a substituição do cloro na sanitização de produtos vegetais utilizando-se bacteriocinas de forma isolada ou associada a outros compostos químicos, como lactato de sódio, ácido láctico, ácido peracético, entre outros (MOLINOS et al., 2005; MOLINOS et al., 2008a; MOLINOS et al., 2008b). Diversos estudos já comprovaram a eficácia de bacteriocinas em modelos alimentares nas diferentes formas de utilização.

O eficácia do uso de culturas bacteriocinogênicas em alimentos de origem vegetal foi comprovada por Trías et al. (2008), que avaliaram o efeito da inoculação de bactérias ácido lácticas em folhas de alface e maçãs intencionalmente contaminadas com *L. monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella* Typhimurium LT2 e *E. coli* ATCC 11775. Esses autores observaram que a adição dessas bactérias reduziu a contagem dos patógenos após dois dias de armazenamento a 25 °C, sendo este efeito mais pronunciado sobre as bactérias gram-positivas. *Pediococcus acidilactici* CCA3 demonstrou potencial conservador para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em couve minimamente processada estocada em condições de abuso de temperatura (COSTA et al., 2009). Nessas condições, os autores observaram que a inoculação da bactéria láctica reduzia o crescimento do patógeno em pelo menos 2,3 ciclos logarítmicos no produto armazenado a 15 °C.

A adição de bacteriocinas diretamente nos produtos alimentares também é efetiva no controle de patógenos. Randazzo et al. (2009) avaliaram o efeito de nisina e de RUC9, uma bacteriocina produzida por *L. monocytogenes* OLM45 na conservação de alface minimamente processado contaminado com *L. monocytogenes* OLM45 ($6 \log_{10}$ UFC g^{-1}) e observaram que ambas as bacteriocinas reduziram o crescimento do patógeno durante os sete dias de estocagem a 4 °C, sendo RUC9 mais eficiente que nisina. Este mesmo efeito não foi observado sobre as contagens de mesófilos, bactérias lácticas, fungos e leveduras, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. (RANDAZZO et al., 2009).

Outro uso potencial das bacteriocinas é na etapa de sanitização dos alimentos vegetais. BENNIK et al. (1999) estudaram a sobrevivência de *L. monocytogenes* inoculada em brotos de feijão sanitizados com munditocina e observaram que a presença da bacteriocina reduzia significativamente o crescimento do patógeno no produto estocado a 8 °C. BARI et al. (2005) avaliaram o efeito de nisina e pediocina associadas a ácido fólico sobre este mesmo micro-organismo em brócolis, repolho e broto de feijão e verificaram que estes tratamentos determinavam reduções significativas nas contagens do micro-organismo nos dois primeiros produtos. Allende et al. (2007) avaliaram este mesmo patógeno em alface e verificaram que a lavagem do vegetal com coagulina (400 AU ml^{-1} , 30 segundos) manteve as contagens do micro-organismo menores que o controle durante cinco dias.

Os resultados destes trabalhos mostram a eficiência de bacteriocinas de bactérias gram-positivas em reduzir o crescimento ou inativar bactérias do mesmo

grupo, reforçando o potencial para utilização desses peptídeos como instrumento para aprimorar a segurança alimentar. O uso de bacteriocinas de bactérias gram-positivas em bactérias gram-negativas também tem sido testado, e observa-se que a utilização de algum aditivo químico desestabilizador da membrana externa permite que esta estratégia seja empregada no controle desse grupo de bactérias (MOLINOS et al., 2008b).

Embora vários trabalhos mostrem o potencial para utilização de diversas bacteriocinas em alimentos a única aprovada, até o momento, legalmente pelo *Food Drug and Administration* (FDA) é a nisina (FEDERAL REGISTRER, 1988), considerada como um aditivo “Geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) e disponível comercialmente sob a forma de NisaplinTM (SETTANNI & CORSETTI, 2008).

2.2 – Uso de bacteriocinas de bactérias gram-positivas em bactérias gram-negativas

Sabe-se que bactérias gram-negativas, geralmente, são resistentes à ação de bacteriocinas de bactérias gram-positivas por essas serem menos permeáveis devido à presença da membrana externa, que atua como uma barreira efetiva (CAO-HOANG et al., 2008). Esta barreira representa uma ferramenta fisiológica importante pela capacidade de impedir a entrada de macromoléculas como bacteriocinas, enzimas e substâncias hidrofóbicas como os antibióticos (ALAKOMI et al., 2000), representando uma vantagem fisiológica deste grupo de bactérias.

As propriedades dessa barreira são amplamente influenciadas pela presença de uma camada de lipopolissacarídeos específicos na superfície da estrutura, cuja integridade afeta significativamente a estabilidade da membrana externa (ALAKOMI et al., 2000). No interior da camada de lipopolissacarídeos existem resíduos negativos oriundos de radicais fosfato e de açúcares do ácido 2-keto-3-deoxioctulosônico (KDO) que são importantes por atuarem como sítios para ligações cruzadas com cátions divalentes, como cálcio e magnésio, que reforçam a estrutura da membrana (ALAKOMI, 2007).

O uso de compostos químicos como quelantes ou de tratamentos brandos como aquecimento e congelamento pode desestruturar essa membrana e reduzir a resistência das bactérias gram-negativas à ação de bacteriocinas (BOZIARIS & ADAMS, 1999). Essa sensibilização é de grande importância na microbiologia de alimentos, uma vez que grande parte dos patógenos relacionados a doenças de origem alimentar são gram-negativos (BOZIARIS & ADAMS, 1999).

2.3 – Classificação e estrutura das bacteriocinas

As bacteriocinas mais estudadas são aquelas produzidas por bactérias ácido-láticas (SETTANNI & CORSETTI, 2008). Geralmente, estes peptídeos são subdivididos em duas classes de acordo com suas características estruturais (HÉCHARD & SAHL, 2002). A classe I é formada por pequenos peptídeos menores que 5 kDa, com 19 a 50 aminoácidos, estáveis ao calor e que são modificados após a tradução com formação de anéis de lantioninas características do grupo como a

lantionina (Lan) e a metilantionina (MeLan) (CLEVELAND et al., 2001; HÉCHARD & SAHL, 2002; DEEGAN et al., 2006). A nisina é a principal representante desta classe (ABEE et al., 1995). Alguns autores consideram uma subdivisão da classe em famílias A e B, a primeira seria composta por peptídeos anfipáticos, alongados, flexíveis e com capacidade para formação de poros, enquanto que a segunda seria formada por peptídeos hidrofóbicos, compactos e globulares, com atividade inibitória sobre enzimas específicas (KRAAIJ et al., 1999).

A classe II é composta por peptídeos com tamanho inferior a 10 kDa, com 20 a 60 aminoácidos, estáveis ao calor, mas que não são modificados após a tradução (HÉCHARD & SAHL, 2002; DEEGAN et al., 2006). Geralmente, esta classe é subdividida em sub-classes: a sub-classe IIa composta por bacteriocinas que demonstram atividade contra *Listeria* e que apresentam um domínio N-terminal comum (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) (ENNAHAR et al., 2000; CINTAS et al., 2001; HÉCHARD & SAHL, 2002; CHEIKHYOUSSEF et al., 2009), a sub-classe IIb, com bacteriocinas formadas por dois peptídeos que atuam sinergicamente e a sub-classe IIc que compreende peptídeos dependentes do sistema *sec* (CINTAS et al., 2001; HÉCHARD & SAHL, 2002). São exemplos destas sub-classes a pediocina PA-1, a sakacina A e P e a leucocina A; a lactacina F e as lactococinas G e F; e a enterocina P e a lactococina 972 respectivamente (CLEVELAND et al., 2001).

Alguns autores consideram a existência das classes III e IV que seriam compostas, respectivamente, por peptídeos grandes e termolabéis e por peptídeos complexos formados pela associação com outras macromoléculas como lipídeos e,

ou carboidratos (MONTVILLE & CHEN, 1998; CLEVELAND et al., 2001; McAULIFFE et al., 2001).

Bacteriocinas, geralmente, apresentam uma estrutura catiônica (NISSEN-MEYER & NES, 1997; MOLL et al., 1999), com grande quantidade de resíduos de lisina e arginina, com propensão a formar uma estrutura de α -hélice (MOLL et al., 1999). Alguns peptídeos formam um anel com pontes de enxofre ou ligações covalentes (MOLL et al., 1999). Apresentam alto ponto isoelétrico, variando entre 8 e 11 (NES et al., 2006), com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, estritamente relacionadas a sua atividade na membrana plasmática (CINTAS et al., 2001). As cargas positivas, possivelmente, facilitam a interação com a parede celular ou com a membrana plasmática, negativamente carregada, devido ao alto conteúdo de fosfolípidos e, enquanto isso, as regiões anfipáticas facilitam a permeabilização na membrana (NISSEN-MEYER & NES, 1997).

Anéis intramoleculares são característicos dos lantibióticos (MOLL et al., 1999), formados pela desidratação de resíduos de serina e treonina, que gera resíduos de dehidroalanina (Dha) e dehidrobutirina (Dhb), sendo que, posteriormente cinco destes resíduos formam ligações tioéter com moléculas de cisteína, constituindo os anéis (BREUKINK & KRUIJFF, 1999).

Algumas variações podem ocorrer, naturalmente, na sequência aminoacídica da mesma bacteriocina. A nisina, por exemplo, é encontrada em duas formas, a nisina A e a nisina Z, que diferem apenas em um único aminoácido na posição 27, a histidina e a asparagina, respectivamente (BAUER & DICKS, 2005).

2.4 – Mecanismo de ação das bacteriocinas

Geralmente, bacteriocinas de bactérias gram-positivas apresentam um mecanismo de ação não-enzimático que causam a despolarização da membrana plasmática e, ou inibem a síntese da parede celular (ABEE et al., 1995).

A nisina, o lantibiótico mais estudado, apresenta um mecanismo de ação que envolve a interação com os precursores do peptidoglicano e, desencadeia a formação de poros transientes na membrana celular, e a dissipação da força próton-motora pela perda de eletrólitos e outros metabólitos (HELANDER & MATTILA-SANDHOLM, 2000).

Inicialmente, há uma interação eletrostática das moléculas da bacteriocina com os lipídeos aniônicos da membrana (DEMEL et al., 1996; NISSEN-MEYER & NES, 1997; BREUKINK & KRUIJFF, 1999). Quantidades acima de 40 % de lipídeos aniônicos, como fosfatidilglicerol, aumentam drasticamente a ligação das moléculas de nisina à membrana, sugerindo que seriam necessárias grandes quantidades destes lipídeos para uma ligação eficiente da bacteriocina (BREUKINK & KRUIJFF, 1999). A região C-terminal teria grande influência nessa ligação, visto que alterações nesta extremidade teriam efeitos severos na interação da bacteriocina com a membrana (BREUKINK & KRUIJFF, 1999). Bactérias gram-positivas possuem um alto conteúdo de lipídeos aniônicos na sua membrana, o que favorece a sensibilidade dessas bactérias à ação das bacteriocinas (MOLL et al., 1999).

A presença de cátions di e trivalentes como cálcio e magnésio reduz a eficiência de formação de poros pelas moléculas de nisina, ao neutralizar as cargas negativas das cabeças polares dos fosfolípidos aniônicos e induzir sua condensação aumentando a rigidez da membrana plasmática (CINTAS et al., 2001).

Bacteriocinas da classe II também dependeriam de fosfolípidos aniônicos para esta interação inicial com a membrana e, por isso, observa-se uma homologia nas sub-classes com aminoácidos positivamente carregados na região C-terminal (MOLL et al., 1999).

Após a ligação superficial, acredita-se que as moléculas de nisina são inseridas na membrana plasmática, um processo fundamental para sua atividade (KRAAIJ et al., 1999). A natureza anfipática da molécula de nisina estabeleceria uma orientação preferencial na interface com a membrana, com a região N-terminal se inserindo mais intimamente (HSU et al., 2002), em um processo dependente de energia (McAULIFFE et al., 2001). O estado de energia das células alvo é crítico para a atividade da nisina, uma vez que esta é necessária tanto para formação quanto para abertura dos poros e seria originada do potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi$) (McAULIFFE et al., 2001).

O papel do lipídeo II seria ancorar a molécula de nisina na membrana, representando um sítio específico para ligação da bacteriocina, que justifica a alta eficiência dos ensaios *in vivo*, em que concentrações nanomolares são capazes de inativar células sensíveis (McAULIFFE et al., 2001; WIEDEMANN et al., 2001; HASPER et al., 2004). Como os peptídeos apresentam um tamanho reduzido, incapazes de penetrar a bicamada mais de uma vez, acredita-se que várias

moléculas se agreguem ancoradas ao lipídeo II para formação dos poros (GUDER et al., 2000).

As sequências de aminoácidos das bacteriocinas permitem a formação de estruturas secundárias típicas de proteínas como folhas- β e α -hélices ao estabelecerem interações com a membrana plasmática (CINTAS et al., 2001). Inicialmente, cada molécula se insere na membrana, seguida das outras moléculas que se agregam e formam uma estrutura de barril, em que as porções hidrofóbicas se voltam para a membrana e as porções hidrofílicas para o interior do canal (CINTAS et al., 2001).

Uma vez inseridas, as moléculas permanecem ligadas a superfície desencadeando uma perturbação local, formando os poros transitórios (GUDER et al., 2000). A ligação ao lipídeo II pelas moléculas de nisina também interfere na biossíntese de peptideoglicano (GUDER et al., 2000).

Com a formação dos poros ocorre um efluxo de metabólitos intracelulares, como potássio e aminoácidos, provocando uma despolarização da membrana, e como consequência, a morte da célula (NES et al., 2006).

Bacteriocinas da sub-classe IIa também exercem atividade bactericida pela formação de poros na membrana plasmática, dissipando a força próton-motora, no entanto sua ação seria mais pronunciada no Δ pH, ao contrário dos lantibióticos que atuam principalmente no potencial elétrico (MONTVILLE & CHEN, 1998).

Lactococina G, uma bacteriocina da sub-classe IIb, também determina a formação de poros na membrana plasmática, e dissipa primariamente o gradiente elétrico, essa seletividade pode ser explicada pela especificidade dos canais que

podem permitir a saída de cátions monovalentes e excluir os prótons (MONTVILLE & CHEN, 1998).

Ao contrário das bacteriocinas de bactérias gram-positivas, os peptídeos produzidos por gram-negativas apresentam um tamanho maior (>20 kDa) e um espectro de ação mais reduzido (NISSEN-MEYER & NES, 1997). As colicinas e microcinas produzidas por bactérias da família *Enterobacteriaceae* representam uma exceção (NISSEN-MEYER & NES, 1997). O mecanismo de ação de bacteriocinas de gram-negativas é mais diversificado e está relacionado à inibição da síntese da parede celular, da atividade de RNase e DNase, além de formação de poros na membrana plasmática (CLEVELAND et al., 2001).

