

LEONARDO LUIZ DE FREITAS

**INATIVAÇÃO DE *Shigella flexneri* PELA ASSOCIAÇÃO DE NISINA E  
ULTRASSOM**

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  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F866i Freitas, Leonardo Luiz de, 1992-  
2017 Inativação de *Shigella flexneri* pela associação de nisina e  
ultrassom : . / Leonardo Luiz de Freitas. – Viçosa, MG, 2017.  
ix, 61 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Shigella flexneri*. 2. Bacteriocinas. 3. Nisina.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.355

LEONARDO LUIZ DE FREITAS

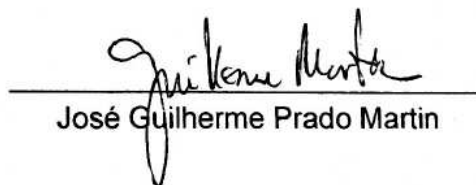
**INATIVAÇÃO DE *Shigella flexneri* PELA ASSOCIAÇÃO DE NISINA E  
ULTRASSOM**

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*.

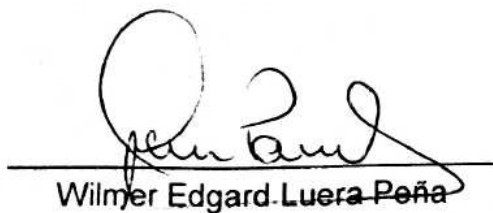
APROVADA: 22 de fevereiro de 2017.



François Baglinière



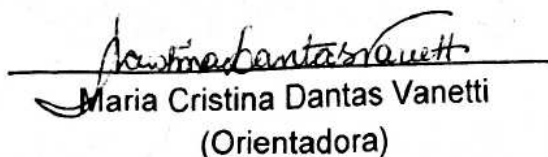
José Guilherme Prado Martin



Wilmer Edgard Luera Peña



Ramila Cristiane Rodrigues



Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

**Dedico**  
À minha família

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado nessa grande e longa jornada. O que seria de mim sem a sua presença em minha vida? A resposta é tão simples: NADA. Te amo Senhor de todo o meu coração.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela infraestrutura para realização dos experimentos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pela concessão da bolsa de estudos.

À minha linda e maravilhosa mãe Lucia Helena, pelo incentivo, pelas palavras de coragem nas horas difíceis e pelo seu imenso amor por mim. À minha querida Vó Herotildes, pelas horas de orações e pelos conselhos dados.

À toda minha família, que foi, ainda é e para sempre será o maior presente que eu poderia ganhar.

À minha namorada Bruna, pelo carinho, paciência e por toda atenção, mesmo nos momentos ruins.

À professora Maria Cristina, pela orientação, incentivo e paciência. Agradeço imensamente por todo o ensino, dedicação e por sempre me tratar com respeito e carinho. Você é nota 10!

À professora Cláudia, por ter me ajudado nas correções do projeto, nos planejamentos experimentais e por toda paciência comigo.

Aos meus amigos Deisy, Elsa, Érika, Fábio, François, Felipe, Gabriel, Jéssica, Leandro e Mayara pela amizade e companheirismo durante este projeto.

Aos colegas do laboratório de Anaeróbios e Microbiologia industrial.

À simpática Rafaela, do laboratório de filogeografia, por me ensinar a usar o sonicador, com muita paciência e boa vontade.

À família cambalachado, Paty, Manel, Luquinha e Pacheco, pela amizade, conversas sem sentidos, brincadeiras bobas e companheirismo.

À todos que torceram por mim nesta batalha.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Bacteriocinas .....	4
2.2. Nisina e sua aplicação na indústria de alimentos .....	5
2.3. Ultrassom: definição e aplicação na indústria de alimentos.....	8
2.4. Combinação do ultrassom com outras estratégias na inativação de micro-organismos .....	9
2.5. Metodologia de superfície de resposta .....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1. Micro-organismos e condições de cultivo .....	16
3.2. Preparo da solução de nisina .....	16
3.3. Acompanhamento da temperatura do meio de cultura durante a sonicação.....	16
3.4. Análise da atividade da nisina após a sonicação.....	17
3.5. Delineamento experimental .....	17
3.5.1. Tratamento de <i>S. flexneri</i> com nisina e ultrassom.....	18
3.5.2. Construção e validação do modelo preditivo .....	19
3.6. Sobrevivência de <i>S. flexneri</i> após a sonicação na presença de nisina e incubação em baixa temperatura.....	20
3.7. Contagem de células viáveis .....	20
3.8. Quantificação de ATP .....	21
3.9. Análise estatística .....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
4.1. Temperatura do meio de cultura durante a sonicação.....	23
4.2. Atividade da nisina após a sonicação .....	24

4.3. Construção do modelo preditivo para inativação de <i>S. flexneri</i> e validação.....	25
4.4. Sobrevivência de <i>S. flexneri</i> após a sonicação na presença de nisina e incubação em baixa temperatura.....	34
4.5. Perda de ATP de células de <i>S. flexneri</i> tratadas com nisina e ultrassom .....	38
5. CONCLUSÕES.....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## RESUMO

FREITAS, Leonardo Luiz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017.  
**Inativação de *Shigella flexneri* pela associação de nisina e ultrassom.**  
Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadora: Míriam Teresinha dos Santos.

A bioconservação é uma das técnicas atuais utilizadas na conservação de alimentos, que se baseia na utilização de micro-organismos e, ou de seus metabólitos, como por exemplo, bacteriocinas. Nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, usada na conservação de alimentos em mais de 50 países, incluindo o Brasil. Nisina é altamente ativa contra ampla gama de bactérias gram-positivas, mas bactérias gram-negativas, como *Shigella*, são naturalmente resistentes à sua ação. Esta resistência está relacionada à presença da membrana externa, que atua como barreira impedindo a difusão da bacteriocina até a membrana celular, seu local de ação. O uso de estratégias para desestabilizar a membrana externa, como o ultrassom (US), pode favorecer a ação da nisina contra bactérias gram-negativas. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da nisina associada ao US contra *Shigella flexneri* 2a em caldo infusão de cérebro e coração (BHI). Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) e a metodologia de superfície de resposta (MSR) com três variáveis independentes: tempo de sonicação ( $X_1$ : 5 a 20 min), pH ( $X_2$ : 4,0 a 7,0) e concentração de nisina ( $X_3$ : 29,1  $\mu$ M a 291,1  $\mu$ M). A diferença entre o logaritmo do número de células viáveis (log UFC/mL) no início e ao final de cada tratamento foi utilizada para construção do modelo preditivo. Análise de variância (ANOVA) e oito condições adicionais foram usadas para validação do modelo. Foi avaliado a sobrevivência de *S. flexneri* após a sonicação na presença de nisina e estocagem sob refrigeração (7 °C) por 120 h. Para isso, duas condições foram estabelecidas (10 min de US, pH 6,0 e 175  $\mu$ M de nisina e 20 min de US, pH 4,5 e 175  $\mu$ M de nisina). O extravasamento de ATP também foi avaliado nestas duas condições. Para comparações dos dados foi utilizado o teste Tukey para verificar a existência de diferenças entre o tratamento combinado (nisina + US) e os grupos controles. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados indicaram que o US é uma estratégia eficaz para sensibilizar *S. flexneri* à ação da nisina. A combinação de nisina com US resultou em sinergismo

na inativação deste patógeno, sendo que a maior inativação foi observada em baixos valores de pH, concentrações altas de nisina e maior tempo de sonicação, com redução máxima de, aproximadamente, 5 ciclos logarítmicos. O modelo preditivo da combinação (nisina + US) apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,942 e ajustado de 0,916 e o modelo foi validado. A estocagem sob-refrigeração após a sonicação na presença de nisina resultou no declínio da população de *S. flexneri* ao final do tempo de armazenamento que reduziu de 5,42 para 1,64 ciclo logarítmico em pH 6,0 após tratamento por 10 min de sonicação e 5,69 para 0,80 ciclo logarítmico em pH 4,5 quando tratada por 20 min de sonicação. O tratamento de nisina com US provocou o maior extravasamento de ATP intracelular em ambas as condições testadas. Estes resultados demonstram o potencial uso da nisina combinada ao US como estratégia de sanitização e conservação de alimentos.

## ABSTRACT

FREITAS, Leonardo Luiz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017.  
**Inactivation of *Shigella flexneri* by the combination of nisin and ultrasound.**  
Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-adviser: Míriam Teresinha dos Santos.

Bioconservation is one of the current techniques used in food preservation, which is based on the use of microorganisms and their metabolites such as bacteriocins. Nisin is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, used as a food preservative in more than 50 countries, including Brazil. Nisin is highly active against a wide range of gram-positive bacteria, but gram-negative bacteria, such as *Shigella*, are naturally resistant to its action. This resistance is related to the presence of the outer membrane, that acts as barrier preventing the diffusion of the bacteriocin to its site of action. The use of strategies to destabilize the outer membrane, such as ultrasound (US), can favor the action of nisin against gram-negative bacteria. This study aimed to evaluate the effect of nisin associated with US against *Shigella flexneri* 2a in brain and heart infusion broth (BHI). A Central Composite Rotated Design (CCRD) and response surface methodology (RSM) was performed with three parameters: sonication time ( $X_1$ : 5 to 20 min), pH ( $X_2$ : 4.0 to 7.0) and nisin concentration ( $X_3$ : 29.1  $\mu$ M to 291.1  $\mu$ M). The difference among the logarithm of the viable cell number (log CFU/mL) at the beginning of the experiment and at the end of each treatment was used for the construction of predictive model. Analysis of variance (ANOVA) and eight additional conditions were used for model validation. The behavior of *S. flexneri* after sonication in the presence of nisin and storage on refrigeration (7 °C) for 120 h was evaluated. For this, two conditions were established (10 min of US, pH 6.0 and 175  $\mu$ M nisin and 20 min of US, pH 4.5 and 175  $\mu$ M nisin). The leakage of ATP was also evaluated in these two conditions. For comparisons of the data, the teste Tukey was used to verify the existence of differences between the combined treatment (nisin + US) and the control groups. The level of significance was set at 5%. The results indicated that US is an efficient strategy for sensitize *S. flexneri* to the action of nisin. The combination of nisin with US resulted in synergism in the inactivation of this pathogen being that the higher inactivation observed was low pH, high nisin concentrations and longer sonication time, with a maximum reduction of approximately 5 logarithms cycles. The predictive model of the combination (nisin + US) showed coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.942 and

adjusted of 0.916, and the model was validated. Refrigerated storage after sonication in the presence of nisin resulted in the decline of the *S. flexneri* population at the end of storage time decreasing from 5.42 to 1.64 logarithm cycle at pH 6.0 treated with 10 min of sonication and 5.69 to 0.80 logarithm cycle at pH 4.5 when treated for 20 min sonication. The treatment of nisin with US caused the highest leakage of intracellular ATP, combined with US in both conditions tested. These results demonstrate the potential use of nisin combined to US as strategy for sanitation and food preservation.

## 1. INTRODUÇÃO

*Shigella* é uma bactéria patogênica, causadora de várias doenças e que pode ser encontrada em diversos alimentos. Esse patógeno é de preocupação no setor alimentar, sendo o seu controle um desafio a ser superado, pois nos dias atuais, ainda são relatados muitos surtos de infecção causados por esse micro-organismo. Diversos métodos de sanitização e conservação de alimentos são utilizados para inativar patógenos, entretanto, tratamentos drásticos podem promover perda na qualidade sensorial e nutricional dos alimentos. Assim, ao longo dos anos, métodos de conservação de alimentos menos drásticos foram desenvolvidos, como a utilização de alta pressão, irradiação, atmosfera modificada e uso de bacteriocinas.