Os lantibióticos da família A, apresentam atividade bactericida sobre várias espécies de bactérias gram-positivas como *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clotridium* e *Staphylococcus* (KRAAIJ et al., 1999). Células de fungos, leveduras e bactérias gram-negativas são resistentes a ação destas bacteriocinas (KRAAIJ et al., 1999). Bactérias gram-negativas, geralmente, são resistentes devido à ação da membrana externa que atua como uma barreira efetiva (GÄNZLE et al, 1999).

Apesar de certas similaridades entre as moléculas de bacteriocinas de uma mesma classe, a susceptibilidade das células alvo é bem variada. Estas variações não se devem apenas a alterações nas moléculas de bacteriocinas, mas também pelas diferenças na composição lipídica nas membranas das células alvo (NISSEN-MEYER & NES, 1997).

2.5 – Bovicina HC5

A bovicina HC5 é uma bacteriocina produzida pela bactéria *Streptococcus bovis* HC5 isolada do rúmen de bovinos cujas propriedades de estabilidade ao calor e a baixos valores de pH mostram o potencial para utilização em alimentos para prevenir a germinação de esporos e o controle de patógenos (MANTOVATI, 2002; HOULIHAN et al., 2004; CARVALHO, 2006). Apresenta uma massa molecular de aproximadamente 2440 Da e uma sequência N-terminal com quatro resíduos de aminoácidos que não correspondem a nenhum dos aminoácidos geralmente encontrados em proteínas (Val-Gly-X-Arg-Tyr-Ala-Ser-X-Pro-Gly-X-Ser-Trp-Lys-Tyr-Val-X-Phe) (MANTOVANI et al., 2002). Estes resíduos estão aproximadamente, nas mesmas posições que os resíduos de dehidroalanina da nisina, epidermina e subtilina, sugerindo que esta bacteriocina seja um lantibiótico (MANTOVANI et al., 2002).

Já foi demonstrada a capacidade de bovicina HC5 de inibir várias bactérias gram-positivas, tanto deterioradoras de alimentos quanto patógenos como *L. monocytogenes* (MANTOVANI & RUSSEL, 2003; CARVALHO et al., 2007; CARVALHO et al., 2008). Mantovani e Russel (2003) avaliaram o efeito de bovicina HC5 sobre *L. monocytogenes* e observaram que esta bacteriocina exercia um efeito bactericida sobre o micro-organismo, sendo este efeito mais pronunciado em pH 5,5. Essa atividade seria ocasionada pela capacidade da bacteriocina translocar potássio pela membrana de células sensíveis (MANTOVANI & RUSSEL, 2008).

Ensaio em alimentos também comprovaram a eficácia de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras, Carvalho et al. (2007) inocularam $6 \log_{10}$ UFC ml⁻¹

de *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63 e LMA72, isolados de polpa de manga deteriorada em polpa de manga juntamente com 100 AU ml^{-1} de bovicina HC5 e observaram redução de três ciclos logarítmicos na população dos isolados *C. tyrobutyricum* LMA63 e LMA72 em pH 4,0 e 5,5.

Carvalho et al. (2008) avaliaram o efeito de bovicina HC5 sobre a viabilidade de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ($5 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$) inoculado em polpa de manga e observaram que a contagem do microrganismo foi mantida abaixo dos limites de detecção entre os valores de pH 4,5 e 7,0. Souza (2008) estudou o efeito de bovicina HC5 sobre esse mesmo patógeno inoculado ($6 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$) em diferentes sucos de frutas e observou que doses de 100 AU ml^{-1} da bacteriocina foram efetivas para reduzir a viabilidade abaixo dos limites de detecção em sucos de abacaxi, uva, manga, maçã e laranja por até 24 horas a $43 \text{ }^\circ\text{C}$. Dados em suco de mamão mostraram resultados semelhantes durante as primeiras 12 horas de incubação, após as quais houve ligeiro crescimento do micro-organismo, que atingiu uma população de aproximadamente $2 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$, sugerindo que a matriz do alimento possa interferir na ação de bovicina HC5 (SOUZA, 2008).

Esta bacteriocina é ainda resistente ao calor ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 minutos), a α -quimiotripsina e a protease K, e estável ao oxigênio, o que facilita sua utilização e lhe confere importantes vantagens para aplicação comercial (CARVALHO, 2006).

3 – Materiais e Métodos

3.1- Micro-organismos e condições de crescimento

Salmonella enterica Typhimurium ATCC 14028 foi cultivada em caldo de cérebro e coração (BHI) a 35 ± 2 °C por um período de 18 a 20 horas. As células foram centrifugadas a 2500 g (Sorvall RT 6000D) e lavadas com solução salina peptonada 0,1 %. *Streptococcus bovis* HC5 foi cultivado conforme metodologia descrita por Mantovani e Russel (2003). *Lactococcus lactis* ATCC 19435 foi cultivado em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 37 ± 1 °C e foi utilizado para determinação da atividade antimicrobiana da bacteriocina.

3.2 - Preparo e atividade de bovicina HC5

Extratos de bovicina HC5 foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Mantovani e Russel (2003). As células de *S. bovis* HC5 em fase estacionária foram centrifugadas a 2500 g e lavadas com tampão fosfato de sódio (5 mmol l^{-1} , pH 6,4). O centrifugado foi ressuspenso em KCl (100 mmol l^{-1}) e o pH ajustado para 2,0. A suspensão foi aquecida a 100 °C por 15 minutos e centrifugada a 2500 g para deposição das células. O sobrenadante foi coletado, liofilizado e ressuspenso em tampão fosfato de sódio (5 mmol l^{-1} , pH 2,0). A atividade antimicrobiana foi avaliada com o indicador *L. lactis* ATCC 19435 pelo método de difusão em ágar detalhado por Tagg et al. (1976), quantificada pelo método de

diluição crítica descrito por Hoover e Harlander (1993) e expressa em unidades arbitrárias (AU ml⁻¹).

3.3 - Preparo das soluções de agentes quelantes e tensoativos

Como quelantes foram utilizados os seguintes compostos químicos: EDTA (Reagen), citrato de sódio (Ecibra), ácido láctico (Vetec), ácido nitrilo-tri-acético (NTA) (Sigma), ácido glucônico (Sigma), dietanolamina (Carlos Erba), acetato de cálcio (Vetec) e fosfato de potássio dibásico (Vetec). As soluções foram esterilizadas por filtração com membranas de poros de 0,2 µm (Millipore®), exceto a solução de EDTA que foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os tensoativos utilizados foram Tween 80 (Sigma) e ramnolipídeo (Jeneil). Essas soluções foram preparadas em água Mili-Q. A concentração micelar crítica (CMC) do ramnolipídeo foi obtida pela construção de uma curva de tensão em tensiômetro Fischer Scientific e esterilizada por filtração. A solução de Tween 80 foi preparada de acordo com dados da CMC obtidos na literatura e esterilizada em autoclave (BECHER, 1966 apud LEE & CHOI, 2001).

3.4 - Testes de concentração mínima inibitória (CMI)

Para determinar o efeito inibitório de cada agente quelante e, ou surfactante utilizado foram realizados testes de concentração mínima inibitória (CMI) por microdiluição. Para preparo do inóculo, a cultura de *Salmonella*

Typhimurium ATCC 14028 foi estriada em ágar para contagem padrão (PCA), incubada a 35 ± 2 °C por 16 a 18 horas e colônias foram suspensas em solução salina 0,85 % até atingir uma densidade equivalente a solução padrão de McFarland 0,5 (CLSI, 2003). A cultura foi inoculada em caldo Mueller-Hinton acrescido do agente quelante ou tensoativo testado. Foram avaliadas as seguintes concentrações de cada agente: EDTA (1,6 a 100 mmol^{-1}), ácido glucônico e citrato de sódio (12,5 a 800 mmol^{-1}), ácido nitrili-tri-acético (NTA), dietanolamina, acetato de cálcio e fosfato de potássio (6,25 a 400 mmol^{-1}), ácido láctico (7,0 a 450 mmol^{-1}) e os tensoativos Tween 80 e ramnolípideo (0,5 a 5,0 vezes a CMC). Alíquotas de $125 \mu\text{l}^{-1}$ do caldo nutriente foram distribuídas em poços de microplacas de 96 poços, seguindo-se a incubação a 35 ± 2 °C. O crescimento foi acompanhado por leitura de absorvância em leitora de microplacas (Thermo Plate, modelo TP-Reader) a 630 nm em diferentes intervalos de tempo durante um período de 16 a 20 horas.

3.5 - Efeito da bovicina HC5 associada a agentes quelantes e, ou tensoativos

Para avaliar o efeito da ação antimicrobiana da bovicina HC5 associada a agentes quelantes e, ou tensoativos foram realizados ensaios em microplacas. A cultura de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, previamente ativada em caldo BHI por 18 a 20 horas, lavada em solução salina peptonada 0,1 %, ressuspensa em 5 ml e diluída 40 vezes, foi inoculada em BHI acrescido do agente quelante ou tensoativo e de bovicina HC5. As concentrações de agentes quelantes e, ou tensoativos utilizadas eram no mínimo, duas vezes menores que a CMI, ou quando

esta não pode ser determinada, foi selecionada uma concentração do agente que não reduzisse significativamente a velocidade de crescimento do microrganismo. Foram avaliadas quatro concentrações de bovicina HC5: 50, 100, 150 e 200 AU ml⁻¹. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C e o crescimento avaliado por leituras de absorvância a 630 nm (Thermo Plate, modelo TP-Reader) em diferentes intervalos de tempo, por um período de 48 horas.

3.6 Avaliação da morfologia de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 tratada com solução de bovicina HC5 e EDTA

Para avaliar possíveis alterações na morfologia, células de *Salmonella* Typhimurium foram observadas por microscopia de varredura. Para o preparo das lâminas, a cultura foi previamente ativada em caldo BHI (18 a 20 horas, 35 ± 2 °C), centrifugada a 2500 g por 10 minutos, lavada três vezes em tampão fosfato de sódio (50 mmol l⁻¹, pH 6,5), suspensa em 2 ml de tampão fosfato de sódio (50 mmol l⁻¹, pH 6,5), acrescido de EDTA (1,6 mmol l⁻¹) e de bovicina HC5 (100 AU ml⁻¹) e incubada a 35 ± 2 °C por 24 horas. Como controle foram observadas células suspensas em tampão fosfato de sódio (50 mmol l⁻¹, pH 6,5).

Após 24 horas de incubação, foram retiradas alíquotas de 500 µl e centrifugadas a 5000 g. As células foram espalhadas em cupons de poliestireno (0,5 cm x 0,5 cm) previamente esterilizados e secas ao ar em capela de fluxo laminar. Os cupons foram então enxaguados em tampão fosfato de sódio (100 mmol l⁻¹, pH 6,8) e as células fixadas por uma hora em solução de glutaraldeído 5 %. Após a fixação,

os cupons foram lavados em tampão fosfato de sódio (50 mmol l^{-1} , pH 6,8) por 10 minutos por seis vezes consecutivas. Foi realizada desidratação em etanol a 35 e 50 % por 10 minutos. Em seguida os cupons foram deixados em etanol 70 % a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Foram realizadas etapas de desidratação em etanol por 10 minutos a 80 e 95 % e três etapas consecutivas em etanol a 100 %. Logo depois foi feita a secagem ao ponto crítico (Bal-Tec CPDO 30) e metalização (Spietter Coater SCD 010 da Balzers). A observação foi feita em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP).

3.7 - Avaliação da morfologia do envelope celular de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 tratada com solução de bovicina HC5 e EDTA

Para verificar a ocorrência de alterações no envelope celular de *Salmonella* Typhimurium as células foram observadas por microscopia de força atômica (NT-MDT, Ntegra Prima, Rússia). Para o preparo das amostras, a cultura foi previamente ativada em caldo BHI (18 a 20 horas, $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), centrifugada a 2500 g por 10 minutos e lavada com tampão fosfato de sódio (50 mmol l^{-1} , pH 6,5) por três vezes consecutivas. O centrifugado foi ressuscitado em tampão fosfato de sódio (50 mmol l^{-1} , pH 6,5) ou em caldo BHI, acrescido de EDTA ($1,6 \text{ mmol l}^{-1}$) e de bovicina HC5 (100 AU/ml) e incubado a $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Como controle foram avaliadas células ressuscitadas apenas em tampão fosfato de sódio (50 mmol l^{-1} , pH 6,5) e em caldo BHI. Em diferentes intervalos de tempo, alíquotas de $500 \text{ }\mu\text{L}$ foram retiradas, centrifugadas a 5000 g , e ressuscitadas em $100 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio

(50 mmol l⁻¹, pH 6,5). As células foram espalhadas em lâminas de vidro (1 cm x 1 cm), previamente esterilizadas, e secas ao ar em capela de fluxo laminar. As medidas de topografia foram realizadas utilizando-se o microscópio em modo intermitente.

Para melhorar a adesão das células algumas lâminas foram previamente mergulhadas em solução de poli-L-lisina por cinco minutos e secas a 25 °C por uma noite antes do preparo.

3.8 - Avaliação da perda de potássio de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA

Para verificar o extravassamento de potássio intracelular, células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 previamente ativadas em caldo BHI (18 a 20 horas, 35 ± 2 °C) foram lavadas e suspensas em tampão fosfato de sódio (pH 6,5, 5 mmol⁻¹) numa densidade de 5 log UFC ml⁻¹, acrescido de bovicina HC5 (100 AU ml⁻¹) e EDTA (1,6 mmol⁻¹). Em diferentes intervalos de tempo foram retiradas alíquotas de aproximadamente 5 ml, que foram filtradas (Millipore®, membranas de 0,22 µm), e armazenadas em tubos previamente lavados com ácido e esterilizados. O conteúdo de potássio foi mensurado por espectrofotômetro de chama Caring modelo 400, após devida calibração do equipamento (MINAHK et al., 2000).

3.9 Avaliação do efeito bactericida de bovicina HC5 associada ao EDTA em células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

Para avaliar o efeito de bovicina HC5 associada ao EDTA sobre a viabilidade de *Salmonella* Typhimurium, a cultura ATCC 14028 foi previamente ativada em caldo BHI (18 a 20 horas, 35 ± 2 °C) lavada em salina peptonada 0,1 % e suspensa em caldo BHI, acrescido de EDTA ($1,6 \text{ mmol}^{-1}$) e bovicina HC5 (50 e 200 AU ml^{-1}), numa densidade de 5 Log UFC ml^{-1} . Em diferentes intervalos de tempo, foram coletadas alíquotas, que foram plaqueadas em ágar para contagem padrão (PCA), inicialmente pela técnica de microgotas e a partir de 180 minutos pela técnica de espalhamento para os tratamentos contendo bovicina HC5 e EDTA. As placas contendo microgotas foram incubadas a 25 ± 2 °C, overnight, e a 35 ± 2 °C por um período de 2 a 6 horas. As placas de espalhamento foram incubadas diretamente a 35 ± 2 °C por um período de 24 horas.

3.10 - Análise de dados

Cada experimento foi executado duas vezes com, no mínimo, três réplicas. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAEG, versão 9.1, 2007 (Universidade Federal de Viçosa, 2007). Foram utilizados os testes de análise de variância e de Tukey ou Dunnett's para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos e o grupo controle. Foi adotado um nível de significância de 0,05.

4 – Resultados e discussão

4.1 – Testes de CMI

4.1.1 – Agentes quelantes

A velocidade específica de crescimento de *Salmonella* Typhimurium variou conforme o agente quelante utilizado (Quadro 1). O EDTA apresentou maior efeito antimicrobiano e inibiu o crescimento do micro-organismo em concentrações mais baixas que os demais agentes utilizados (Quadro 1). A CMI foi de 12 mmol^{-1} e em concentrações inferiores a mesma, as velocidades de crescimento foram alteradas de maneira significativa pelo uso desse quelante ($p < 0,05$) (Quadro 1). O efeito antibacteriano do EDTA havia sido observado em outros trabalhos, como o de Hansen et al. (2001) que constataram que a existência de uma ação sinérgica entre a protamina, um peptídeo antimicrobiano extraído de vertebrados, e EDTA e verificaram que $0,9 \text{ mmol l}^{-1}$ do quelante inibia o crescimento de *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Bacillus thermosphacta* ATCC 11509, *Lactobacillus sake* 1T18, *Listeria innocua* ATCC 51742, *A. hydrophila* ATCC 35654, *Serratia putrefaciens* ATCC 8071 e *Aeromonas salmonicida* 80204. Esse mesmo efeito não foi observado nas bactérias gram-negativas *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922, *Morganella morganii* ATCC 25830, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Serratia liquefaciens* 2R4, *Hafnia alvei* S24 e *Y. enterocolitica* ATCC 35669 (HANSEN et al., 2001).

Quadro 1: Velocidade específica $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$ de crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetida a tratamento com agentes quelantes.

Concentração (mM)	Acetato de Cálcio	Fosfato de potássio	Ácido Glucônico	Citrato de Sódio	EDTA	DTA	NTA
0	0,75 ^a	0,85 ^a	0,61 ^a	1,01 ^a	0,99 ^a	0,52 ^a	1,56 ^a
1,6	ND	ND	ND	ND	0,57 ^b	ND	ND
3,2	ND	ND	ND	ND	0,63 ^b	ND	ND
6,25	0,66 ^a	0,87 ^a	ND	ND	0,64 ^b	0,39 ^a	1,10 ^a
12,5	0,66 ^a	0,84 ^a	0,91 ^a	0,95 ^a	0	0,45 ^a	0,85 ^a
25	0,48 ^a	0,83 ^a	0,84 ^a	0,88 ^a	0	0,56 ^a	0,81 ^a
50	0,60 ^a	0,80 ^a	0,94 ^a	0,80 ^a	0	0,53 ^a	0,55 ^a
100	0,47 ^b	0,70 ^b	0,92 ^a	0,88 ^a	0	0,27 ^b	0
200	0,22 ^c	0,35 ^c	0,58 ^b	0,51 ^b	ND	0	0
400	0,17 ^c	0,43 ^c	0,54 ^b	0,43 ^b	ND	0	0
800	ND	ND	0,61 ^b	0	ND	ND	ND

DTA – Dietanolamina; NTA – Ácido Nitrilo-tri-acético; ND – Não determinado. As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Lappe et al. (2009) observaram que a adição de 20 mmol^{-1} de EDTA reduziu significativamente o crescimento de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 quantificado por meio de leitura de absorvância a 600 nm em água peptonada 0,1 %. Estes mesmos autores confirmaram o efeito bactericida do quelante pela contagem de colônias em placas e observaram que o tratamento com 20 mmol^{-1} de EDTA reduziu as contagens de colônias em 1,77 ciclos logarítmicos, e que esse efeito era maior com o aumento da concentração, com reduções de 2,27 e 2,47 ciclos logarítmicos nos tratamentos com 50 e 100 mmol^{-1} , respectivamente.

Detalhes do mecanismo de ação do EDTA sobre as membranas celulares, particularmente sobre a membrana externa de células gram-negativas ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que há uma desestruturação, pelo menos parcial, da camada de lipopolissacarídeos (ALAKOMI, 2007), possivelmente devido a ligação aos íons cálcio e magnésio que estabeleceriam ligações cruzadas com os resíduos

de açúcares e radicais fosfato, no interior do core citoplasmático, que reforçariam a estrutura (ALAKOMI et al., 2003; BRANEN & DAVIDSON, 2004; ALAKOMI, 2007).

O efeito antimicrobiano demonstrado pela dietanolamina (DTA) sobre *Salmonella* Typhimurium foi limitado e a CMI foi de 200 mmol⁻¹ (Quadro 1). Em valores inferiores a CMI, a velocidade de crescimento reduziu significativamente na concentração de 100 mmol⁻¹ (p<0,05).

Ácido nitrilo-tri-acético e ácido láctico suprimiram o crescimento de *Salmonella* Typhimurium com concentrações de 100 e 112,5 mmol⁻¹, respectivamente (Quadro 1 e 2). Juntamente com acetato de cálcio e dietanolamina estes foram os agentes que promoveram maior redução na velocidade de crescimento de *Salmonella* Typhimurium, menores apenas que aquelas observadas com o uso de EDTA.

O efeito bactericida do ácido láctico é associado à redução do pH extracelular e, principalmente, a inibição metabólica das moléculas não-dissociadas que penetram na célula (ANANG et al., 2007). A dissociação das moléculas do ácido no meio intracelular desencadeia a liberação de prótons e, como consequência, a acidificação do citoplasma (GEORGE et al., 2008). Para garantir a manutenção do pH intracelular próximo a neutralidade, as células têm grande gasto de energia, o que afeta as reações metabólicas celulares, promovendo a extensão da fase lag de crescimento (GEORGE et al., 2008). Concentrações de 6,3; 8,6 e 0,6 g l⁻¹ foram suficientes para inibir, respectivamente, o crescimento de *L. innocua*, *L. ivanovii* e *P. aeruginosa* (NAKAI & SIEBERT, 2004). No presente estudo, *Salmonella* Typhimurium foi inibida por concentrações de 112,5 mmol⁻¹, maiores do que

aquelas observadas para *P. aeruginosa* por Nakai e Siebert (2004) possivelmente devido a correção do pH externo utilizada pelos outros autores que influencia na quantidade de moléculas não-dissociadas presentes no meio extracelular e, conseqüentemente, na efetividade do agente.

Quadro 2: Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetida a tratamento com ácido láctico.

Concentração (mM)	Ácido Láctico
0	0,65 ^a
7,0	1,29 ^a
14,0	1,11 ^a
28,12	0,78 ^a
56,25	1,21 ^a
112,5	0
225,0	0
450,0	0

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ácido nitrilo-tri-acético é um ácido carboxílico utilizado como quelante de diversos metais como alumínio, cobre, cálcio e ferro (SKRZYPCZAK-JANKUN et al., 1994). A atuação deste agente seria semelhante a do EDTA, em que a ligação aos íons presentes no interior da membrana externa, desencadearia uma desestabilização da estrutura por remover parte da camada de LPS (VAARA, 1992), embora Alakomi et al. (2006) tenham estudado o efeito de NTA na desestabilização

da membrana de *Pseudomonas* sp. e *Stenotrophomonas nitritireducens* e observado que este agente atuaria apenas fracamente neste processo.

Citrato de sódio, ácido glucônico e fosfato de potássio tiveram uma ação inibitória semelhante ($p < 0,05$) e, entre os quelantes avaliados, foram aqueles que apresentaram menor efeito. Destes, apenas o citrato de sódio foi capaz de inibir o crescimento de *Salmonella* Typhimurium na concentração de 800 mmol^{-1} . Nas concentrações de 200, 400 e 800 mmol^{-1} foi observada uma redução significativa na velocidade específica de crescimento ($p < 0,05$) (Quadro 1).

Citrato de sódio é um sal de ácido orgânico cujo mecanismo de ação seria semelhante aquele descrito anteriormente para o ácido láctico, em que as moléculas não dissociadas do ácido permeariam a membrana plasmática, dissociando-se no meio intracelular, acidificando o citoplasma (LONG & PHILLIPS, 2003). Blaszyk e Holley (1998) avaliaram o efeito desse quelante sobre várias bactérias patogênicas e deterioradoras e verificaram que a adição de 0,2 ou 0,4 % do composto não reduzia o crescimento de *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Brochothrix thermosphacta*, um efeito contrário era observado sobre *L. sake*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*. Concentrações de 25 mg ml^{-1} de citrato de sódio apresentaram efeito bactericida em linhagens de *S. aureus* e *Enterococcus faecium* (LEE et al. 2001). A sensibilidade de bactérias gram-negativas ao citrato de sódio também foi investigada. Concentrações de 20 mmol^{-1} não exerceram efeito bactericida ou bacteriostático sobre *E. coli* ATCC 25922, que alcançava população máxima (densidade óptica 1,0) em cerca de 5 horas de incubação a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (BOZIARIS & ADAMS, 1999). Efeito contrário, foi observado por

Long e Phillips (2003) que verificaram que soluções de lavagem contendo 2 % de citrato de sódio (p/v) reduziam as contagens de *Arcobacter butzleri* em um ciclo logarítmico após seis dias de incubação a 5 °C em carne de frango.

Lembra-se que a utilização de citrato como fonte de energia é documentada para várias bactérias como *Leuconostoc* sp. (BLASZYK & HOLLEY, 1998), *L. lactis* (HUGENHOLTZ et al., 1993), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* (REA & COGAN, 2003) e *E. coli* (HARNETT et al., 1996), permitindo que estas tenham o crescimento estimulado na presença deste agente, como comprovado para *L. mesenteroides* (BLASZYK & HOLLEY, 1998).

O ácido glucônico é um ácido orgânico utilizado como aditivo alimentar com funções de regulador de acidez e agente quelante (HUANG et al., 2007) e, assim como fosfato de potássio, acredita-se que poderia atuar na ligação a algum íon de fundamental importância para manutenção da estrutura da membrana externa, embora não tenham sido encontrados trabalhos na literatura que descrevam essa atuação.

4.1-2 – Agentes Tensoativos

Os tensoativos ramnolípídeo e Tween 80 utilizados neste estudo não suprimiram o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, mesmo em doses superiores a concentração micelar crítica (CMC), ou seja, quando o tensoativo já é capaz de formar micelas (Quadro 3). Observou-se que tanto ramnolípídeo quanto Tween 80 apenas reduziram, significativamente, a velocidade específica de

crescimento nas concentrações de 2,3 e 4 vezes a CMC. Contrariamente, na maior concentração utilizada, ou seja, cinco vezes a CMC, a velocidade de crescimento de *Salmonella* Typhimurium foi idêntica a do controle (Quadro 3). Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Beuchat e Scouten (2004), que avaliaram a sobrevivência de *Salmonella* Poona submetida a tratamentos com diferentes concentrações de Tween 80 e observaram que mesmo em concentrações altas como 1 %, a contagem do micro-organismo após 24 horas de incubação não diferia significativamente do controle.

Quadro 3: Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetida a tratamento com agentes tensoativos.

Concentração (x CMC)	Ramnofípideo	Tween 80
0	0,49 ^a	0,52 ^a
0,5	0,44 ^a	0,48 ^a
1,0	0,48 ^a	0,44 ^a
2,0	0,41 ^b	0,40 ^b
3,0	0,42 ^b	0,37 ^b
4,0	0,31 ^b	0,32 ^b
5,0	0,47 ^a	0,51 ^a

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2 – Efeito de bovicina HC5 associada a agentes quelantes e tensoativos

4.2.1 – Agentes quelantes

Concentrações de até 200 AU ml⁻¹ de bovicina HC5 não alteraram significativamente o crescimento de *Salmonella* Typhimurium ($p > 0,05$), mas quando associada a agentes quelantes constatou-se uma inibição ou uma redução na velocidade específica de crescimento (Quadro 4).

Quadro 4: Velocidade específica de crescimento μ (h⁻¹) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 associada a agentes quelantes incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

Agentes quelantes (mmol ⁻¹)	$\mu - h^{-1}$				
	Concentração de bovicina HC5 (AU ml ⁻¹)				
	0	50	100	150	200
Ácido nitrilo-tri-acético (6,25 mmol ⁻¹)	^a 0,78 ^{AB}	^b 0,55 ^{AB}	^b 0,49 ^{AB}	^b 0,46 ^A	^b 0,45 ^{AB}
Ácido láctico (7,0 mmol ⁻¹)	^{ab} 0,77 ^{AB}	^{ab} 0,64 ^{AB}	^{ab} 0,63 ^{AB}	^b 0,51 ^A	^b 0,47 ^{AB}
Acetato de cálcio (12,5 mmol ⁻¹)	^a 0,73 ^{AB}	^a 0,57 ^{AB}	^a 0,67 ^{AB}	^a 0,60 ^A	^a 0,55 ^{AB}
Dietanolamina (50 mmol ⁻¹)	^a 0,71 ^B	^b 0,42 ^B	^b 0,38 ^{AB}	^b 0,47 ^A	^b 0,40 ^B
Citrato de sódio (100 mmol ⁻¹)	^a 0,83 ^{AB}	^b 0,55 ^{AB}	^c 0,32 ^B	^d ND ^B	^d ND ^C
Ácido Glucônico (100 mmol ⁻¹)	^a 0,94 ^{AB}	^b 0,67 ^{AB}	^b 0,68 ^{AB}	^b 0,61 ^A	^b 0,61 ^{AB}
Fosfato de potássio (100 mmol ⁻¹)	^{ab} 0,84 ^{AB}	^b 0,63 ^{AB}	^{ab} 0,66 ^{AB}	^{ab} 0,65 ^A	^{ab} 0,66 ^{AB}

NOTA: ND: não determinado. A - C. As médias seguidas por uma mesma letra dentro de uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. a - c. As médias seguidas por uma mesma letra dentro de uma mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Na presença de 1,6 mmol⁻¹ de EDTA bovicina HC5 inibiu completamente o crescimento de *Salmonella* Typhimurium durante as 48 horas de incubação, mesmo na menor concentração utilizada, 50 AU ml⁻¹ (Figura 1).