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas produzidas por micro-organismos com atividade antimicrobiana sobre outros micro-organismos relacionados, a exemplo da nisina. Bactérias gram-positivas geralmente são sensíveis à ação de nisina, por outro lado, as gram-negativas são resistentes a ela. Essa resistência é explicada pela presença da membrana externa nas bactérias gram-negativas, que impede a difusão da bacteriocina até a membrana plasmática, onde exerceria sua ação. *Shigella flexneri* é uma bactéria gram-negativa, sendo assim, possivelmente resistente a nisina. Porém, a utilização de estratégias que desestabilizem a membrana externa e permite a difusão da mesma até seu sítio de ligação na membrana citoplasmática, torna essa bacteriocina eficiente na inativação desse patógeno.

O ultrassom (US) é uma tecnologia de uso relativamente recente na indústria de alimentos e que possui atividade de desestabilizar a membrana externa de bactérias gram-negativas. Essa desestabilização ocorre pelo processo de cavitação que provoca um dano físico e químico na parede celular da célula.

Assim, a busca por novas estratégias para sanitização e conservação de alimentos e a necessidade de se ampliar o espectro de ação da nisina contra bactérias gram-negativas, justificam a pesquisa com uso de nisina associado ao US, especialmente sobre *Shigella* dada a sua relevância como patógeno contaminante de alimentos.

Os métodos estatísticos, principalmente os planejamentos experimentais são utilizados para minimizar custos e tempo na obtenção de dados. A metodologia de

superfície de resposta é uma técnica estatística que gera modelos preditivos com interações lineares ou quadráticas, e que permite observar a relação de uma ou mais respostas com variáveis independentes. Neste estudo, a metodologia de superfície de resposta foi adotada para avaliar a redução, em escala logarítmica de *S. flexneri* em relação as variáveis independentes, tempo de sonicação, pH do meio de cultura e concentração de nisina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

*Shigella*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter* são algumas das bactérias associadas à doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados (DOYLE et al., 2015; NAGAR, PANSARE GODAMBE & SHASHIDHAR, 2017). O controle destes patógenos é de extrema importância, pois a presença deles em alimentos pode colocar em risco a saúde do consumidor (MUKHOPADHYAY & RAMASWAMY, 2012; D'OSTUNI et al., 2016). Embora qualquer patógeno possa representar problemas para a saúde pública, *Shigella* apresenta relevância especial, dado ao alto número de pessoas atingidas e o grande número de mortes relacionado à doença (BENNY et al., 2014; NAGAR, PANSARE GODAMBE & SHASHIDHAR, 2017). Estima-se que ocorram mais de 160 milhões de casos de shigelose anualmente em todo o mundo, com mais de 1 milhão de casos fatais (BENNY et al., 2014).

Assim, as indústrias buscam estratégias de conservação de alimentos que atendem às novas exigências dos consumidores, os quais buscam por produtos de alta qualidade e que não ofereçam risco à saúde (CÁRCEL et al., 2012; BONDI et al., 2014). Além das exigências impostas pelos consumidores, as legislações da área de alimentos tornaram-se mais rigorosas, o que resultou na elaboração de novas técnicas para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos (Doyle et al., 2015).

Durante anos, as indústrias têm tentado implementar estratégias que combinem a inativação de micro-organismos patogênicos e, ao mesmo tempo, preservar as características naturais dos alimentos (BIRMPA; SFIKA & VANTARAKIS, 2013; BONDI et al., 2014). Com este objetivo, têm sido desenvolvidos novos processos de conservação, com destaque para aqueles que não envolvem altas temperaturas e nem a utilização de conservantes que podem ser nocivos para a saúde humana (Franco-Vega, Ramirez-Corona, Lopez-Malo, & Palou, 2015).

Com base nestes fatos, a bioconservação é uma estratégia de processamento de alimentos que vem ganhando destaque atualmente (OGAKI; FURLANETO & MAIA, 2015). Este método refere-se à utilização de

micro-organismos e, ou de seus metabólitos, para aumentar a vida útil e a segurança dos produtos (VESKOVIĆ; DUKIĆ & MEMIŠI, 2014; TSIRAKI et al., 2017). Dentro deste conceito, a utilização de bacteriocinas em alimentos têm se destacado por estas serem consideradas substâncias naturais e algumas apresentarem atividade antimicrobiana sobre micro-organismos patogênicos e deterioradores (NASCIMENTO & MORENO, 2008; TSIRAKI et al., 2017).

## 2.1. Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizados ribossomicamente por bactérias gram-negativas e gram-positivas (BALI & PANESAR, 2014). Após a síntese ribossomal, são liberadas para o meio extracelular e atuam sobre outras bactérias estritamente relacionadas com efeito bacteriostático ou bactericida (DEEGAN et al., 2006; NISHIE; NAGAO & SONOMOTO, 2012). Além disso, as bacteriocinas oferecem vantagens competitivas para as espécies produtoras no ambiente microbiano (RILEY & WERTZ, 2002; DOBSON et al., 2012). Esse mecanismo de competitividade é bastante diversificado e complexo, onde os micro-organismos produtores são imunes a sua própria bacteriocina por possuírem proteínas de imunidade específica (Nagao et al., 2006). Entretanto, esses peptídeos podem atuar sobre bactérias pertencentes à mesma espécie (espectro de ação restrito) e, ou em bactérias de diferentes gêneros (amplo espectro de ação) (CINTAS et al., 2001; PEREZ; ZENDO & SONOMOTO, 2014).

A biossíntese destes antimicrobianos ocorre durante a fase exponencial, com pico máximo no meio ou no final desta fase ou, tardiamente, no início da fase estacionária (ZAMFIR et al., 2000; REA et al., 2011). Observa-se que a maior taxa de produção dessas substâncias ocorre sob condições de crescimento menos favoráveis (Zhang, Zhang, Liu, Han, & Zhou, 2012). Em experimentos *in vitro*, condições de estresse, tais como temperaturas sub ótimas, pH baixo, presença de compostos potencialmente tóxicos, microbiota competidora, aumento populacional e a escassez de nutrientes, entre outros fatores, estimulam a produção máxima destes antimicrobianos (DIEP & NES, 2002; SAAVEDRA et al., 2004; GHANBARI et al., 2009; OGAKI; FURLANETO & MAIA, 2015).

Grande parte das bacteriocinas é sintetizada na forma de um pré-peptídeo, inicialmente inativo, que posteriormente passa por alterações estruturais, como por exemplo, bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas (BAL) (Xie et al., 2004). Após modificações pós-traducionais, a bacteriocina torna-se ativa e, em seguida, é exportada da célula produtora (COTTER; HILL & ROSS, 2005; ZACHAROF & LOVITT, 2012). Os genes responsáveis pela regulação da codificação e produção destes antimicrobianos são, geralmente, encontrados em plasmídeos, porém, podem estar presentes no cromossomo ou em elementos genéticos móveis, como transposons (Deegan et al., 2006; Kjos et al., 2011). Esses genes estão organizados em um ou mais operons (NES; DIEP & HOLO, 2007; OGAKI; FURLANETO & MAIA, 2015).

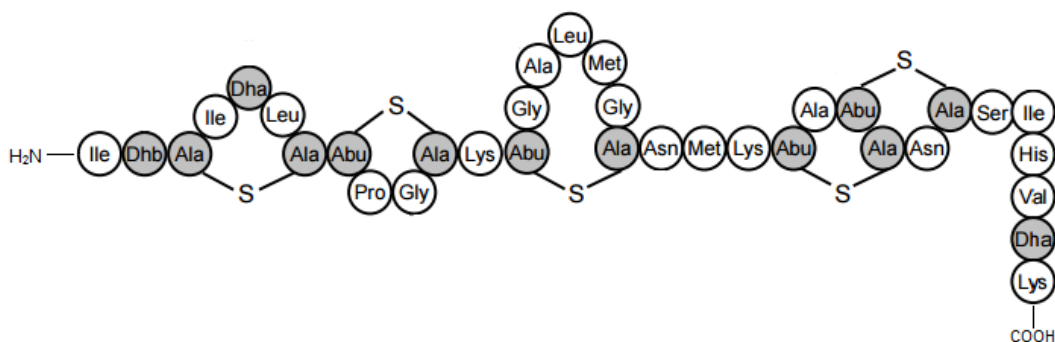
Portanto, as bacteriocinas possuem mecanismos capazes de inativar micro-organismos, como por exemplo, bactérias patogênicas contaminantes de alimentos e, deste modo, a utilização desses peptídeos nos alimentos, torna-se uma estratégia potencial na conservação, auxiliando na redução de conservantes químicos e na intensidade de tratamentos térmicos (KOPERMSUB; MAYEN & WARIN, 2011). Com esta alternativa, busca-se a produção de alimentos processados mais naturais e com poucas alterações nas características sensoriais e nutricionais, e assim, satisfazer a crescente demanda dos consumidores por produtos seguros, frescos, prontos para consumo e minimamente processados (KOPERMSUB; MAYEN & WARIN, 2011; VESKOVIĆ; DUKIĆ & MEMIŠI, 2014; TSIRAKI et al., 2017).

De todas as bacteriocinas já caracterizadas, nisina é uma das mais estudadas e autorizada para ser usada na indústria de alimentos como bioconservador em mais de 50 países (KAKATKAR; GAUTAM & SHASHIDHAR, 2017).

## **2.2. Nisina e sua aplicação na indústria de alimentos**

Nisina é um antibiótico, produzido por *Lactococcus lactis*, cujo uso na indústria de alimentos é permitido em diversos países, desde 1988, após a aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, reconhecendo-a como uma substância segura (*Substance generally recognized as safe* - GRAS) (DEEGAN et al., 2006; SOBRINO-LÓPEZ & MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Sua estrutura é alongada, composta por 34 resíduos de aminoácidos, com cinco ligações sulfídricas, massa molar de 3.510 Daltons e presença de anéis de lantionina (DAWSON & SCOTT, 2012), que são formados em razão da presença de aminoácidos raros como, lantionina e  $\beta$ -metilantionina (Figura 1) (NES et al., 1996; BAUER & DICKS, 2005).



**Figura 1** - Estrutura da nisina (HSU et al., 2004)

Sua atividade antimicrobiana está relacionada com a formação de poros pela ligação ao lipídeo II na parede celular de micro-organismos alvos, que conduz à dissipação da força próton-motriz (FPM), com modificações no potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) e no gradiente de concentração de  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) (SCHULZ; PEREIRA & BONELLI, 2003). Os poros formados ocasionam o extravasamento de eletrólitos e outros metabólitos, acarretando a morte celular (Garcia, Rodriguez, Rodriguez, & Martinez, 2010; Siroli et al., 2016). Nisina também atua interferindo na biossíntese do peptideoglicano (BROTZ & SAHL, 2000; CHUGUNOV et al., 2013).

As características da nisina como solubilidade, estabilidade e atividade são dependentes do pH e da temperatura, sendo que tanto a estabilidade quanto a solubilidade aumentam com a diminuição do pH. Assim, em condições alcalinas ou neutras, nisina é praticamente insolúvel (Penna, Jozala, Gentile, Pessoa Junior, & Cholewa, 2006). Em relação à estabilidade térmica, nisina suporta temperaturas de até 121 °C sem que ocorram modificações em sua estrutura (JOZALA et al., 2007).

Portanto, as opções para a aplicação deste antimicrobiano como conservante é bastante diversa em diferentes alimentos, como queijos, ovos líquidos, produtos de panificação, maionese, molhos para salada, dentre outros, sendo que a grande maioria das aprovações é para uso em produtos lácteos e enlatados (DISCHINGER;

BASI CHIPALU & BIERBAUM, 2014; SIROLI et al., 2016). No Brasil, nisina é permitida em queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg com objetivo de inibir *Clostridium* (BRASIL, 1996).

As desvantagens em relação a utilização da nisina incluem, sua baixa solubilidade em alimentos com pH próximo a neutralidade ou básicos, sua produção pode ter custo alto, além da composição e da microbiota do alimento que podem interferir na atividade antimicrobiana (FIELD et al., 2015; JALILZADEH; TUNÇTÜRK & HESARI, 2015).

De fato, nisina possui um poder inibitório sobre bactérias patogênicas e deterioradoras encontradas em diversos alimentos, principalmente as bactérias gram-positivas (WAN-NORHANA et al., 2012). Estudos demonstram que esse peptídeo é capaz de inativar micro-organismos gram-positivos como *L. monocytogenes* em mangas minimamente processadas (Barbosa, Silva de Araújo, Matos, Carnelossi, & Almeida de Castro, 2013) em carne de peixes picada (ABDOLLAHZADEH; REZAEI & HOSSEINI, 2014) ou em queijos Minas frescal (Pimentel-Filho, Mantovani, de Carvalho, Dias, & Vanetti, 2014), *S. aureus* em leite cru (Alves et al., 2016) ou pasteurizado (Shi et al., 2017), *Bacillus cereus* em leite refrigerado (Martinez, Alvarenga, Thomazini, F??varo-Trindade, & Sant'Ana, 2016) e *Clostridium butyricum* em molho de soja (LIU et al., 2013c).

Ao contrário, bactérias gram-negativas geralmente são resistentes a esse antibiótico em razão da presença da membrana externa, que atua como barreira protetora para a célula, impedindo que nisina seja adsorvida e inserida na membrana celular (Wan Norhana et al., 2012). Embora a atividade sobre bactérias gram-negativas seja baixa, estudos demonstram que nisina pode atuar sobre esses micro-organismos quando utilizada em conjunto com agentes químicos ou físicos capazes de desestruturar a membrana externa das células, tornando-as sensíveis à ação de nisina (ZOU et al., 2013; PRUDÊNCIO; DOS SANTOS & VANETTI, 2015).

A associação da nisina com agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) permitiu sua ação em *Salmonella* Typhimurium, com redução de até 3 ciclos logarítmicos na população de células viáveis (PRUDÊNCIO et al., 2015a). O mecanismo de ação do EDTA não está complementarmente elucidado, porém, sabe-se que ele atua desestabilizando a membrana externa de bactérias gram-negativas, possivelmente pela sua ligação com íons estabilizadores da

membrana como cálcio e magnésio, e assim, promove perturbação e ruptura dessa camada (ALAKOMI; SAARELA & HELANDER, 2003; BHATIA & BHARTI, 2014). Silva et al. (2016) avaliaram a combinação de nisina com óleo essencial de orégano sobre a inativação de *Salmonella* Enteritidis e relataram que houve sinergismo na inibição do crescimento deste patógeno quando as duas substâncias foram utilizadas em conjunto.

Outras estratégias, como ácidos orgânicos, campo elétrico pulsado, alta pressão e US são metodologias capazes de desestabilizar a membrana externa de bactérias gram-negativas (TECHATHUVANAN, 2012; TURGIS et al., 2012; GANESAN et al., 2015). Dentro deste contexto, o US é uma tecnologia recente utilizada na indústria de alimentos com capacidade de desestruturar a membrana externa de bactérias gram-negativas (LI et al., 2016b).

### **2.3. Ultrassom: definição e aplicação na indústria de alimentos**

Ondas de US são ondas sonoras com frequências que excedem o limite de audição do ouvido humano (~20 kHz) e, de acordo com sua faixa de frequência, podem ser divididas em ondas de baixa energia (frequências superiores a 100 kHz e intensidades abaixo de 1 W/cm<sup>2</sup>) e ondas de alta energia (frequências entre 20 e 500 kHz e intensidades superiores a 1 W/cm<sup>2</sup>) (KNORR et al., 2011; ASHOKKUMAR, 2015).

Trata-se de tecnologia não térmica, com diversas finalidades na indústria de alimentos. Estudos recentes demonstraram que o US pode ser usado em processos que envolvem congelamento e cristalização de alimentos (KIANI; ZHANG & SUN, 2013; ISLAM et al., 2015), secagem (MIANO; IBARZ & AUGUSTO, 2016; NASCIMENTO et al., 2015) desgaseificação (XU et al., 2014), filtração e separação (CHANDRAPALA et al., 2012; JAMBRAK et al., 2014) emulsificação (O'SULLIVAN et al., 2014), remoção de biofilmes (SÃO JOSÉ et al., 2012) e inativação de micro-organismos (TURANTAS; KILIÇ & KILIÇ, 2015).

Uma das aplicações promissoras do US de alta energia na indústria de alimentos envolve a inativação de micro-organismos (CRUZ-CANSINO et al., 2015; KHANDPUR & GOGATE, 2016). A inativação microbiana ocorre por causa do

processo de cavitação (intracelular e, ou extracelular), que é a formação, crescimento e colapso de bolhas de gás, as quais geram energia química e mecânica localizada, sendo esse o principal efeito bactericida da técnica (ZAFRA-ROJAS et al., 2013; SÃO JOSÉ & VANETTI, 2015; CIUFFREDA et al., 2015). Esse fenômeno ocorre, pois quando as ondas de som propagam-se através do meio líquido, promovem a compressão e expansão do sistema, com liberação de alta energia pelo colapso das bolhas de gás, criando ondas de choque (MASON & LORIMER, 2002). Essas ondas de choque possuem regiões de alta temperatura e pressão, que atingem até 5.500 K e 1.000 MPa, respectivamente, as quais podem danificar fisicamente a parede celular (SÃO JOSÉ et al., 2014; KHANDPUR & GOGATE, 2016). O processo cavitacional também gera a formação de radicais livres, pela hidrólise da água, o que pode provocar danos ao DNA da célula (KHANDPUR & GOGATE, 2016).

Estudos como o de Cregenzán-Alberti et al. (2014) mostraram que o aumento da intensidade e do tempo de tratamento com US foram os principais fatores para aumentar a redução de *E. coli* em leite cru. Resultados semelhantes foram observados por Gabriel (2014) na redução de *Salmonella* Typhimurium em suco de laranja e por Alarcón-Rojo et al. (2015) e Shamila-Syuhada et al. (2016) na inativação de *Salmonella* Typhimurium em leite.

Em carnes, por exemplo, para reduzir uma alta população microbiana é necessário a aplicação do US em altas intensidades ou tempo de sonicação muito prolongado (PANIWNYK, 2016). Porém, essas condições podem provocar modificações indesejáveis na estrutura e textura dos alimentos (PANIWNYK, 2016). Contudo, sua combinação com outras metodologias, permite a redução da intensidade e tempo de processamento (AWAD et al., 2012).

#### **2.4. Combinação do ultrassom com outras estratégias na inativação de micro-organismos**

Na literatura não foram encontrados trabalhos que demonstrem o efeito da combinação do US com bacteriocinas sobre patógenos alimentares, entretanto, sua combinação com outras estratégias de sanitização já foram avaliadas sobre diferentes micro-organismos patogênicos ou deterioradores (Tabela 1). O sinergismo

do US com diversas outras técnicas na inativação de micro-organismos foi reportado para redução de altas populações de bactérias patogênicas e de micro-organismos deterioradores (PANIWNYK, 2016). Os resultados demonstraram que a variação dos parâmetros do US, o micro-organismo, a matriz alimentar e o tratamento combinante podem afetar diretamente na redução da população microbiana.

Como observado na tabela 1, o US tem sido associado com diversas técnicas na inativação de diferentes micro-organismos. Sua associação com óleos essenciais, ozônio, campo elétrico pulsado, ácidos orgânicos, sanitizantes, dentre outros, apresentou resultados significativos na redução de populações microbianas. Sagong et al. (2011) avaliaram a inativação de *Salmonella* Typhimurium combinando US com ácido cítrico (2%) e tal associação resultou em redução de 3,18 ciclos logarítmicos do patógeno em alface orgânica. Rosário et al. (2017) tentaram inativar *S. enterica* associando o US com ácido acético (800 mg/L) e conseguiram uma redução de 1 ciclo logarítmico em morangos.

Quando US é empregado associado com agentes químicos como, por exemplo, peróxido de hidrogênio, o intenso gradiente de pressão gerado pelo US potencializa a penetração desse sanitizante na célula microbiana, provocando a morte celular (SHAMILA-SYUHADA et al., 2016). O sinergismo entre o US e óleos essenciais na inativação de patógenos alimentares já foi observado em diversos estudos. Quando combinado com o US, os óleos essenciais atuam em baixas concentrações e isso ocorre porque o US promove a sensibilização da parede celular microbiana, tornando a bactéria mais sensível à estas substâncias (OZCAN; ZORBA, 2015; MILLAN-SANGO et al., 2016). O US também tem se mostrado eficiente quando combinado com temperatura (termossonicação), pressão (manossonicação) ou temperatura e pressão (mano-termossonicação). Neste caso, a combinação com a temperatura e, ou pressão, pode acelerar a taxa de inativação microbiana e assim, diminuir o tempo e a temperatura de tratamento, não necessitando de temperaturas elevadas para atingir uma redução microbiana significativa (DEMIRDÖVEN & BAYSAL, 2008; ALARCÓN-ROJO et al., 2015).

**Tabela 1** - Associação do ultrassom a outros tratamentos na inativação de micro-organismo patogênicos e deterioradores.

<b>Frequência/intensidade do ultrassom</b>	<b>Tratamento associado</b>	<b>Tempo de tratamento (min)</b>	<b>Micro-organismos</b>	<b>Nº de ciclos logarítmicos reduzidos</b>	<b>Referência</b>
40 kHz e 150 W	Ácido cítrico (2%)	5	<i>Salmonella</i> Typhimurium	3,18	(SAGONG et al., 2011)
			<i>L. monocytogenes</i>	2,34	
612 kHz e 160 W	Ozônio	16	<i>E. coli</i>	5,30	(AL-HASHIMI; MASON & JOYCE, 2015)
24 kHz e 33.31 W/mL	Óleo essencial de canela (0,02 mg/mL)	30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,81	(SÁNCHEZ-RUBIO et al., 2016)
26 kHz e 200 W	Óleo essencial de orégano (0,025%)	5	<i>E. coli</i> 0157:H7	4,70	(MILLAN-SANGO et al., 2016)
40 W e 30 kHz	Dióxido de carbono acoplado a alta pressão (12 Mpa)	5	<i>L. monocytogenes</i>	7,5	(SARA; MARTINA & GIOVANNA, 2014)
37 kHz e 380 W	Hipoclorito de sódio (50 e 200 ppm)	5 – 100	<i>Cronobacter sakazakii</i>	0,65 até 4,44	(PARK; MIZAN & HA, 2016)
20 kHz e 600 W	Luz pulsada	30	<i>S. cerevisiae</i>	6,0	(FERRARIO; ALZAMORA & GUERRERO, 2015)
40 KHz e 130 W	Ácido peracético (40 mg/L)	10	Mesófilos	4,1	(SÃO JOSÉ & VANETTI, 2015)

Continuação tabela 1

Frequência/intensidade do ultrassom	Tratamento associado	Tempo de tratamento (min)	Micro-organismos	Nº de ciclos logarítmicos reduzidos	Referência
22.3 kHz e 1,43 W/mL	Temperatura (65 °C)	30	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	>5,0	(UGARTE-ROMERO; EDGAR FENG & MARTIN, 2007)
	Temperatura (40 °C)		<i>Shigella boydii</i>	> 5,0	
24 kHz e 65 µm	Peróxido de hidrogênio (0,1%)	5- 15	<i>S. aureus</i>	1,7 até 3,9	(SHAMILA-SYUHADA et al., 2016)
			<i>L. monocytogenes</i>	2,1 até 4,2	
			<i>Salmonella</i> Typhimurium	2,7 até 4,9	
			<i>E .coli</i>	2,7 até 4,9	
24 KHz e 85 W/cm2	Ácido málico (12g/100mL)	9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,7 até 4,9	(SALLEH-MACK & ROBERTS, 2007)
			<i>E .coli</i>	5,06	
24 KHZ e 210 W	Água eletrolisada (155mg/L de cloro livre)	30	<i>E. coli</i> O157:H7	4,07	(AFARI et al., 2016)
			<i>Salmonella</i> Typhimurium	5,15	
20 KHz e 750 W	Campo elétrico pulsado (12 kV/cm, 120 µs at 35 °C)	120	<i>S. cerevisiae</i>	3,48	(LYU et al., 2016)
40 KHz e 500 W	Ácido acético (800 mg/L)	5	<i>S. enterica</i>	1,0	(ROSÁRIO et al., 2017)

## 2.5. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um método estatístico baseado na utilização de delineamentos fatoriais para modelagem de diversos processos para descrever empiricamente variáveis que afetam uma determinada resposta (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Esta metodologia utiliza modelos matemáticos que podem conter funções polinomiais lineares, quadráticas ou de interações para explicar a relação entre as variáveis controladas (variáveis independentes) e uma ou mais respostas (variáveis dependentes) (RODRIGUES & LEMMA, 2014). Trata-se de uma técnica de otimização, composta basicamente de duas etapas: modelagem e deslocamento. Na modelagem ocorre o ajuste dos modelos lineares ou quadráticos aos resultados obtidos no planejamento experimental. Já no deslocamento, ocorre a busca para a máxima inclinação do modelo, que é o caminho onde a resposta varia de forma mais pronunciada (BEZERRA et al., 2008).