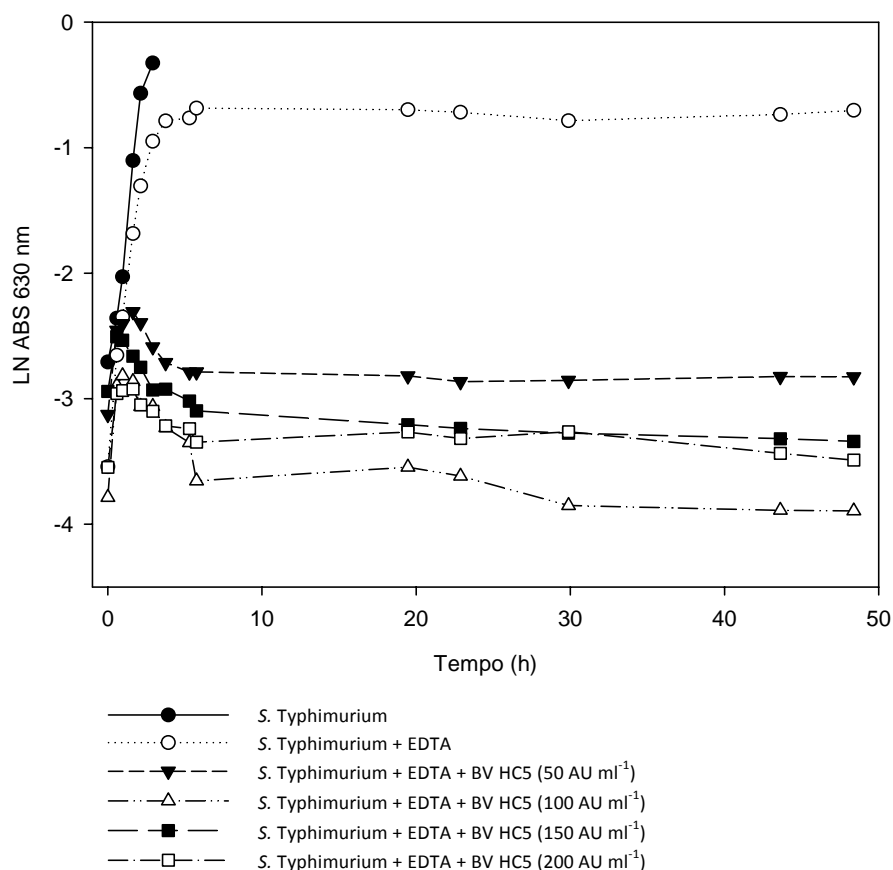


Figura 1: Crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e EDTA ($1,6 \text{ mmol}^{-1}$), incubada a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas.

Estes resultados sugerem que a ação do EDTA na desestabilização da membrana externa permite que bovicina HC5 tenha acesso a membrana citoplasmática, onde exerceria sua ação, desencadeando a formação de poros e ocasionando o colapso das funções celulares (MANTOVANI et al., 2002). Isso demonstra o potencial para utilização desta bacteriocina no controle de micro-organismos gram-negativos, e é de fundamental importância dada à relevância deste grupo de bactérias entre os micro-organismos patogênicos e deterioradores de alimentos (BOZIARIS & ADAMS, 1999). Além disso, este quelante já é

amplamente utilizado em diversos países para minimizar reações de oxidação e quaisquer outras relacionadas à deterioração de alimentos catalisadas por metais (BRANEN & DAVIDSON, 2004). Alakomi et al. (2003) demonstraram que o EDTA age promovendo a liberação da camada de LPS das células de *Salmonella Typhimurium*, comprovada pela liberação de material lipídico específico dessa estrutura, tanto no início quanto no final da fase exponencial de crescimento. Estes autores sugerem ainda a existência de um mecanismo de ação independente da liberação da camada de LPS, que atuaria no início da fase exponencial e que também estaria envolvido na sensibilização das células desta bactéria (ALAKOMI et al., 2003).

Já foi demonstrado que a adição de EDTA sensibiliza bactérias gram-negativas à ação de bacteriocinas de bactérias gram-positivas e potencializa a atividade bactericida de outros compostos antimicrobianos e antibióticos, particularmente sobre bactérias gram-negativas (BRANEN & DAVIDSON, 2004). Boziaris & Adams (1999) avaliaram o efeito de nisina associada à EDTA (10 mmol^{-1}) no crescimento de *E. coli* ATCC 25922 e verificaram que, mesmo em baixas concentrações da bacteriocina (100 AU ml^{-1}), havia uma supressão do crescimento do micro-organismo. Philips e Duggan (2001) trataram células de *Arcobacter butzleri* ($6 \log_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$) com EDTA (20 mmol^{-1}) e nisina (500 AU ml^{-1}) por 30 minutos e observaram que a adição simultânea dos dois componentes foi mais eficiente para redução das contagens do micro-organismo tanto em células em fase exponencial quanto naquelas em fase estacionária, com diminuição de 5,6 e 5,1 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Além de bovicina HC5, outras bacteriocinas demonstraram efeito inibidor sobre espécies de *Salmonella*. *Salmonella* Enteritidis foi parcialmente sensível ao tratamento com 3200 AU ml⁻¹ de cereína 8A, uma bacteriocina produzida por *B. cereus*, mas a adição de EDTA (20, 50 ou 100 mmol⁻¹) aumentou significativamente o efeito bactericida desta bacteriocina, mensurada pela leitura de absorvância a 600 nm (LAPPE et al., 2009).

Resultados semelhantes também foram obtidos em ensaios com alimentos, Economou et al. (2009) trataram amostras de frango com 500 e 1500 AU g⁻¹ de nisina e de 10 e 50 mmol⁻¹ de EDTA por 30 minutos e observaram que este tratamento reduziu significativamente as contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios, *Pseudomonas* sp. e *Enterobacteriaceae* durante os 24 dias de estocagem a 4 °C.

Ao se analisar as diversas concentrações de bovicina HC5 que foram utilizadas observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre 50 e 100 AU ml⁻¹ e entre 150 e 200 AU ml⁻¹, sendo as últimas mais eficientes na inibição do crescimento.

Dentre os outros agentes utilizados em associação com bovicina HC5, o citrato de sódio foi aquele que demonstrou maior efetividade para inibir o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, seguido por dietanolamina, ácido nitrilo-triacético e ácido láctico (Figuras 2, 3 e 4). Ácido glucônico foi o agente que apresentou o menor efeito, seguido por fosfato de potássio e acetato de cálcio (Figuras 5, 6 e 7).

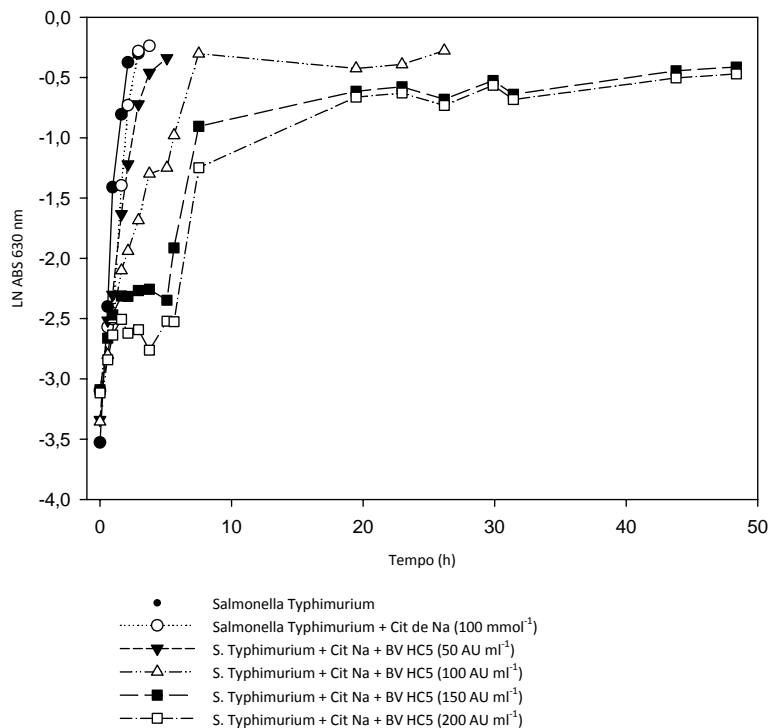


Figura 2: Crescimento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e citrato de sódio (100 mmol⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

Com o aumento da concentração de bovicina HC5 para 150 e 200 AU ml⁻¹, citrato de sódio demonstrou um maior efeito inibitório no crescimento de *Salmonella Typhimurium*, suprimindo o crescimento por um período de cinco a seis horas de incubação (Figura 2). Estes resultados diferem daqueles obtidos por Boziaris e Adams (1999), em que a adição de ácido cítrico (20 mmol⁻¹) juntamente com nisina 200 AU ml⁻¹ não inibiu o crescimento de *E. coli* ATCC 25922. Estes mesmos autores testaram esta associação em maiores concentrações da bacteriocina e observaram que o aumento da dosagem para 500 AU ml⁻¹ reduzia significativamente o crescimento e uma completa inibição era observada com adição de 1000 AU ml⁻¹ de nisina.

Efeitos similares também foram observados em alimentos, Long e Phillips (2003) observaram que a associação de 1,5 % (p/p) de citrato de sódio a 500 AU ml⁻¹ de nisina em peito de frango contaminado com *A. butzleri* estocado a 5 °C reduzia significativamente as contagens do micro-organismo após três e seis de armazenamento. Segundo estes autores, esse mesmo efeito também foi verificado quando as amostras eram estocadas a 30 °C, embora com uma menor eficiência.

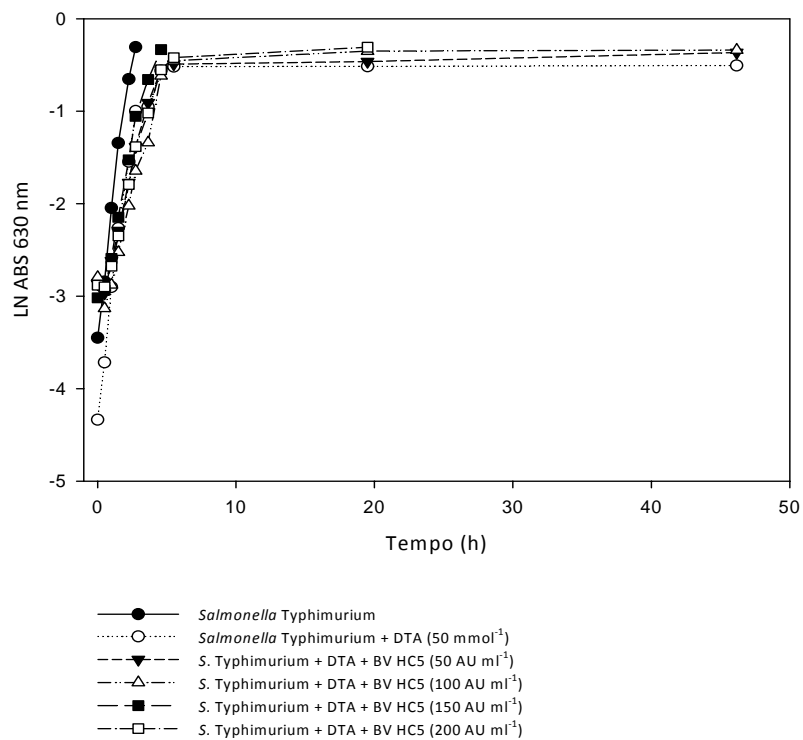


Figura 3: Crescimento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovina HCS e dietanolamina (50 mmol⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

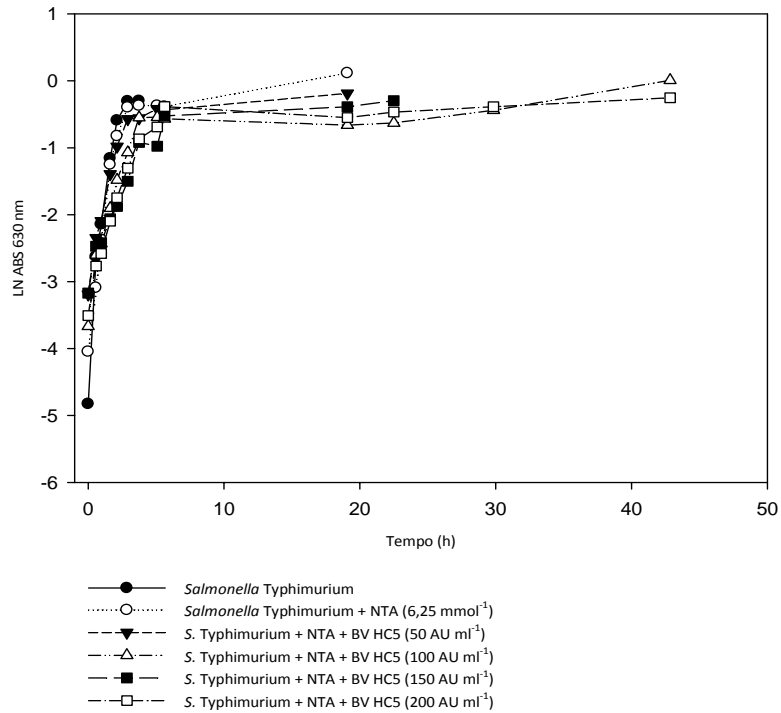


Figura 4: Crescimento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovina HC5 e ácido nitrilo-triacético (NTA) (6,25 mmol⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

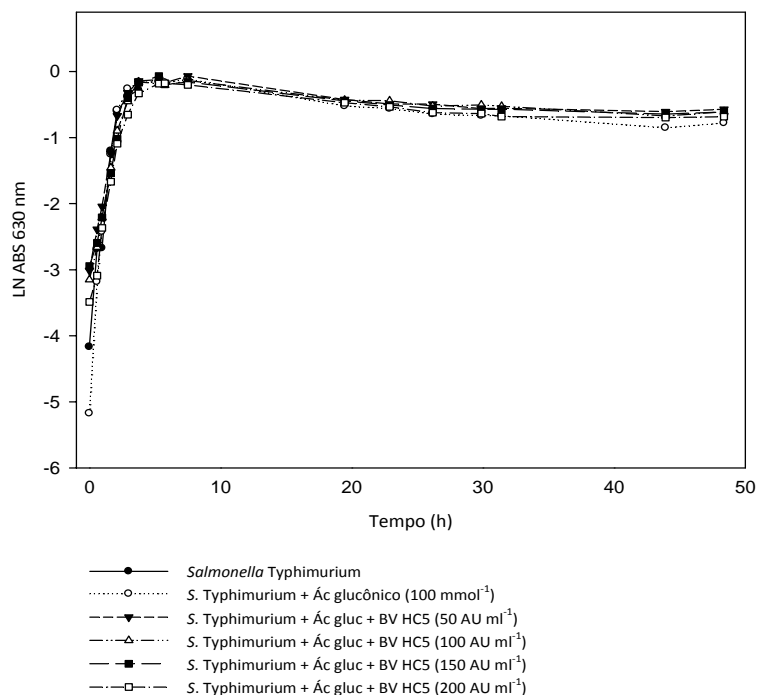


Figura 5: Crescimento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovina HC5 e ácido glucônico (100 mmol⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

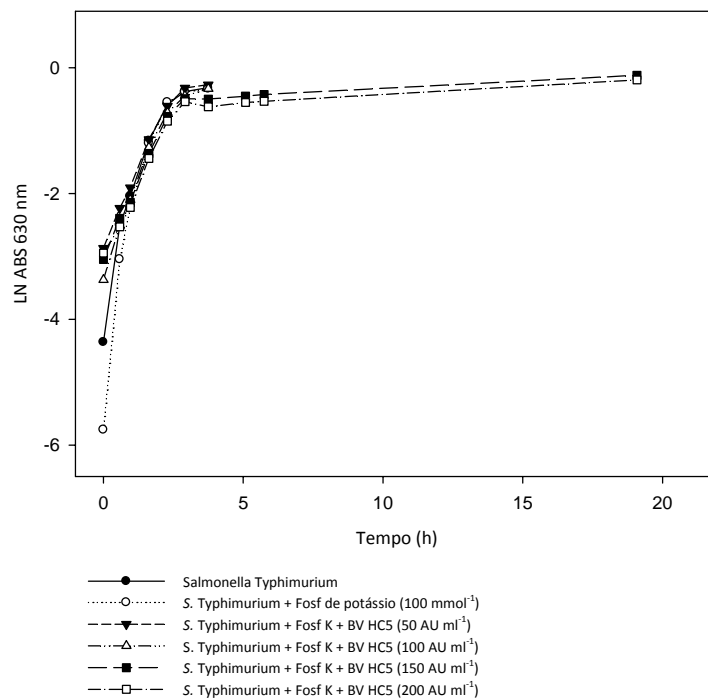


Figura 6: Crescimento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e fosfato de potássio (100 mmol⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

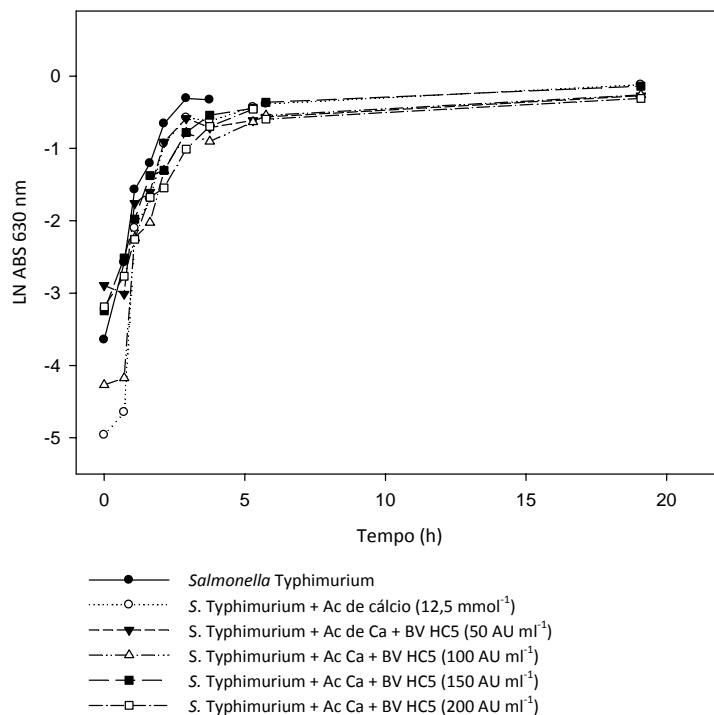


Figura 7: Crescimento de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 e acetato de cálcio (12,5 mmol⁻¹), incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

A associação de bovicina HC5 com dietanolamina, ácido nitrilo-tri-acético (NTA) e ácido glucônico reduziu significativamente o crescimento de *Salmonella* Typhimurium independente da concentração de bacteriocina que foi utilizada (Quadro 4). Em outros estudos, o ácido nitrilo-tri-acético não demonstrou ação pronunciada na desestruturação da membrana externa de bactérias gram-negativas. Alakomi et al. (2006) avaliaram o efeito de 1 mmol^{-1} deste agente no aumento do transporte de 1-N-fenilnaftil-amina (NPN), um indicador da desestruturação desta membrana, em várias linhagens *Pseudomonas* e observaram que não houve um aumento significativo na fluorescência do composto, indicando que o tratamento não afetou a membrana externa de maneira efetiva. Naturalmente, as diferenças entre os resultados encontrados podem ser relacionadas à concentração do agente quelante ou mesmo a diferenças das espécies bacterianas utilizadas para estudo. Ácido glucônico e ácido nitrilo-tri-acético também foram previamente avaliados na capacidade de permeabilizar a membrana externa de células de *P. aeruginosa* e potencializar a ação de antibióticos e observou-se que ambos os agentes mostraram apenas um fraco efeito nesta atividade (AYRES et al., 1999).

Quando associada a ácido láctico, bovicina HC5 ocasionou redução mais pronunciada no crescimento de *Salmonella* Typhimurium nas concentrações de 150 e 200 AU ml^{-1} (Quadro 4). Já foi demonstrado que o ácido láctico é um agente com grande potencial na desestruturação da membrana externa de bactérias gram-negativas, que sensibiliza as mesmas à ação da lisozima e de detergentes (ALAKOMI et al., 2000). No entanto, no presente trabalho este agente não parece ter

promovido alteração da membrana externa suficiente para permitir a máxima atividade máxima de bovicina HC5 assim como observado com os tratamentos com EDTA (Figura 1).

A sensibilidade dos micro-organismos à associação de ácido láctico e bacteriocinas é variável, *L. monocytogenes* quando submetida a tratamento com 25 $\mu\text{ ml}^{-1}$ de enterocina AS-48 e 0,5 % de ácido láctico (p/ v), em aspargos verdes estocados a 22 °C por 24 horas teve suas contagens reduzidas abaixo dos níveis de detecção mesmo quando a concentração de ácido láctico foi reduzida para 0,1 % (MOLINOS et al., 2005). Em *B. cereus* constatou-se uma redução significativa na contagem de colônias, comparadas as amostras não tratadas, após o tratamento com 25 $\mu\text{ ml}^{-1}$ de enterocina AS-48 e 0,5 % de ácido láctico (p/ v) em brotos de alfafa armazenados a 15 °C por 24 horas (MOLINOS et al., 2008a).

Bactérias gram-negativas, geralmente são mais resistentes à ação de agentes antimicrobianos devido à presença da membrana externa, sendo necessárias maiores concentrações para sensibilização desse grupo de micro-organismos (GÁLVEZ et al., 2007). Essa relação foi demonstrada por Molinos et al. (2008b) quando avaliaram a sensibilidade de *Salmonella enterica* CECT 4300 ao tratamento com 25 $\mu\text{ ml}^{-1}$ de enterocina AS-48 e 1,5 % (p/v) de ácido láctico, em que as contagens ficaram abaixo dos limites de detecção em brotos de soja estocados a 15 °C por 48 horas. Diferentemente dos resultados do presente trabalho, esses autores não observaram um efeito significativo da associação de enterocina AS-48 com EDTA, mesmo em altas concentrações do quelante como 100 mmol^{-1} (MOLINOS et al., 2008b).

Bovicina HC5, juntamente com fosfato de potássio e acetato de cálcio, não diminuiu significativamente o crescimento de *Salmonella* Typhimurium (Quadro 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Boziaris e Adams (1999), que avaliaram o efeito de nisina associada a 20 mmol⁻¹ de fosfato de sódio e observaram que concentrações de 200 AU ml⁻¹ não eram suficientes para inibir o crescimento de *E. coli* ATCC 25922. Entretanto com o aumento na concentração de bacteriocina para 1000 AU ml⁻¹ havia uma expressiva redução no crescimento desse micro-organismo (BOZIARIS & ADAMS, 1999).

4.2.2 – Agentes tensoativos

A associação de bovicina HC5 nas diferentes concentrações avaliadas com agentes tensoativos alterou significativamente a velocidade específica de crescimento de *Salmonella* Typhimurium (Quadro 5).

Quadro 5: Velocidade específica de crescimento μ (h⁻¹) de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetida a tratamento com diferentes concentrações de bovicina HC5 associada a agentes tensoativos incubada a 35 ± 2 °C por 48 horas.

Agentes tensoativos	μ (h ⁻¹)				
	Concentração de bovicina HC5 (AU ml ⁻¹)				
	0	50	100	150	200
Ramnolípideo (5X CMC)	0,83 ^A	0,68 ^B	0,68 ^B	0,70 ^B	0,41 ^B
Tween 80 (5X CMC)	1,01 ^A	0,64 ^B	0,66 ^B	0,66 ^B	0,62 ^B

NOTA: As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade.

Embora não tenham sido encontrados trabalhos que correlacionem a ação de bacteriocinas com surfactantes, sabe-se que estes compostos ampliam a

eficiência de agentes bactericidas utilizados como sanitizantes na indústria de alimentos, como o cloro e o ácido peracético. Bastos et al. (2005) avaliaram a eficácia de 0,1 % Tween 80 em soluções de lavagem de melão com cloro e ácido peracético e observaram que o surfactante potencializa a ação do sanitizante reduzindo as contagens de micro-organismos mesófilos aeróbios do fruto.

4.3 – Avaliação da morfologia das células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA

Não foi possível evidenciar alterações morfológicas nas células de *Salmonella* Typhimurium observadas em microscopia eletrônica de varredura. As células suspensas em tampão fosfato de sódio com ou sem adição de EDTA e bovicina HC5 apresentaram forma de bacilo, característica do micro-organismo (Figuras 8 e 9). A resolução do equipamento utilizado não permitiu observar detalhes no envelope celular do micro-organismo.

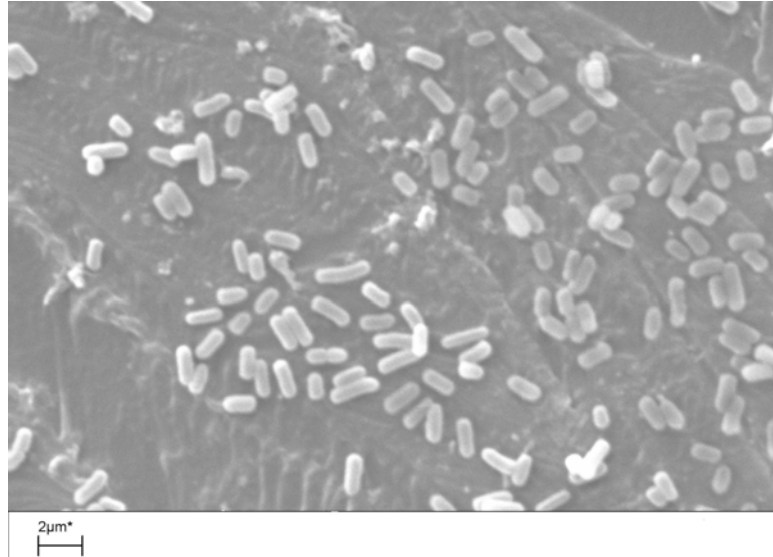


Figura 8: Células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em tampão fosfato de sódio observadas em microscopia eletrônica de varredura (Aumento de 7000 x).

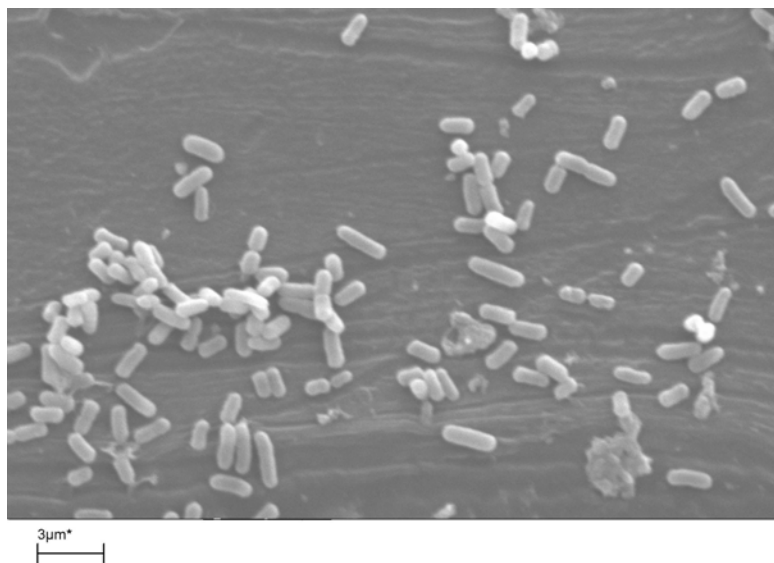


Figura 9: Células de *Salmonella* Typhimurim ATCC 14028 suspensas em tampão fosfato de sódio acrescido de EDTA ($1,6 \text{ mmol}^{-1}$) e bovina HC5 (100 AU ml^{-1}) observadas em microscopia de varredura (Aumento de 7000 x).

4.4 – Avaliação da morfologia do envelope celular das células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA

Células de *Salmonella* Typhimurium observadas em microscopia de força atômica apresentaram uma superfície compacta, com textura suave, ligeiramente irregular, mas sem rupturas aparentes. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por ALAKOMI et al. (2006) que observaram células de *Pseudomonas* sp. com esta mesma técnica.

Comparando-se a morfologia das células obtidas em caldo BHI (Figura 10) com aquelas suspensas em tampão fosfato de sódio (figura 11), sugere-se que a topografia celular é menos irregular no primeiro caso. É possível que os nutrientes presentes no caldo BHI exerçam efeito protetor e minimizem os danos ao envelope celular de *Salmonella* Typhimurium.

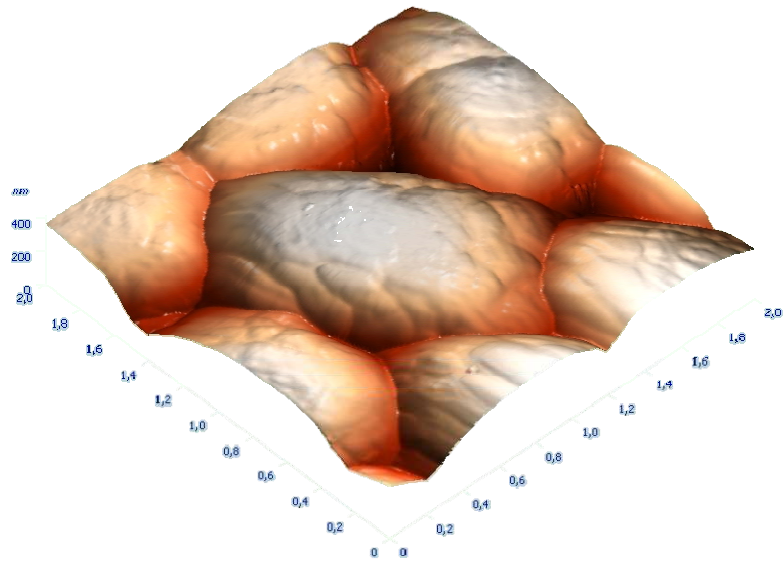


Figura 10: Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em caldo BHI por 24 horas, observadas por microscopia de força atômica. Varredura de 2 μm .