Na indústria de alimentos, por exemplo, é muito comum a existência de vários fatores que afetam a qualidade final do produto, assim, a MSR associada com metodologia de planejamento experimental é considerado como uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de processos, principalmente quando grande número de variáveis estão envolvidas (RODRIGUES & LEMMA, 2014). Por exemplo, a utilização da MSR na microbiologia preditiva, permite observar a relação de morte microbiana em função de variáveis independentes, tais como pH, temperatura, atividade de água, uso de aditivos, entre outros e deste modo, verificar a condição que promove a melhor redução na população microbiana (SHIVHARE & MCCREATH, 2010; RODRIGUES & LEMMA, 2014).

Segundo Mateus, Barbin e Conagin (2001), geralmente a MSR é utilizada em combinação com o delineamento composto central rotacional. Este planejamento consiste de um fatorial completo  $2^k$ , repetição do ponto central e dois pontos sobre os eixos de cada variável a uma distância  $\pm \alpha$  do ponto central, onde  $\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}}$ . Assim, um delineamento com três variáveis independentes totalizaria 17 ensaios, se o ponto central for repetido três vezes (SARAMAGO et al., 2008).

A validação dos modelos matemáticos gerados pode ser verificada empregando a análise de variância (ANOVA) por meio do coeficiente de

determinação ( $R^2$ ) e pela distribuição de *Fisher* (teste  $F$ ), considerando os graus de liberdade e o nível de significância ( $\alpha$ ) escolhido para os ensaios (JUNIOR, 2012).

O  $R^2$  é usado para averiguar a predição do modelo, sendo que quanto mais próximo o seu valor de 1, melhor será a predição realizada pelo modelo. O teste  $F$  consiste em verificar se o modelo matemático consegue explicar uma variação significativa dos dados experimentais, na qual se baseia em comparar o  $F$  calculado com o valor de  $F$  tabelado para a distribuição de referência usada. Para o modelo ser considerado válido, o valor de  $F$  calculado deve ser superior ao tabelado. A validação do modelo, também pode ser verificada realizando experimentos adicionais, os quais as combinações não são as mesmas para a montagem do modelo. Assim, com esses dados pode-se comparar os valores obtidos com os valores gerados pelo modelo (JÚNIOR, 2008; SARAMAGO et al., 2008)

As vantagens de usar este tipo de metodologia estatística é a economia de materiais utilizados, de recurso financeiros e tempo de execução, que é proporcionado pelo delineamento que gera curvas “iso-resposta”, o que permite a obtenção de resultados com diferentes proporções entre as variáveis independentes, sem a necessidade de se repetir exaustivamente os ensaios experimentais (JÚNIOR, 2012).

Constata-se que a busca por metodologias alternativas na sanitização e conservação de alimentos aumentou ao longo dos últimos anos para atender às exigências impostas pelos consumidores, que buscam por alimentos de alta qualidade e com preservação das características naturais, além de serem microbiologicamente seguros para consumo. Considerando que *Shigella* é um patógeno contaminante de alimentos e oferece risco à saúde do consumidor, tornam-se importantes estudos e desenvolvimento de novas estratégias que busquem contribuir para a segurança microbiológica do produto que é disponibilizado aos consumidores.

Assim, nisina associada ao US pode ser uma estratégia a ser avaliada na inativação de *Shigella* e que futuramente poderá ser aplicada na indústria alimentícia na sanitização e conservação de alimentos.

## **Objetivo geral**

Avaliar o efeito da nisina associada com ultrassom na inativação de *S. flexneri* em diferentes condições de pH.

## **Objetivos específicos**

- Estabelecer a melhor condição de tempo de sonicação, pH do meio e concentração de nisina para redução de *S. flexneri* utilizando a metodologia de superfície de resposta;
- Avaliar o efeito de nisina combinada com ultrassom na inativação de *S. flexneri* em condição de armazenamento em baixa temperatura
- Quantificar constituintes intracelulares extravasados após o tratamento com nisina e ultrassom.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia e no laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia do Departamento de Bioquímica, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

#### 3.1. Micro-organismos e condições de cultivo

A cultura de *S. flexneri* 2a (sorotipagem realizada pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (Laudo 266/17)) foi preparada inoculando uma alçada da cultura estoque em 10 mL de caldo infusão cérebro e coração (BHI, Oxoid, Inglaterra), a 37 °C por 22 a 24 h. Este procedimento foi realizado duas vezes antes do início dos testes.

*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 não produtora de nisina, mas sensível a ela, foi cultivado em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Himedia, Índia) a 37 ± 1 °C e foi utilizado para determinação da atividade antimicrobiana da bacteriocina.

#### 3.2. Preparo da solução de nisina

A solução estoque de nisina foi preparada pela diluição de 1 g de Nisaplin (2,5% Nisina, Nisaplin®, Danisco Brasil) em 5 mL de solução fosfato de sódio (5 mM, pH 2,0). A concentração final do estoque foi de 1.490,73 µM. Após o preparo, o estoque foi armazenado sob refrigeração até o início dos experimentos.

#### 3.3. Acompanhamento da temperatura do meio de cultura durante a sonicação

Primeiramente, foi verificado se existe alteração na temperatura do meio de cultura provocada pelo US durante os experimentos. Para isto, pipetou-se 10 mL de caldo BHI em tubos *Falcon* de 50 mL (Sarstedt, Alemanha) acondicionado em caixa

térmica com gelo. Uma sonda de 06 mm do US (20 kHz, Vibra Cell, VCX 130 W, Newtown, Estados Unidos) foi inserida em uma altura de até 2 cm abaixo da superfície do caldo. Utilizou-se amplitude de 100% do US e modo contínuo. A cada um minuto, a temperatura do meio foi verificada com auxílio de termômetro a laser (Infra Red Thermo-meter, CE, Reino Unido). Este procedimento foi realizado durante 20 min de sonicação, com os tubos em triplicata.

### **3.4. Análise da atividade da nisina após a sonicação**

O efeito do tratamento de US sobre a atividade antimicrobiana de nisina foi verificada em 10 mL de caldo BHI, com diferentes valores de pH (4,0; 5,5 e 7) contendo concentração final de 500  $\mu\text{M}$  de nisina. A sonicação ocorreu com a sonda do US em altura de até 2 cm abaixo da superfície do caldo BHI. O tubo *Falcon* estava dentro de uma caixa térmica com gelo. Após 20 min de sonicação, a atividade antimicrobiana do peptídeo foi avaliada pelo método de difusão em ágar MRS, usando *L. lactis* como indicador (JACK; TAGG & RAY, 1995). Alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  do caldo BHI foram pipetadas em orifícios com 5 mm de diâmetro em ágar MRS contendo, aproximadamente,  $10^5$  UFC/mL de *L. lactis*. Após incubação a 37 °C por 24 h, mediou-se o diâmetro do halo de inibição. Um controle sem nenhum tratamento foi realizado. Os experimentos foram repetidos três vezes.

### **3.5. Delineamento experimental**

O Delineamento composto central rotacional (DCCR) com três fatores foi utilizado para estabelecer a melhor condição de inativação de *S. flexneri* pelo uso do US combinado a nisina. As variáveis independentes foram tempo de sonicação ( $X_1$ : 5 a 20 min), pH ( $X_2$ : 4,0 a 7,0) e concentração de nisina ( $X_3$ : 29,1  $\mu\text{M}$  a 291,1  $\mu\text{M}$ ). O pH do meio de cultura foi ajustado utilizando uma solução de HCl 0,1 M. A tabela 2 apresenta os valores reais usados no DCCR. O ponto central foi repetido três vezes para avaliar as variações decorrentes das condições experimentais.

**Tabela 2** - Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizados no planejamento experimental para redução de *S. flexneri*

Variáveis independentes	Níveis codificados e reais				
	- 1,68	-1	0	+ 1	+ 1,68
Tempo de sonicação (min)	5,0	8,0	12,5	17,0	20,0
pH	4,0	4,6	5,5	6,4	7,0
Concentração de nisina ( $\mu\text{M}$ )	29,1	82,1	160,1	238,0	291,1

Com a falta de trabalhos que demonstram a inativação de *Shigella* com nisina e ultrassom foram escolhidos valores encontrados na literatura para inativação de *Salmonella*, assim, as variáveis independentes foram escolhidas de acordo com as seguintes justificativas:

Tempo de sonicação: Shamila-Syuhada et al. (2016) utilizaram tempo de sonicação de 5 a 15 min enquanto Afari et al. (2016) usaram o US por 30 min.

pH do meio: *Shigella* cresce na faixa de pH que varia entre 4,5 e 8, com pH ótimo próximo de 7. Entretanto, foram descartados valores acima de 7, pois a nisina possui melhor atividade em valores de pH abaixo de 5. Outro ponto que foi levado em consideração são os possíveis processos industriais que poderiam usar a nisina, como por exemplo na sanitização de sucos que possuem valores de pH baixo ou na água de sanitização de carnes, frutas e hortaliças que possui pH abaixo de 7.

Concentração de nisina: estudos prévios realizados por Prudêncio et al. (2016) mostraram que o crescimento de *Salmonella* é inibido em concentrações acima de 115  $\mu\text{M}$ . Como a proposta deste trabalho é avaliar a combinação de vários fatores na redução da população de *S. flexneri*, avaliou-se baixas concentrações de nisina associadas com os outros fatores. Além disso, concentrações de nisina acima de 115  $\mu\text{M}$  foram mantidas para ampliar a faixa de concentração que esta bacteriocina pode ser usada na indústria.

### 3.5.1. Tratamento de *S. flexneri* com nisina e ultrassom

Antes do início dos experimentos, a sonda do US foi sanitizada por imersão em álcool 70% por 15 min, seguida de lavagem com água esterilizada por duas vezes e seca com papel manteiga esterilizado. Células de *S. flexneri* foram

centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min e ressuspendidas em solução salina 0,85%. A partir desta solução, inoculou-se, aproximadamente, 10<sup>5</sup> UFC/mL em 10 mL de caldo BHI. A suspensão de células foi acrescida de nisina e submetida ao tratamento com US (amplitude de 100% e modo contínuo), de acordo com o delineamento experimental. Os resultados foram expressos em redução logarítmica de UFC/mL, onde a redução de *S. flexneri* foi computada pela diferença entre o logaritmo do número de células viáveis ao início do experimento e ao final de cada tratamento de acordo com a equação 1:

$$\text{Equação 1: } Y = \text{Log UFC/mL}_{\text{inicial}} - \text{Log UFC/mL}_{\text{final}}$$

onde *Y* representa a variável dependente (número de ciclos logarítmicos reduzidos de *S. flexneri*).