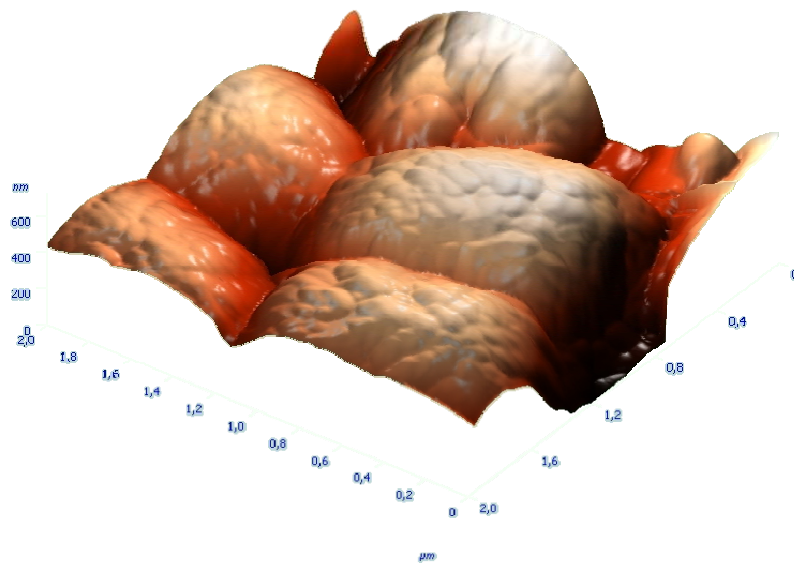


Figura 11: Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em tampão fosfato de sódio por 24 horas, observadas por microscopia de força atômica. Varredura de 2 μm .

A análise das células tratadas com bovicina HC5 e EDTA demonstra uma superfície mais irregular, com aumento de rugosidades e possíveis pontos de extravasamento do citoplasma, possivelmente ocasionados pela ação de bovicina HC5 sobre o envelope celular (Figuras 12 e 13). A ampliação das imagens da superfície celular permite a visualização destas alterações com maior riqueza de detalhes (Figuras 14 e 15). O tempo de tratamento ocasiona um aumento nestes prováveis pontos de extrusão (Figuras 16, 17 e 18). Estes resultados sinalizam que o EDTA atua de forma eficiente na desestruturação da membrana externa das células de *Salmonella* Typhimurium, permitindo a atuação de bovicina HC5.

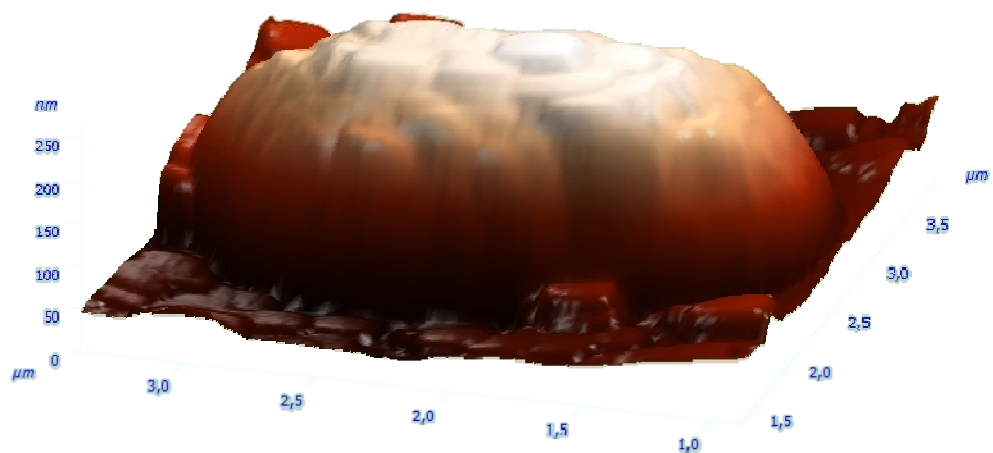


Figura 12: Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em caldo BHI por 12 horas, observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina. Varredura de 2 μm .

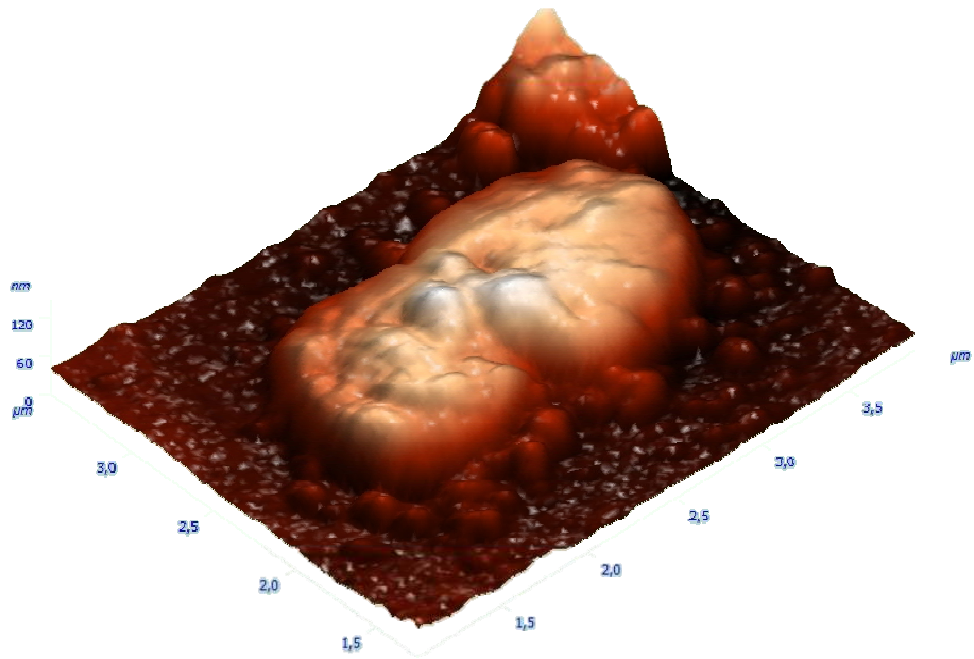


Figura 13: Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em caldo BHI acrescido de bovicina HC5 (100 AU ml^{-1}) e EDTA ($1,6 \text{ mmol ml}^{-1}$) por 12 horas, observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina. Varredura de $2 \mu\text{m}$.

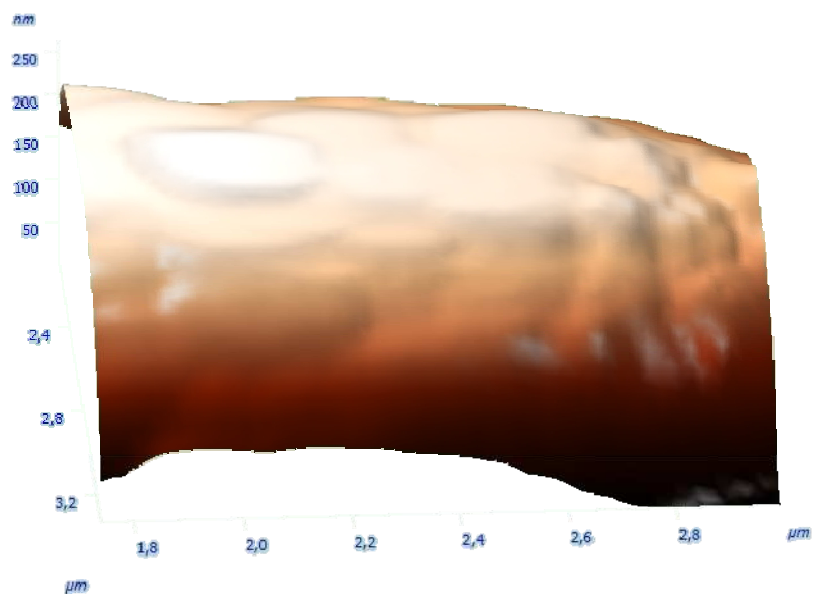


Figura 14: Detalhes da superfície celular de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em caldo BHI por 12 horas, observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-l-lisina. Varredura de $2 \mu\text{m}$.

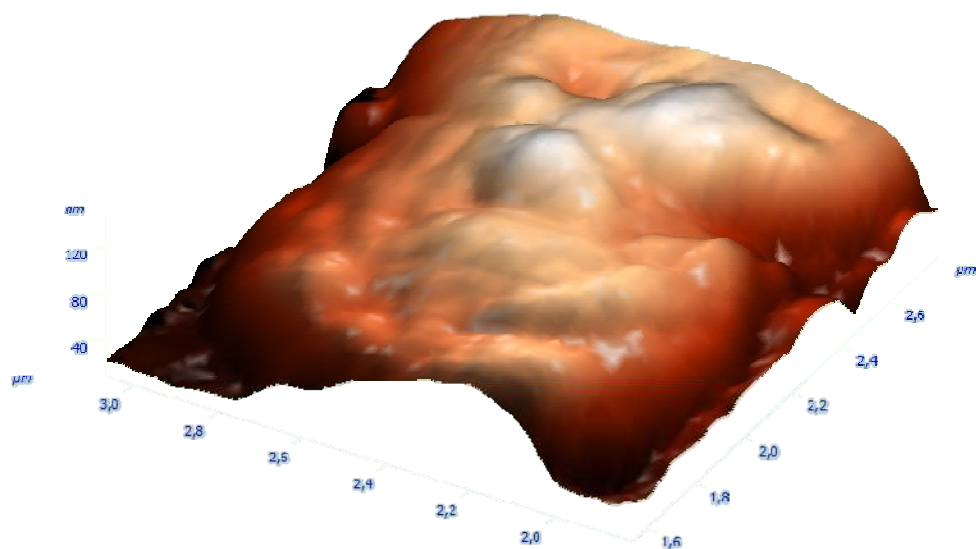


Figura 15: Detalhes da superfície celular de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em caldo BHI acrescido de bovina HC5 (100 AU ml^{-1}) e EDTA ($1,6 \text{ mmol ml}^{-1}$) por 12 horas, observadas por microscopia de força atômica em lâminas cobertas com poli-L-lisina. Varredura de $2 \mu\text{m}$.

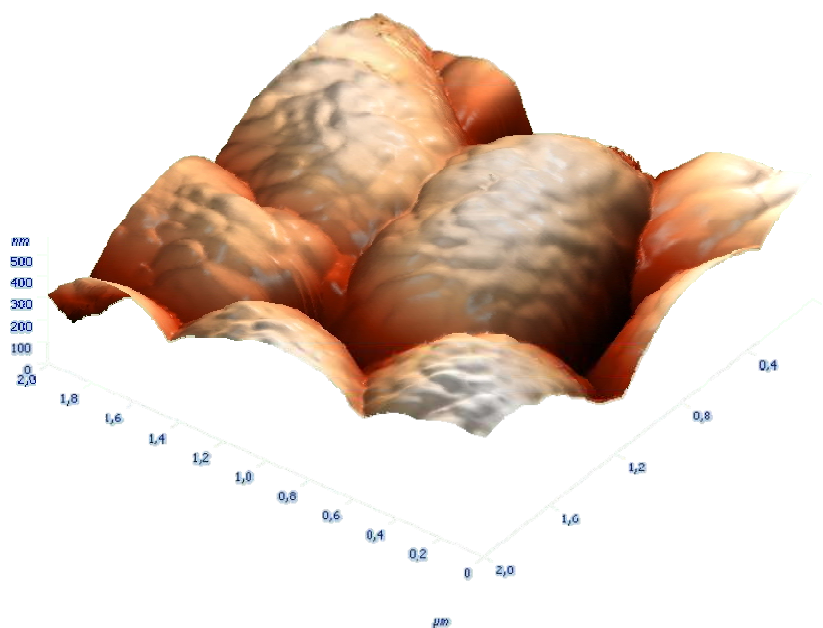


Figura 16: Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em tampão fosfato de sódio acrescido de bovina HC5 (100 AU ml^{-1}) e EDTA ($1,6 \text{ mmol ml}^{-1}$) por 3 horas, observadas por microscopia de força atômica. Varredura de $2 \mu\text{m}$.

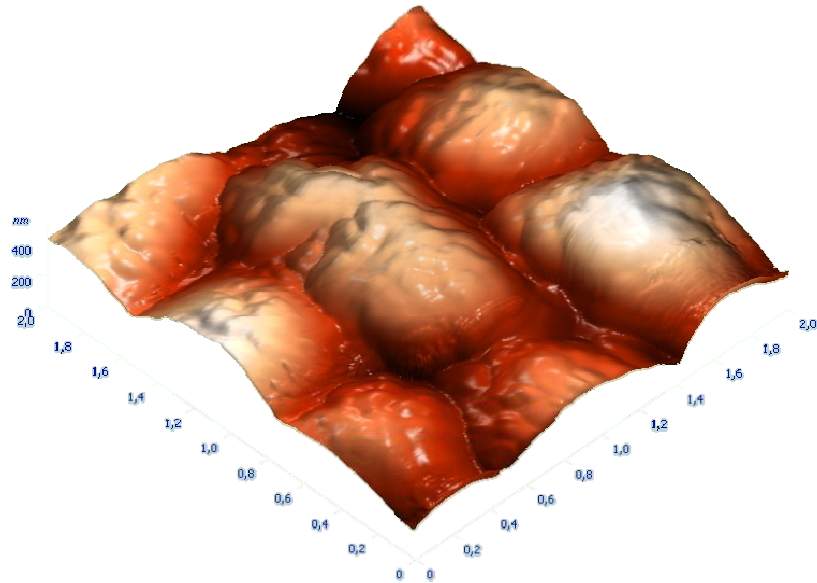


Figura 17: Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em tampão fosfato de sódio acrescido de bovicina HC5 (100 AU ml^{-1}) e EDTA ($1,6 \text{ mmol ml}^{-1}$) por 6 horas, observadas por microscopia de força atômica. Varredura de $2 \mu\text{m}$.

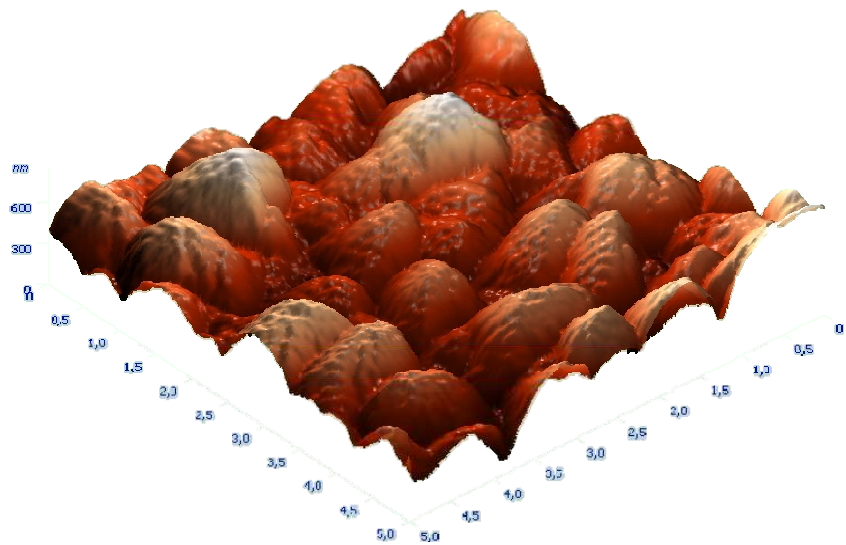


Figura 18: Imagem 3D de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suspensas em tampão fosfato de sódio acrescido de bovicina HC5 (100 AU ml^{-1}) e EDTA ($1,6 \text{ mmol ml}^{-1}$) por 12 horas, observadas por microscopia de força atômica. Varredura de $5 \mu\text{m}$.

Estes dados são confirmados por estudos que avaliaram o efeito de 1 mmol^{-1} de EDTA no envelope celular de células de *Pseudomonas* sp., quando se constatou que a ação deste quelante provoca danos na superfície do envelope celular, ocasionando o aparecimento de rugosidades, provocadas pela liberação da camada de lipolissacarídeos da membrana externa, com enfraquecimento da estrutura (ALAKOMI et al., 2006).

Foi possível observar ainda que o tratamento promove mudanças na morfologia das células ocasionadas pela perda da turgidez, visualizada pela diferença na altura das células, possivelmente devido ao efluxo de íons (Figura 12 e 13). Alterações semelhantes foram observadas por outros autores, Li et al. (2007) visualizaram células de *P. aeruginosa* e *E. coli* tratadas com um peptídeo antimicrobiano, cujo mecanismo de ação proposto é a desestruturação da membrana externa com formação de poros. Esses autores perceberam que as primeiras alterações morfológicas foram o aparecimento de pequenos recuos na superfície e resíduos da membrana externa em torno das células e que o aumento na concentração do peptídeo desencadeava a ruptura do envelope celular.

O aumento nos recuos na superfície celular é observado como aumento nas rugosidades e parece ser uma resposta comum de células gram-negativas a tratamentos estressantes; Meincken et al. (2005) observaram este mesmo padrão morfológico quando avaliaram células de *E. coli* tratadas peptídeos antimicrobianos. Sahu et al. (2009) visualizaram alterações semelhantes ao investigar células de *E. coli* tratadas com azul de toluidina e irradiadas com luz ultra-violeta.

A avaliação do perfil topográfico destas células confirma as imagens observadas, pois ao se comparar um mesmo intervalo de varredura a amplitude de variação nas células tratadas é maior que nas do controle, comprovando o aumento nas rugosidades da superfície das mesmas, provavelmente ocasionados pelos pontos de extravasamento citoplasmáticos (Figura 19).

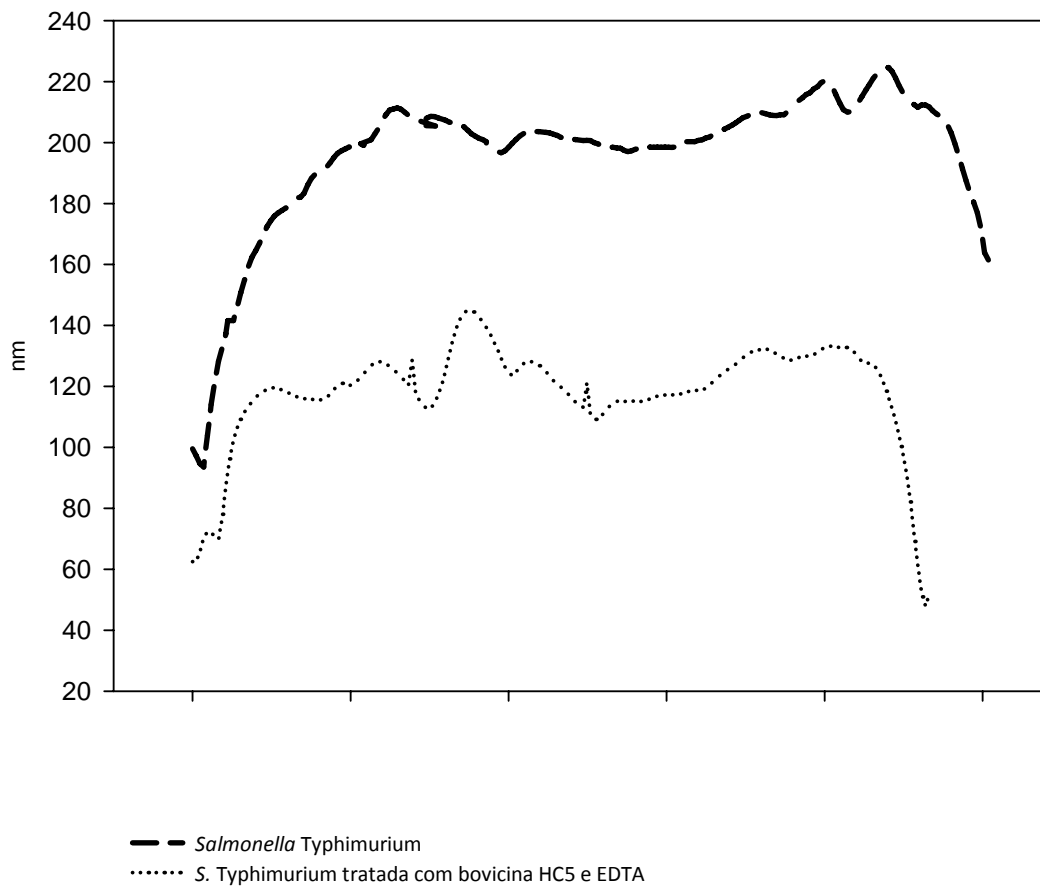


Figura 19: Perfil topográfico de células de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 submetidas a tratamento com bovicina HC5 (100 AU ml^{-1}) e EDTA ($1,6 \text{ mmol}^{-1}$) por 12 horas em caldo BHI.

4.5 – Avaliação da perda de potássio de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 tratadas com bovicina HC5 e EDTA

Os resultados da análise de potássio extracelular comprovaram que a presença de bovicina HC5 ocasiona danos no envelope celular das células de *Salmonella* Typhimurium, provocando o extravasamento de potássio, independente da presença de EDTA ($p > 0,05$). A presença do próprio quelante gera alguma perturbação nas células, com saída do íon, mas este extravasamento não difere significativamente daquele observado nas células suspensas em tampão ($p > 0,05$) (Figura 20). A detecção de potássio após o tratamento com bacteriocinas é relativamente comum, visto que o mecanismo de ação de destes peptídeos, geralmente, está relacionado à formação de poros na membrana plasmática da célula alvo (ABEE et al., 1995). Minahk et al. (2000) avaliaram células de *L. monocytogenes* tratadas com enterocina CRL35 e verificaram um aumento na concentração de potássio extracelular. Zhou et al. (2008) estudaram este mesmo micro-organismo e obtiveram o mesmo padrão de resposta após tratamento com pentocina 31-1. Resultados semelhantes foram obtidos com bovicina HC5 por Mantovani e Russell (2003), que observaram queda na concentração de potássio intracelular em células *L. monocytogenes* tratadas com bovicina HC5.

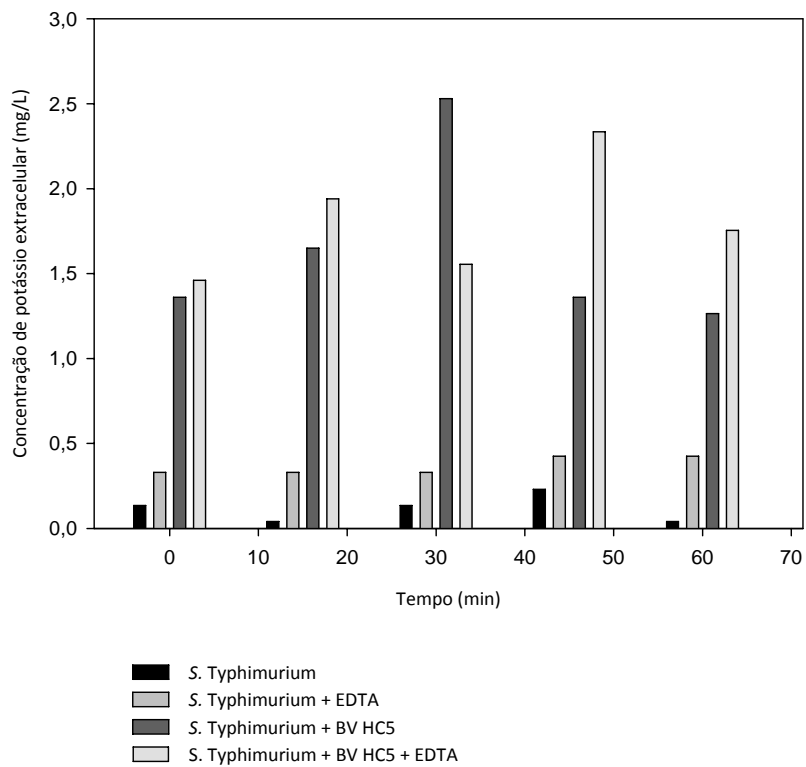


Figura 20: Extravasamento de potássio extracelular de células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 submetidas a tratamento com bovicina HC5 (100 AU ml⁻¹) e EDTA (1,6 mmol⁻¹), incubada a 35 ± 2°C por 60 minutos.

Observa-se que o tempo de ação de bovicina HC5 é de cerca de 1 minuto, visto que é possível detectar a presença do íon no sobrenadante no primeiro tempo de coleta de amostra. Esta rápida atuação já foi descrita para outras bacteriocinas como pentocina 31-1 por Zhou et al. (2008) que avaliaram células de *L. monocytogenes* tratadas com a bacteriocina e verificaram que havia uma dissipação da força protomotora, exacerbada no primeiro minuto de tratamento.

4.6 – Avaliação do efeito bactericida de bovicina HC5 associada ao EDTA em células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

Embora inicialmente bovicina HC5 associada ao EDTA tenha inibido o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, após 150 minutos de tratamento foi possível verificar efeito bactericida pela redução da contagem de células viáveis (Figura 21). Esse efeito foi mais acentuado na maior concentração de bovicina HC5 utilizada, 200 AU ml⁻¹. Nesta concentração as contagens ficaram abaixo do limite de detecção da técnica após 180 minutos de tratamento (Figura 21).

Este mesmo padrão foi observado quando as células de *Salmonella* Typhimurium foram tratadas com a menor concentração de bovicina HC5, com diferença de, aproximadamente, 30 minutos para o início da redução das contagens e de 60 minutos para que esta redução ficasse abaixo dos limites de detecção da técnica (Figura 21).

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o comportamento apresentado pelas células de *Salmonella* Typhimurium na ausência ou na presença 50 ou 200 AU ml⁻¹ de bovicina HC5 (Figura 21). Como constado em experimentos anteriores, a adição de 1,6 mmol⁻¹ de EDTA exerceu inibição parcial no crescimento, com aumento da fase lag e redução da população final em um ciclo logarítmico ($p < 0,05$).

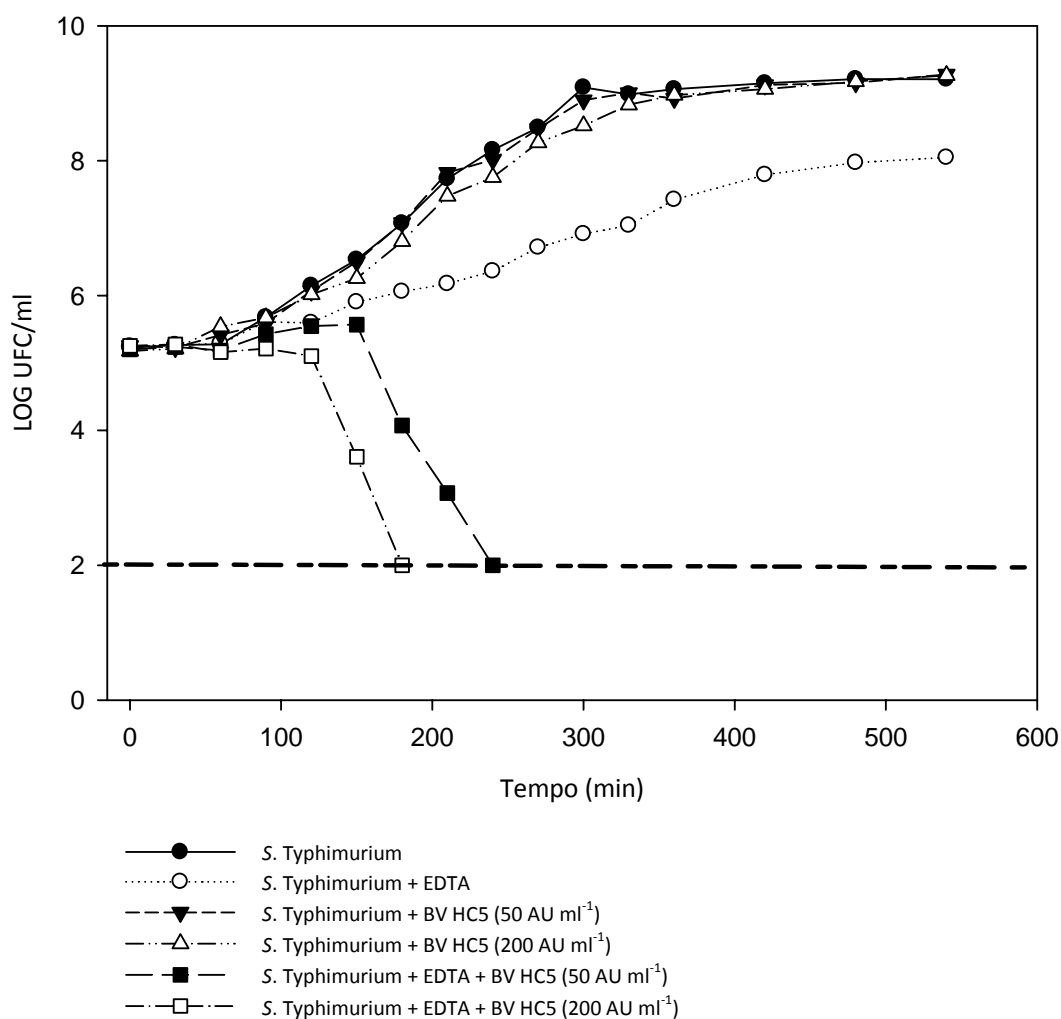


Figura 21: Contagens de *Salmonella Typhimurium* tratada com EDTA ($1,6 \text{ mmol}^{-1}$) e bovicina HC5 (50 e 200 AU ml^{-1}) incubada a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 540 minutos. A linha pontilhada indica o limite de detecção da técnica.