### 3.5.2. Construção e validação do modelo preditivo

Neste estudo, tempo de sonicação, pH e concentração de nisina foram as variáveis independentes, sendo que a variável dependente o número de ciclos logarítmicos reduzidos na população de *S. flexneri*. As respostas obtidas nos 17 ensaios do DCCR foram ajustadas por regressão linear múltipla utilizando-se o modelo polinomial quadrático descrito na equação 2:

$$\text{Equação 2: } Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 \text{pH} + \beta_3 \text{Nis} + \beta_4 T.T + \beta_5 \text{pH.pH} + \beta_6 \text{Nis.Nis} + \beta_7 T.\text{pH} + \beta_8 T.\text{Nis} + \beta_9 \text{pH.Nis}$$

Onde *Y* é a variável dependente (redução de *S. flexneri*),  $\beta_0$  a  $\beta_9$  são os coeficientes do modelo estimados pelo ajuste dos dados experimentais com probabilidade de 0,05, *T* é o tempo de sonicação e *Nis* é a concentração de nisina em  $\mu\text{M}$ .

Para verificar a existência de significância do modelo matemático utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste *F* para estimar os parâmetros estatísticos de predição do modelo. O nível de probabilidade usado foi de 0,05. Os dados foram gerados usando o programa Minitab, versão 17.0.

Os gráficos de superfície de resposta foram construídos usando os valores preditos dos modelos ajustados pelo programa Sigmaplot versão 12.0.

Além disso, posteriormente para avaliar a predição do modelo obtido, oito condições experimentais foram escolhidas aleatoriamente. Estas condições foram diferentes das condições previstas no delineamento experimental. Os experimentos foram realizados de acordo com o descrito no subitem 3.5.1. Os valores preditivos foram determinados conforme a equação matemática do modelo, nos quais os valores foram correlacionados com os valores observados em testes *in vitro*. Os testes de validação foram repetidos três vezes.

### **3.6. Sobrevivência de *S. flexneri* após a sonicação na presença de nisina e incubação em baixa temperatura**

Duas condições (10 min de sonicação, pH 6,0 e 175 µM de nisina e 20 min de sonicação, pH 4,5 e 175 µM de nisina) foram escolhidas para avaliação do comportamento de *S. flexneri* após a sonicação na presença de nisina. Controles com células tratadas com US, com nisina e células sem tratamento foram realizados. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito no subitem 3.5.1, porém após a sonicação, as amostras foram armazenadas sob refrigeração, a  $7 \pm 1$  °C. A cada 24 h foi realizada a determinação do número de células viáveis durante cinco dias (120 h). Os testes foram repetidos três vezes.

### **3.7. Contagem de células viáveis**

A contagem de células viáveis de *S. flexneri* citada nos subitens: 3.5.1; 3.5.2 e 3.6 foi feita após cada tratamento, pela técnica de plaqueamento em microgotas (MORTON, 2001) e, ou pela técnica de espalhamento em superfície em ágar padrão para contagem (PCA, Himedia, Índia). As placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 8

a 12 h, quando o plaqueamento foi por microgotas e por 48 h, quando as placas foram feitas por espalhamento do inóculo em superfície.

### 3.8. Quantificação de ATP

Após cada tratamento descrito no item 3.6, alíquotas da cultura foram retiradas para a análise de extravasamento de conteúdo intracelular. As células foram coletadas por centrifugação a 2500 g por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membranas com poros de 0,22 µm (Millipore®, Merck, Darmstadt, Alemanha) e armazenado a -20 °C para avaliação de constituinte extravasado.

A análise de ATP foi realizada com o kit Bac Titer-Glo™ Microbial Cell Viability Assay Reagent (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), em que a concentração de ATP é determinada pela mensuração dos níveis de luminescência, conforme o protocolo descrito pelo fabricante. Primeiramente, pipetaram-se 50 µL do sobrenadante com 50 µL do reagente contendo a enzima luciferase. A curva padrão foi preparada, pipetando-se o ATP em caldo BHI na concentração final de 100 µM e, a partir desta, realizaram-se diluições seriadas até 1 pM. Em placa escura de 96 poços, pipetaram-se 50 µL de cada diluição e 50 µL do reagente contendo a enzima. Após 15 min de reação, as leituras foram realizadas em leitor de luminescência (SpectraMax M5, Molecular Device, Sunnyvale, California, EUA), com emissão em 560 nm.

A curva padrão obtida apresentou R<sup>2</sup> de 0,995 e a equação gerada para calcular a concentração de ATP está descrita em equação 3:

$$\text{Equação 3: } Y = 693,97x + 774,18$$

onde: Y = concentração de ATP em µM

x = níveis de luminescência

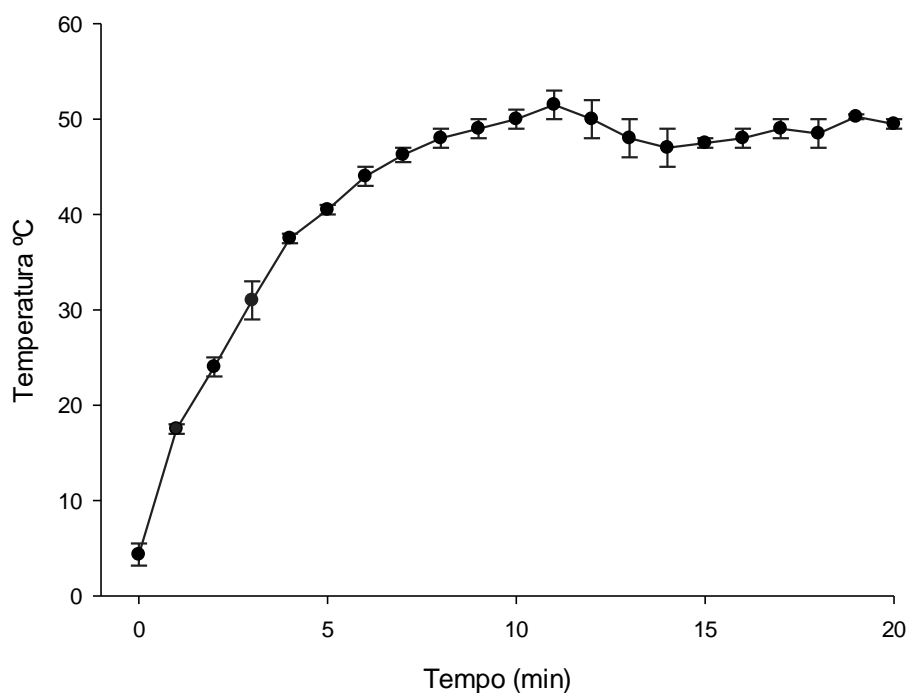
### **3.9. Análise estatística**

O teste Tukey foi usado para verificar a existência de diferença estatística entre o tratamento combinado (nisina + US) e os grupos controles na análise das oito condições da validação e na análise de ATP. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Temperatura do meio de cultura durante a sonicação

A variação da temperatura do caldo BHI causada pelo US ao longo do tempo de sonicação em banho de gelo foi determinada e aumentou abruptamente nos primeiros minutos de sonicação a 20 kHz, 130 W e amplitude de 100% (Figura 2).



**Figura 2** - Variação da temperatura de 10 mL do caldo BHI em banho de gelo causada pelo tratamento de ultrassom de 20 kHz, 130 W e amplitude de 100% ao longo de 20 min de sonicação.

A temperatura máxima de 52 °C obtida ao longo de 20 min de sonicação é próxima ao valor de 55 °C observado por Kirimli e Kunduhoglu (2016). Esses autores avaliaram o aumento da temperatura provocada pelo US (20 kHz), em tampão citrato, ao longo de 20 min em sistema de refrigeração fechado. De fato, o fenômeno de cavitação gera aumento da temperatura do meio sonicado, pois são formadas regiões com alta temperatura, que são produzidas durante a propagação das ondas de som (ZAFRA-ROJAS et al., 2013). Entretanto, como os tratamentos ocorreram

em banho de gelo, esta variação da temperatura foi parcialmente controlada após 9 min de sonicação (Figura 2).

Vários autores utilizaram estratégias para aplicação da sonicação em um sistema de refrigeração, no intuito de minimizar o aumento da temperatura, uma vez que temperaturas elevadas podem provocar morte microbiana e assim, confundir a análise dos dados (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2014; GANESAN et al., 2015; LI et al., 2016b).

#### 4.2. Atividade da nisina após a sonicação

O US não interferiu na atividade inibitória de nisina sobre *L. lactis* nos valores de pH avaliados, não sendo obtidos diâmetros de halos de inibição significativamente diferente dos controles ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3). Isto indica que nisina foi resistente ao processo de sonicação por 20 min nas condições usadas nos experimentos. De acordo com Awad et al. (2012), o US produz energia suficiente para promover mudanças conformacionais em proteínas, além de alterar atividade enzimática. Entretanto, o tempo máximo de tratamento usado neste estudo foi de 20 min, não sendo possível inferir se a sonicação prejudica a atividade desse antimicrobiano em um tempo maior de tratamento.

**Tabela 3** - Diâmetro (mm) dos halos de inibição do crescimento de *L. lactis* em ágar MRS provocada pela nisina tratada com ultrassom durante 20 min e em diferentes valores de pH.

Tratamento	pH		
	4,0	5,5	7,0
	Halo de inibição (mm)		
Nisina + US	11,5 <sup>a</sup> ± 0,5	11,8 <sup>a</sup> ± 0,8	11,2 <sup>a</sup> ± 0,8
Nisina (temperatura ambiente)	12,5 <sup>a</sup> ± 0,5	12,3 <sup>a</sup> ± 0,6	11,8 <sup>a</sup> ± 0,3

US = ultrassom; as médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A falta de informação sobre a influência do US sobre a atividade de bacteriocinas, especificamente nisina, torna difícil a comparação deste resultado

com outros trabalhos. Diversos estudos mostraram que nisina é resistente a tratamento térmico de 121 °C por 30 min, a tratamentos com alta pressão e dióxido de carbono (10 Mpa, 32 °C, 15 min), a radiação (5 kGy) e ao campo eletro pulsado (30 kV/cm, 99 µs, pulso 0,5 Hz) (JOZALA et al., 2007; SALDAÑA et al., 2010; LI et al., 2016a; KAKATKAR; GAUTAM & SHASHIDHAR, 2017).

#### 4.3. Construção do modelo preditivo para inativação de *S. flexneri* e validação

A tabela 4 apresenta os valores das combinações dos diferentes tempos de sonicação, pH e concentrações de nisina utilizados no planejamento experimental, acompanhados das respostas registradas em termos de número de ciclos logarítmicos reduzidos (log de UFC/mL).

**Tabela 4** - Condições experimentais e resultados obtidos do planejamento fatorial por DCCR na redução de *S. flexneri*.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y
1	8	4,6	82,1	0,80
2	17	4,6	82,1	2,76
3	8	6,4	82,1	0,57
4	17	6,4	82,1	1,62
5	8	4,6	238	2,44
6	17	4,6	238	3,81
7	8	6,4	238	1,56
8	17	6,4	238	2,09
9	5	5,5	160,1	1,70
10	20	5,5	160,1	3,40
11	12,5	4	160,1	2,07
12	12,5	7	160,1	0,74
13	12,5	5,5	29,1	1,95
14	12,5	5,5	291,1	3,15
15	12,5	5,5	160,1	2,41
16	12,5	5,5	160,1	2,11
17	12,5	5,5	160,1	2,21

X<sub>1</sub> = Tempo de sonicação em min, X<sub>2</sub> = pH do meio, X<sub>3</sub> = concentração de nisina em µM, Y = redução logarítmica (UFC/mL) de *S. flexneri*.

De acordo, com os resultados obtidos no planejamento experimental, observou-se que a maior redução de células viáveis de *S. flexneri* (3,81 ciclos logarítmicos) foi obtida nas condições do ensaio 6: 17 min de sonicação, pH do meio 4,6 e concentração de nisina de 238 µM e o menor valor (0,57 ciclos logarítmicos) na condição 3: 8 min de sonicação, pH do meio 6,4 e concentração de nisina de 82,1 µM.

A tabela 5 mostra o resultado da análise de regressão para a redução da população de células viáveis de *S. flexneri* utilizando as três variáveis analisadas. Foi observado, que todos os termos lineares, o termo quadrático do pH e a interação tempo de sonicação x pH foram significativos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5** - Coeficientes de regressão para redução de *S. flexneri*.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p *
Constante	-15,15	0,085	27,75	0,000
Tempo de sonicação	0,4242	0,118	8,09	0,000
pH	5,2931	0,118	-6,47	0,000
Nisina	0,0058	0,118	6,42	0,000
Tempo de sonicação <sup>2</sup>	0,0022	0,215	0,58	0,575
pH <sup>2</sup>	0,4659	0,203	-5,16	0,000
Nisina <sup>2</sup>	0,00001	0,230	0,77	0,460
Tempo de sonicação x pH	-0,0540	0,255	-2,38	0,036
Tempo de sonicação x nisina	0,0004	0,215	-1,81	0,114
pH x nisina	-0,0022	0,244	-1,77	0,115

\*Significativo  $p < 0,05$

O modelo de segunda ordem somente com os termos significativos ( $p < 0,05$ ) que descreve a redução da população de *S. flexneri* em ciclos logarítmicos em relação à variação do tempo de sonicação, do pH do meio e da concentração de nisina está expresso na equação 4:

$$\text{Equação 4: } Y = -15,15 + 0,424 T + 5,293 \text{ pH} + 0,005796 \text{ Nis} - 0,4659 \text{ pH}^2 - 0,0540 T \cdot \text{pH}$$

onde:

$Y$  = redução logarítmica (UFC/mL) de *S. flexneri*;

$T$  = tempo de sonicação;

$Nis$  = concentração de nisina em  $\mu\text{M}$ .

O modelo obtido pode ser considerado estatisticamente significativo, ao nível de confiança de 95%, uma vez que o teste  $F$  indicou um valor de  $F$  calculado superior ao  $F$  tabelado (Tabela 6).

**Tabela 6** - Análise de variância da redução da população de *S. flexneri*.

	GL	SQ	MQ	$F_{cal}$	$p$
Regressão	5	12,2139	2,44	36,19	<0,0001
Resíduos	11	0,7425	0,0675		
Falta de ajuste	9	0,6959	0,0773	3,31	0,253
Erro puro	2	0,0467	0,233		
Total	16	12,9564			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: médias dos quadrados;  $R^2 = 0,942$  e  $R^2$  ajustado = 0,916;  $F_{tab}$ : 3,20.

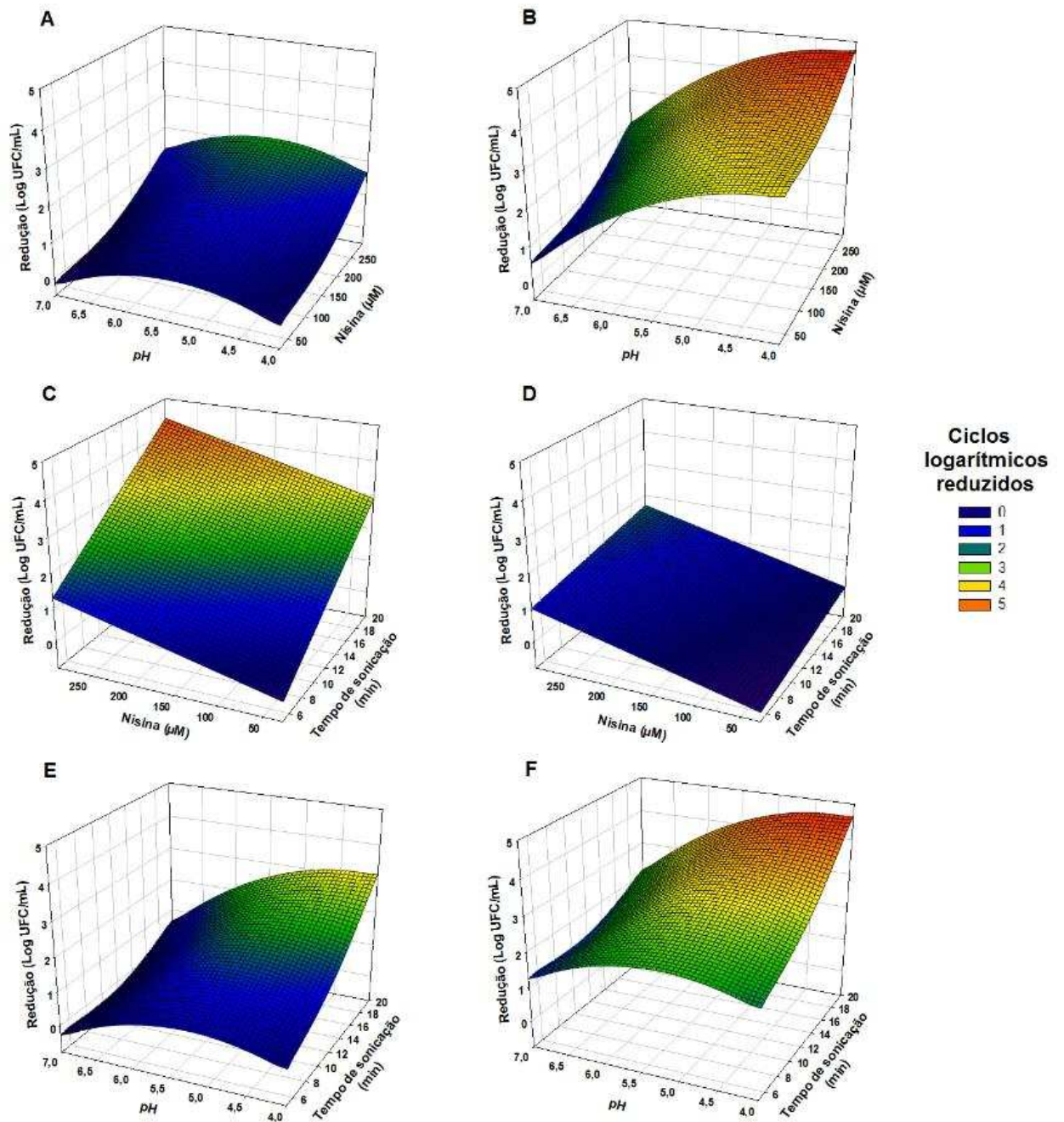
Observa-se que o modelo de inativação de *S. flexneri* utilizando a combinação de nisina e US, associada à alteração do pH, em um nível de confiança de 95%, apresentou falta de ajuste não significativo ( $p < 0,05$ ), além de um coeficiente de determinação estatisticamente significativo ( $R^2$  de 0,942 e  $R^2$  ajustado de 0,916) (Tabela 6). Este valor é considerado satisfatório para obtenção de um modelo válido e, possivelmente, útil para fins preditivos, pois 91,6% da variável dependente (redução de ciclos logarítmicos de UFC/mL) conseguem ser explicadas pelas alterações das variáveis independentes presentes no modelo ajustado (RODRIGUES & LEMMA, 2014). De acordo com Granato e Masson (2010), valores baixos do  $R^2$  ajustado (abaixo de 0,7) são indicadores de não adequação dos modelos para descrever a influência das variáveis independentes nas respostas.

Usando modelos preditivos, Nafar et al. (2013) encontraram  $R^2$  de 0,996 na inativação de *S. cerevisiae* em suco de uvas vermelhas, usando as variáveis frequência do US (0 a 135 kHz), temperatura (25 a 50 °C) e tempo de sonicação (20 a 40 min). Cregenzán-Alberti et al. (2014) utilizaram o delineamento composto

central (DCC) com 20 ensaios para encontrar a melhor condição de inativação de *E. coli* e *S. aureus* no leite, combinando a termossonicação (20 a 52 °C) com tempo de tratamento (40 a 240 s) e intensidade da sonicação (60 a 120 W/cm<sup>2</sup>). Os autores encontraram um modelo preditivo com R<sup>2</sup> de 0,90 nos dados de *E. coli* e 0,73 nos de *S. aureus*. Os autores concluíram que os valores previstos pelos modelos preditivos apresentaram correlação significativa com os valores observados. Gholami et al. (2014) avaliaram a inativação de *E. coli* em água, utilizando o delineamento experimental Box-Behnken, que também origina um modelo preditivo. Esses autores utilizaram as variáveis, ciclo de pulso do US (2, 6 e 10 min), tempo de sonicação (5, 7 e 9 min) e inóculo inicial (3, 6 e 9 ciclos logarítmicos de UFC/mL). O R<sup>2</sup> encontrado foi de 0,99 e, embora os autores não tenham validado o modelo, eles consideraram que a validação é uma etapa importante no planejamento de modelos preditivos, pois confirmam os resultados previstos pelo modelo.

Os gráficos de superfícies de resposta foram gerados de acordo com o modelo ajustado (Equação 4). Para fins comparativos, foram construídos modelos de superfícies de resposta fixando os valores mínimos (tempo de sonicação 5 min, pH 4 e concentração de nisina de 29,1 µM) e máximos (tempo de sonicação de 20 min, pH 7 e concentração de nisina 291,1 µM) das variáveis independentes (Figura 3).

Assim, mantendo o tempo de sonicação fixo de 5 min (Figura 3A), a inativação máxima obtida foi de, aproximadamente, 2 ciclos logarítmicos na faixa de pH entre 5,0 e 5,5 e em concentração de nisina maior que 250 µM. Porém, quando foi fixado o tempo de sonicação de 20 min (Figura 3B) observou-se que a mesma redução de 2 ciclos logarítmicos ocorreu entre o pH 4,0 e 6,0 e concentração de nisina acima de 50 µM. Este resultado demonstra que o tempo de sonicação de 20 min, contribui para o aumento da inativação de *S. flexneri* em baixa concentração de nisina, sendo alcançada redução de, aproximadamente, 5 ciclos logarítmicos na população de células viáveis.



**Figura 3** - Superfície de resposta para redução de *S. flexneri*, usando as três variáveis independentes: tempo de sonicação, pH e concentração de nisina. 3A: tempo de sonicação fixo de 5 min; 3B: tempo de sonicação fixo de 20 min; 3C: pH fixo 4; 3D: pH fixo 7; 3E: concentração de nisina fixo de 29,1  $\mu\text{M}$ ; 3F: concentração de nisina fixo de 291,1  $\mu\text{M}$ .

A figura 3C e 3D apresentam a relação entre a concentração de nisina e o tempo de sonicação, com os valores de pH fixados em 4 e 7, respectivamente. O pH foi a variável de maior impacto na redução de células de *S. flexneri*, uma vez que quando o pH foi 4 (Figura 3C), observou-se que o aumento no tempo de sonicação e na concentração de nisina, acarretou o aumento do número de inativação de células de *S. flexneri*, ultrapassando 4 ciclos logarítmicos. Ao contrário, foi observado que, quando o pH do meio foi 7,0 o número de ciclos logarítmicos reduzidos foi de, aproximadamente, 1,5 (Figura 3D).

A relação entre o pH e o tempo de sonicação está apresentada nas figuras 3E e 3F. A concentração fixa de 29,1  $\mu\text{M}$  de nisina reduziu, no máximo, 3 ciclos logarítmicos quando o pH variou entre 4,0 e 5,0 (Figura 3E). Entretanto, o aumento de 10 vezes na concentração de nisina provocou redução máxima de 4,5 ciclos logarítmicos (Figura 3F). Embora a diferença entre as concentrações de nisina avaliadas não seja muito grande, observou-se que 291,1  $\mu\text{M}$  de nisina permitiu a redução do número de células viáveis de *S. flexneri* em pH próximo de 7.