Estes resultados indicam que a ação do EDTA no envelope celular de *Salmonella Typhimurium* foi efetiva para permitir a atuação de bovicina HC5 na membrana plasmática do micro-organismo, reduzindo sua viabilidade. Estes dados demonstram ainda a possibilidade de utilização de bovicina HC5 no controle de bactérias gram-negativas desde que associada a algum tratamento que desestruture a membrana externa. Resultados semelhantes foram obtidos por

outros trabalhos. Long e Phillips (2003) constataram o efeito de 1,5 % de citrato de sódio associado a 500 AU g⁻¹ de nisina em peito de frango na redução das contagens de *A. butzleri* em quase dois ciclos logarítmicos após seis dias de estocagem a 5 °C. Lappe et al. (2009) observaram que 3200 AU ml⁻¹ de cereína associada a 20 mmol⁻¹ de EDTA reduziu em 2,69 ciclos logarítmicos a população de *Salmonella* Enteritidis após 90 minutos de tratamento a 37 °C.

Diferenças na sensibilidade dos microrganismos de um mesmo grupo podem ser ocasionadas por alterações entre as moléculas das bacteriocinas e pelas variações na composição lipídica das membranas das células alvo (NISSEN-MEYER & NES, 1997).

5 - Conclusões

Bovicina HC5 isoladamente não exerce efeito antimicrobiano significativo sobre *Salmonella* Typhimurium, mas quando associada a agentes quelantes e tensoativos há uma redução ou supressão do crescimento.

A associação de bovicina HC5 com EDTA foi aquela que mostrou resultados mais promissores, inibindo o crescimento do micro-organismo por até 48 horas.

Células de *Salmonella* Typhimurium tratadas com bovicina HC5 e EDTA apresentaram alterações morfológicas, com aumento de rugosidades na superfície celular e perda da turgidez, possivelmente pelo extravassamento de metabólitos intracelulares.

O tratamento com bovicina HC5, independente da presença EDTA, provoca o extravassamento de potássio intracelular, mas somente em associação estes agentes determinam a perda de viabilidade de células de *Salmonella* Typhimurium.

6 - Referências Bibliográficas

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 121-129, 2008.

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes de action and potentials in food preservation and control de food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 169-185, 1995.

ALAKOMI, H. L.; SKYTТА, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I. M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001-2005, 2000.

ALAKOMI, H. L.; SAARELA, M.; HELANDER, I. M. Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. **Microbiology**, v. 149, p. 2015-2021, 2003.

ALAKOMI, H. L.; PAANANEN, A.; SUIHKO, M. L.; HELANDER, I. M.; SAARELA, M. Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4695-4703, July, 2006.

ALAKOMI, H. L. **Weakening of the Gram-negative bacterial outer membrane -A tool for increasing microbiological safety**. 2007. 124 p. [Dissertation in Microbiology]. University of Helsinki.

ALLENDE, A.; MARTÍNEZ, B.; SELMA, M. V.; GIL, M. I.; SUÁREZ, J. E.; RODRÍGUEZ, A. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiology**, v. 24, p. 759-766, 2007.

ALLENDE, A.; SELMA, M. V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; VILLAESCUSA, R.; GIL, M. I. Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 49, p. 155-163, 2008.

ANANG, D. M.; RUSUL, G.; BAKAR, J.; LING, F. H. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4°C. **Food Control**, v. 18, p. 961-969, 2007.

ARTÉS, F.; GÓMEZ, P. A.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F. Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 3, p. 177-188, 2007.

AYRES, H. M.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 13-16, 1999.

BASTOS, M. S.; R.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; ARRUDA, A. C.; ALVES, R. E. The effect of the association of sanitizers and surfactant in the microbiota of the Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) melon surface. **Food Control**, v. 16, p. 369-373, 2005.

BAUER, R.; DICKS, L. M. T. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 201-216, 2005.

BEUCHAT, L. R.; SCOUTEN, A. J. Factors affecting survival, growth, and retrieval of *Salmonella* Poona on intact and wounded cantaloupe rind and in stem scar tissue. **Food Microbiology**, v. 21, p. 683-694, 2004.

BLASZYK, M.; HOLLEY, R. A. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 175-183, 1998.

BOZIARIS, I. S.; ADAMS, M. R. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 105-113, 1999.

BRANEN, J. K.; DAVIDSON, M. P. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 63–74, 2004.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 223-234, 1999.

CARVALHO, A. A. T. **Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras de polpa de manga**. 2006. 89p. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola]. Universidade Federal de Viçosa.

CARVALHO, A. A. T.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 68-74, 2007.

CARVALHO, A. A. T.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1685-1691, 2008.

CAO-HOANG, L.; MARECHAL, P. A.; LE-THANH, M.; GERVAIS, P. Synergistic action of rapid chilling and nisin on the inactivation of *Escherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 105-109, 2008.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, n.4, 281-305, 2001.

CHANG, J.; FANG, T. J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v.24, p. 745-751, 2007.

CHEIKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHEN, H.; TIAN, F.; CHEN, W.; TANG, J.; HAO ZHANG, H. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. **Food Control**, v. 20, p. 553-559, 2009.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada – sexta edição**, v. 23, n. 2, USA, 2003.

CORBO, M. R.; ALTIERI, C.; D'AMATO, D.; CAMPANIELLO, D.; DEL NOBILE, M. A.; SINIGAGLIA, M. Effect of temperature on shelf life and microbial population of lightly processed cactus pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 93-104, 2004.

CORBO, M. R.; DEL NOBILE, M. A.; SINIGAGLIA, M. A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 69-73, 2006.

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

DEMEL, R. A.; PEELLEN, T.; SIEZEN, R. J.; DE KRUIJFF, B.; KUIPERS, O. P. Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity - A monolayer study. **European Journal of Biochemistry**, v. 23, p. 267-274, 1996.

ECONOMOU, T.; POURNIS, N.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1470-1476, 2009.

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

FEDERAL REGISTER, 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Federal Register**, v. 54, p. 11247-11251, 1988.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 207-217, 1999.

GEORGE, S. G.; METRIS, A.; STRINGER, S. C. Physiological state of single cells of *Listeria innocua* in organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 204-210, 2008.

GOGUS, U.; BOZOGLU, F.; YURDUGUL, S.; The effects of nisin, oil–wax coating and yogurt on the quality of refrigerated chicken meat. **Food Control**, v. 15, p. 537-542, 2004.

GUDER, A.; WIEDEMANN, I.; SAHL, H. Posttranslationally modified bacteriocins - The Lantibiotics. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 55, p. 62 -73, 2000.

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

HANSEN, L. T.; AUSTIN, J. W.; GILL, T. A. Antibacterial effect of protamine in combination with EDTA and refrigeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 149-161, 2001.

HARNETT, N.; MANGAN, L.; BROWN, S.; KRISHNAN, C. Thermosensitive transfer of antimicrobial resistances and citrate utilization and cotransf er of hydrogen sulfide production from na *Escherichia coli* isolate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 24, p. 173-178, 1996.

HASPER, H. E.; KRUIJFF, B.; BREUKINK, E. Assembly and stability of nisin-Lipid II pores. **Biochemistry**, v. 43, p. 11567-11575, 2004.

HÉCHARD, Y.; SAHL, H. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. **Biochimie**, v. 84, p. 545-557, 2002.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p.153-161, 2000.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Ecological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

HOOVER, D. G.; HARLANDER S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Tecnology**, p. 23-29, 1993.

HOULIHAN, A. J.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocina from *Streptococcus bovis* HC5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p.27-32, 2004.

HSU, S.; EEFJAN BREUKINK, E.; KRUIJFF, B.; KAPTEIN, R.; BONVIN, A. M. J. J.; VAN NULAND, N. A. J. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the Nisin z and Lipid II interaction in SDS micelles. **Biochemistry**, v. 41, 7670-7676, 2002.

HUANG, C.; XU, T.; ZHANG, Y.; XUE, Y.; CHEN, G. Application of electrodialysis to the production of organic acids: state-of-the-art and recent developments. **Journal of Membrane Science**, v. 288, p.1-12, 2007.

HUANG, Y.; YUNBO LUO, Y.; ZHAI, Z.; ZHANG, H.; YANG, C.; TIAN, H.; LI, Z.; FENG, J.; LIU, H.; HAO, Y. Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Food Control**, v. 20, p. 1030-1035, 2009.

HUGENHOLTZ, J.; PERDON, L.; ABEE, T. Growth and Energy Generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis during Citrate Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4216-4222, Dec., 1993

KRAAIJ, C. V.; VOS, W. V.; SIEZEN, R. J.; KUIPERS, O. P. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. **Natural Product Reports**, v. 16, p. 575-587, 1999.

LAPPE, R.; MOTTA, A. S.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis by cerein 8A, EDTA and sodium lactate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 312-316, 2009.

LEE, S. K.; CHOI, H. Spectrophotometric determination of cadmium and copper with ammonium pyrrolidinedithiocarbamate in nonionic Tween 80 micellar media. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 463-466, 2001.

LEE, Y. L.; THRUPP, L.; OWENS, J.; CESARIO, T.; SHANBROM, E. Bactericidal activity of citrate against gram-positive cocci. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 349-351, 2001.

LI, A.; LEE, P. Y.; HO, B.; DING, J. L.; LIM, C. T. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on gram negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 411-418, 2007.

LONG, C.; PHILLIPS, C. A. The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken. **Food Microbiology**, v. 20, p. 495-502, 2003.

MACEDO, J. A. B.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; ARAÚJO, J. M. A.; SILVA, M. T. A.; JORDÃO, C. P. Formação de trihalometanos em soluções sanitizantes utilizadas no processo de desinfecção de indústrias de alimentação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, jul/ago, p. 216-230, 1999.

MANTOVANI, H. C.; HU, H.; WOROBO, R. W.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 3347-3352, 2002.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 77-83, 2003.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HC5, catalyzes the efflux of intracellular potassium but not ATP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2247-2249, June, 2008.

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

MEGHROUS, J.; LACROIX, C.; SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 16, p. 105-114, 1999.

MEINCKEN, M.; HOLROYD, D. L.; RAUTENBACH, M. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4085-4092, Oct., 2005.

MOLINOS, A. C.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; VALDIVIA, E.; LÓPEZ, R. L.; MAQUEDA, M.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Effect of immersion solutions containing Enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7781-7787, Dec., 2005.

MOLINOS, A. C.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B.; VALDIVIA, E.; GÁLVEZ, A. Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 25, p. 762-770, 2008a.

MOLINOS, A. C.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of gram-negative bacteria in soybean sprouts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2912-2921, 2008b.

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

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

MINAHK, C. J.; FARÍAS, M. E.; SESMA, F.; MORERO, R. D. Effect of Enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, p. 79-83, 2000.

NAKAI, S. A.; SIEBERT, K. J. Organic acid inhibition models for *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Oenococcus oeni*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 67-72, 2004.

NES, I. F.; BREDE, D. A.; HOLO, H. The nonlantibiotic heat-stable bacteriocins in gram-positive bacteria. In: KASTIN, A. J. (Ed). **Handbook of Biologically Active Peptides**. USA: Academic Press, 2006. p. 107-114.

NISSEN-MEYER, J.; NES, I. F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. **Archives of Microbiology**, v. 167, p. 67-77, 1997.

PINHEIRO, N. M. S.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n. 1, p. 153-156, abril, 2005.

PHILLIPS, C. A.; DUGGAN, J. The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. **Food Microbiology**, v. 18, p. 547-554, 2001.

RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; SCIFÒ, G. O.; CAGGIA, C. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. **Food Control**, v. 20, p. 756-763, 2009.

REA, M. C.; COGAN, T. M. Glucose prevents citrate metabolism by *enterococci*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 201-206, 2003.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 373-386, 2007.

RODRÍGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, J. M.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 51-57, 2005.

SAHU, K.; BANSAL, H.; MUKHERJEE, C.; SHARMA, M.; GUPTA, P. K. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, p. 9-16, 2009.

SCHILLINGER, U.; BECKER, B.; VIGNOLO, G.; HOLZAPFEL, W. H. Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 159-168, 2001.

SCHNURER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 70-78, 2005.

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

SKRZYPCZAK-JANKUN, E.; SMITH, D. A.; MALUSZYNSKA, H. Nitrilotriacetic acid, C₆H₉NO₆. **Acta Crystallographica**, section C: Crystal Structure, v. C50, p. 1097-1099, 1994.

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 120-127, 2008.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria, **Bacteriology Review**, v. 40, p. 722-756, 1976.

TRIAS, R.; BAÑERAS, L.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E. Bioprotection of Golden delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 50-60, 2008.

UKUKU, D. O. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 137-146, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG**. Versão 9.1. Viçosa – MG, 2006. 142 p.

VAARA, M. Agents That Increase the permeability of the Outer Membrane. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 395-411, Sept., 1992

VILLANUEVA, C.M.; KOGEVINAS, M.; GRIMALT, J. O. Cloración del agua potable em España y cáncer de vejiga. **Gaceta Sanitaria**, v. 15, n. 1, p. 48-53, 2001.

WIEDEMANN, I.; BREUKINK, E.; VAN KRAAIJ, C.; KUIPERS, O. P.; BIERBAUM, G.; KRUIJFF, B.; SAHL, H. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor Lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 1772-1779, 2001.

ZDOLEC, N.; HADZIOSMANOVIC, M.; KOZACINSKI, L.; CVRTILA, Z.; FILIPOVIC, I.; KRIVANKO, M. S.; LESKOVAR, K. Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. **Meat Science**, v. 80, p. 480-487, 2008.

ZHANG, J.; LIU, G.; LI, P.; QU, Y. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. **Food Control**, 2009.

ZHOU, K.; ZHOU, W.; LI, P.; LIU, G.; ZHANG, J.; DAÍ, Y. Mode of action of pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. **Food Control**, v. 19, p. 817-822, 2008.