De maneira geral, analisando simultaneamente os gráficos de superfícies de resposta, percebe-se que maior redução de células viáveis de *S. flexneri* foram possíveis em regiões com tempo de sonicação de 20 min, pH do meio abaixo de 5 e concentração de nisina acima de 250  $\mu\text{M}$ .

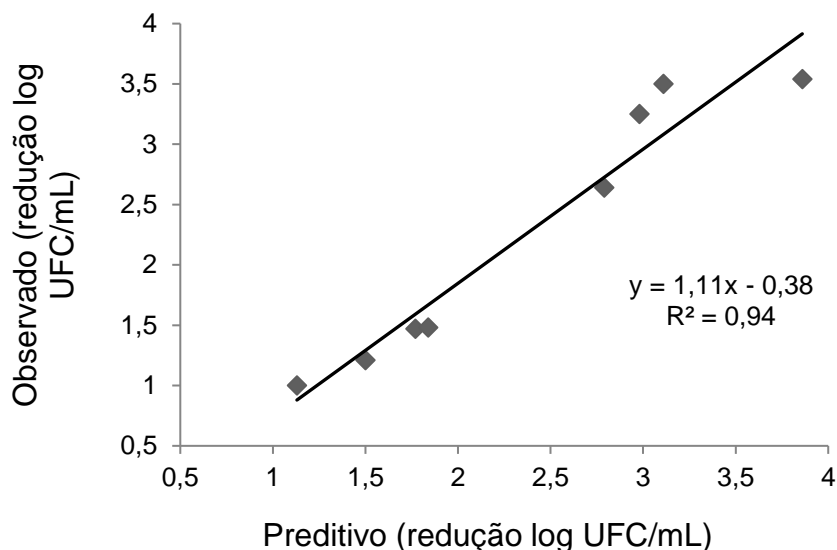
Após estabelecer o modelo de inativação com a combinação das três variáveis independentes, foram escolhidas aleatoriamente, oito condições para validação do modelo preditivo obtido. As oito combinações formadas são diferentes daquelas usadas na confecção do modelo descritos na tabela 4. Os valores preditivos foram calculados de acordo com a equação 4 com a finalidade de verificar se existe correlação significativa entre os valores obtidos pelo modelo preditivo e o observado na redução do número de ciclos logarítmicos de células viáveis *in vitro*.

A tabela 7 apresenta os valores obtidos pelo modelo preditivo e os observados nos experimentos de validação. Não existe diferença estatística entre o valor do número de ciclos logarítmicos reduzidos previstos e os observados ( $p > 0,05$ ), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,94 (Figura 4). Baseado nesses dados, pode-se sugerir que os valores preditivos apresentam ótima correlação com os valores observados e que o modelo da combinação descrito na equação 4 foi validado.

**Tabela 7** - Condições para validação do modelo preditivo de redução de número de ciclos logarítmicos na população de *S. flexneri* acompanhado dos resultados dos valores observados e preditivos.

Ensaio	Fatores			Redução (log UFC/mL)	
	Tempo de sonicação (min)	pH	Nisina (µM)	Valor observado *	Valor preditivo
1	15	4,5	145,54	2,64 ± 0,17	2,79
2	15	6,5	145,54	1,21 ± 0,24	1,50
3	18	5,0	93,16	3,25 ± 0,32	2,98
4	6	5,0	93,16	1,00 ± 0,27	1,13
5	12	4,8	46,57	1,47 ± 0,29	1,77
6	12	4,8	279,43	3,50 ± 0,17	3,11
7	10	6,0	174,65	1,48 ± 0,23	1,84
8	20	4,5	174,65	3,46 ± 0,06	3,86

\*não significativo ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4** - Correlação entre os valores de redução de ciclos logarítmicos na população de *S. flexneri* preditivo e observado das oito condições para validação do modelo do ultrassom associado com nisina.

Assim, o comportamento previsto pelo modelo na redução da população viável de *S. flexneri* utilizando os fatores tempo de sonicação, pH e concentração de nisina, representa significativamente o comportamento observado no teste *in vitro*. O DCCR pertencente à família de delineamentos eficientes, os quais requerem poucos ensaios para sua realização (BARROS NETO; SCARMINIO & BRUNS, 2001). Além disso, possui características interessantes para a busca do ponto que dê a resposta ótima. Essa necessidade de otimização dos experimentos minimiza custos e tempos operacionais (MATEUS; BARBIN & CONAGIN, 2001).

Assim pode-se afirmar que o modelo foi adequado para predizer a redução do número de células viáveis de *S. flexneri* expostas ao tratamento de US em diferentes valores de pH e diferentes concentrações de nisina.

O presente estudo mostra que o aumento da concentração de nisina promoveu maior redução da viabilidade de *S. flexneri* em pH baixo. Condições subletais de pH também promovem sensibilização da membrana externa de bactérias gram-negativas, que atua como uma barreira protetora para a célula (WUYTACK et al., 2003; ZOU et al., 2013). Essa sensibilização permite a ação de bacteriocinas sobre as células, culminando em morte celular (GALVÃO; PRUDÊNCIO & VANETTI, 2015; MEIRA; JARDIM & BRANDELLI, 2015). Além disso, como mostrado em análises de microscopia eletrônica de *E. coli* (LI et al., 2016b), o US promove desestruturação na membrana externa de bactérias gram-negativas, tornando a célula mais sensível a ação de outros agentes bactericidas.

Com base nesses dados, as três variáveis estudadas resultaram na inativação de *S. flexneri*. O aumento no tempo de sonicação, além de aumentar a temperatura do meio, também promove o acúmulo de regiões de alta pressão no meio líquido, que são geradas durante a propagação das ondas de som (KHANDPUR & GOGATE, 2016). As bolhas de gás presentes no meio, ao encontrarem regiões de alta pressão, explodem e formam ondas de choque com alta pressão e temperatura, que colidem diretamente com a parede celular da bactéria (CIUFFREDA et al., 2015). De acordo com os dados obtidos neste estudo, observa-se que, se o tratamento com o US ocorrer em meios com valores de pH abaixo de 5,0 a inativação de *S. flexneri* aumenta. Uma hipótese para explicar esse comportamento é que, após o US sensibilizar a membrana externa da célula, nisina conseguiu atingir a membrana citoplasmática e se ligou ao lipídeo II da membrana por ligação eletrostática, o que ocasiona a dissipação da força próton-motriz

(GARCIA et al., 2010). Essa dissipação altera o potencial de membrana e o gradiente de concentração de prótons, provocando a formação de poros na membrana (SIROLI et al., 2016). Os poros permitem o extravasamento de conteúdo intracelular e, conseqüentemente, provoca a morte da bactéria, sendo que em pH abaixo de 5, nisina possui maior atividade bactericida do que em meio próximo da neutralidade (CHUGUNOV et al., 2013).

Estes resultados mostraram que nisina é um aditivo potencialmente eficaz na inativação de *S. flexneri*, dependendo das condições em que é usado. O fato deste patógeno ser resistente à ação de nisina instiga a utilização de ferramentas que permitem a aplicação desse peptídeo na inativação de *S. flexneri* e, anteriormente, outros estudos reforçaram a necessidade da associação de nisina com outras tecnologias para obtenção de resultados satisfatórios. Govaris et al. (2010) mostraram que o óleo essencial de orégano e nisina atuaram de forma sinérgica na redução de *Salmonella* Enteritidis em carne de ovelha, no qual a combinação reduziu mais de 4 ciclos logarítmicos deste patógeno. Galvão, Prudêncio e Vanetti (2015) avaliaram diferentes condições de estresse para sensibilizar *Salmonella* Typhimurium antes do tratamento com nisina (500 AU), as condições utilizadas foram, estresse ácido (pH 4,5 por 2 h) frio (-26 °C por 2 h), térmico (55 °C por 10 min) e químico (EDTA por 30 min). Os resultados obtidos revelaram que após 6 h de armazenamento, células pré estressadas com ácido e EDTA na presença de nisina, foram reduzidas em 2,9 e 4,1 ciclos logarítmicos, respectivamente. Células pré estressadas pelo frio reduziram 3,5 ciclos logarítmicos e pelo tratamento térmico em 4,0 ciclos logarítmicos depois de 1 h de armazenamento. Esses resultados indicaram que diferentes condições de tratamento podem tornar *Salmonella* sensível à ação de nisina e assim, ocasionar morte celular o que irá resultar na redução no número de células viáveis .

Ndoti-Nembe et al. (2015) mostraram que a combinação da radiação com nisina reduziu significativamente a população de *Salmonella* Typhimurium em relação aos controles em mini cenouras. Nisina combinada com radiação gama também foi a estratégia adotada por Zahran (2015) na inativação de *E. coli* em carne de frango e o efeito sinérgico na associação desses tratamentos foi observado. Li et al. (2016a) utilizaram um sistema de alta pressão com dióxido de carbono com a adição de nisina na inativação de *E. coli*. Os resultados demonstraram que essa combinação reduziu 2,7 ciclos logarítmicos, enquanto que o controle, só com nisina,

reduziu 0,16 ciclo logarítmico. Estes estudos demonstraram efeito sinérgico na combinação de nisina com outras estratégias na inativação de patógenos gram-negativos, principalmente aquelas que atuam sobre a membrana externa.

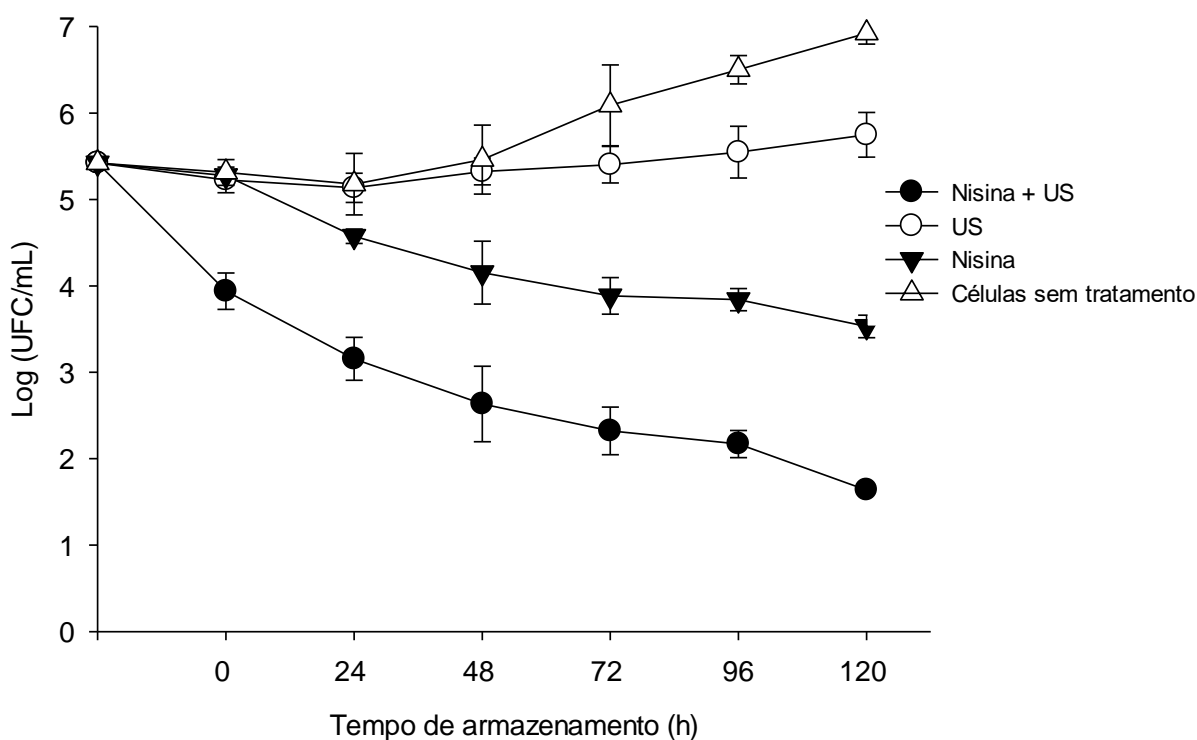
#### **4.4. Sobrevivência de *S. flexneri* após a sonicação na presença de nisina e incubação em baixa temperatura**

Duas condições usadas na validação foram escolhidas para avaliação do comportamento de *S. flexneri* após a sonicação na presença de nisina e incubação sob refrigeração (7 °C) por 120 h. A curva de inativação obtida com o tratamento na primeira condição (10 min, em pH 6,0 e 175 µM de nisina) encontra-se na figura 5. Observa-se que a combinação de nisina com US, promoveu uma redução de 1,48 ciclo logarítmico após os 10 min de sonicação com nisina (0 h), enquanto que os tratamentos, isoladamente, não promoveram redução na população de *S. flexneri*. Este comportamento também foi observado no tratamento com a segunda condição (20 min, pH 4,5 e 175 µM de nisina) (Figura 6), porém, o número ciclos logarítmicos reduzidos foi de 3,46. Este resultado está de acordo com o previsto pelo modelo preditivo, que estabeleceu redução maior de *S. flexneri* quando o tempo de sonicação é maior e o pH do meio é baixo.

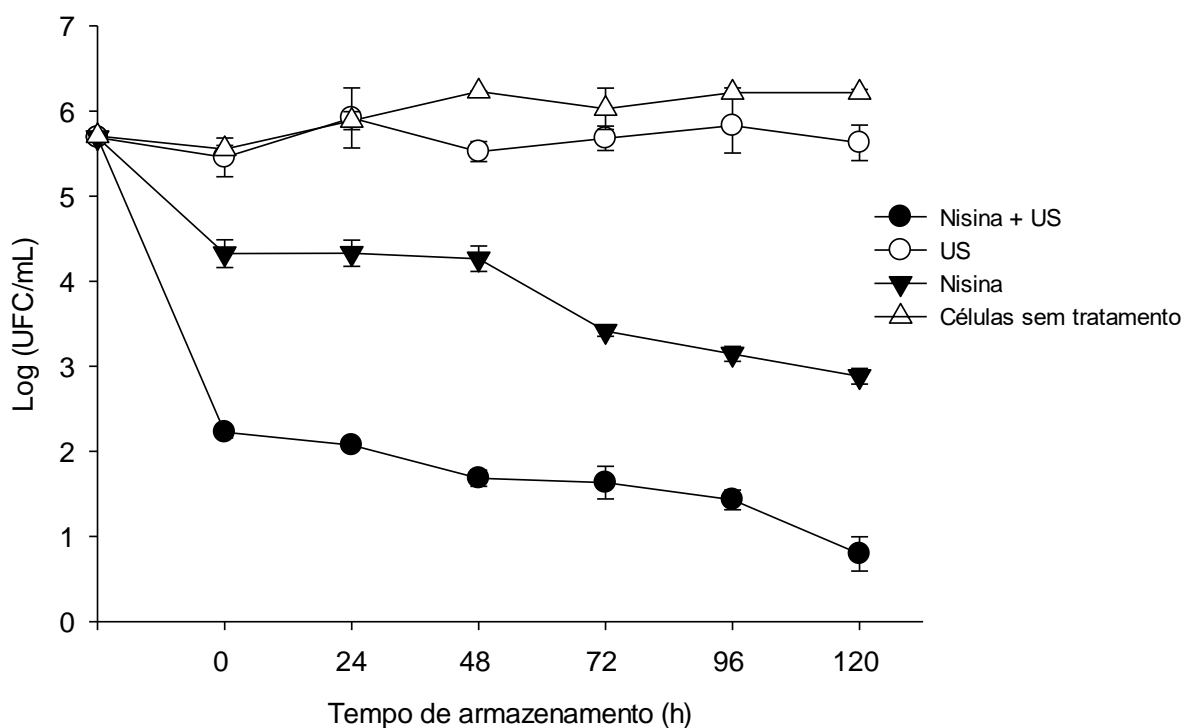
Os tratamentos controles, que consistiram de 175 µM de nisina em ambas as condições de pH, promoveram diferentes valores de redução da população de *S. flexneri*. Observa-se que em pH 6,0 o controle somente com nisina (Figura 5) não promoveu redução inicial no número de células (0 h), ao contrário do que observado em pH 4,5 (Figura 6) onde a redução foi de, aproximadamente, 1,3 ciclo logarítmico. Deve ser ressaltado que estes controles foram mantidos na temperatura de 52 °C em tempos diferentes (10 min na primeira condição e 20 min na segunda), sendo que somente na segunda condição (20 min, pH 4,5 e 175 µM de nisina) foi observada redução inicial no número de células viáveis.

A manutenção da cultura de *S. flexneri* a 7 °C após a sonicação mostrou que a inativação deste patógeno continua a ocorrer na presença de nisina. De acordo com as figuras 5 e 6, nisina atuou sobre a inativação de *S. flexneri* quando armazenada a 7 °C em ambas as condições de pH (4,5 e 6,0).

Em pH 6,0 nisina reduziu o número de células viáveis de 5,42 para 3,53 logarítmicos, enquanto que em pH 4,5 a redução foi de 5,69 para 2,88 ciclos logarítmicos ao final do armazenamento. Estes resultados mostram que nisina pode atuar sobre *S. flexneri*, em condições de refrigeração e que, em pH baixo, a redução é mais significativa. Estes resultados concordam com as observações de Galvão, Prudêncio e Vanetti (2015) e Prudêncio et al. (2016), que mostraram que a atividade bactericida da nisina é afetada pela alteração da temperatura e pH do meio, e que esta bacteriocina possui maior atividade contra este patógeno em pH baixo e temperatura de refrigeração.



**Figura 5** - Logaritmo do número de células viáveis de *S. flexneri* em caldo BHI, pH 6,0 acrescido de nisina 175 µM após sonicação de 10 min e armazenado a 7 °C por 120 h.



**Figura 6** - Logaritmo do número de células viáveis de *S. flexneri* em caldo BHI, pH 4,5 acrescido de nisina 175  $\mu$ M após sonicação de 20 min e armazenado a 7 °C por 120 h.

De forma geral, a redução do número de células viáveis de *S. flexneri* em caldo BHI com o pH 6,0 combinando o tratamento de US com nisina por 10 min foi de 3,78 ciclos logarítmicos (Figura 5) e em pH 4,5 após tratamento por 20 min, esta redução foi de 4,9 ciclos logarítmicos (Figura 6) ao final de 120 h de estocagem a 7 °C. Assim, a combinação de nisina com US em ambas as condições mostrou ser eficaz na redução de *S. flexneri*, entretanto, o efeito do US não é acumulativo e sim pontual, uma vez que a redução mais acentuada foi constatada logo após a sonicação (0 h) nas duas condições. Esse resultado indica que a combinação de US e nisina pode ser uma estratégia de sanitização para eliminar *S. flexneri* em alimentos, sendo que, se estes alimentos forem armazenados sob refrigeração, a inativação aumenta com o tempo.

Comparando o tratamento combinado (nisina + US) com os controles (US, nisina e sem tratamento) em ambas as condições no final do tempo de

armazenamento, observa-se diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Isso indica que a combinação dos fatores avaliados promoveu redução significativa na população de *S. flexneri* em relação aos controles.

A refrigeração é uma das principais estratégias na conservação de alimentos (FERNANDES et al., 2014). Deste modo, a adição de nisina nos alimentos refrigerados pode ser uma alternativa na redução de *S. flexneri* e outros patógenos alimentares e, quando associada ao US, pode promover redução significativa na população inicial destes micro-organismos. De acordo com Cao-Hoang et al. (2008) e Galvão, Prudêncio & Vanetti (2015), a refrigeração pode provocar danos nos lipídios da membrana e ocasionar alterações na permeabilidade dessa barreira, além de gerar a formação de canais transitórios. Possivelmente, nisina utilizou esses canais para conseguir ultrapassar a membrana externa e se ligar ao lipídeo II, durante o período do armazenando a 7 °C, visto que, em ambas as condições onde nisina estava presente, houve redução de *S. flexneri*.

Vários estudos mostraram que a refrigeração pode influenciar na atividade da nisina sobre patógenos alimentares. Pajohi et al. (2011) verificaram que concentrações de 0,25 e 0,5 µg/mL de nisina inibiram completamente o crescimento de *B. cereus* em sopa de cevada após 5 dias de refrigeração a 8 °C. Em condições de 25 °C, estes autores não observaram a inibição deste patógeno, pelo contrário, esse micro-organismo manteve o crescimento mesmo na presença de nisina. Um resultado contrário foi o observado por Wan Norhana et al. (2012) onde 500 AU/mL (Unidade Arbitrárias por mililitro) de nisina não reduziu a população de *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Senftenberg em camarões armazenados a 4 °C por 7 dias. Ao final do tempo de armazenamento os autores observaram o crescimento dos patógenos no alimento. Os mesmos ressaltaram que esse comportamento pode ter sido influenciado pelo pH do alimento que variou de 6,0 até 7,0. Como descrito na literatura, nisina possui maior atividade antimicrobiana em alimentos com baixo pH. Pimentel-Filho et al. (2014) combinaram nisina e bovicina HC5 (600 AU de cada bacteriocina) na inativação de *L. monocytogenes* em queijo Minas frescal armazenado a 4 °C e relataram que este patógeno não foi detectado em 25 g do alimento usando a técnica de enriquecimento seletivo após 9 dias de estocagem. Galvão, Prudêncio e Vanetti (2015) concluíram que condições de estresses usadas na indústria de alimentos como temperatura, pH e agentes

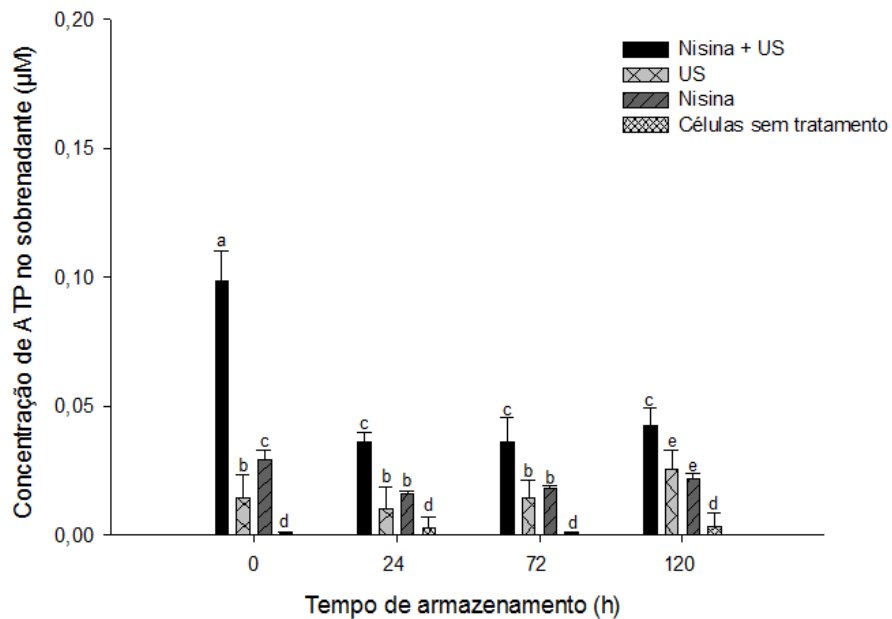
quelantes sensibilizaram células de *Salmonella* Typhimurium à ação de bacteriocinas

Em contrapartida, após as 120 h de armazenamento ainda houve contagem de células viáveis desse patógeno. Quando mantidos em temperatura baixa os micro-organismos podem apresentar modificações fisiológicas que permitem sua sobrevivência nesta condição (BOZIARIS & ADAMS, 2000). Em bactérias gram-negativas podem ocorrer modificações na membrana externa, que influenciam na resistência a essas condições adversas. Tais alterações possivelmente ocorrem no lipídeo A, no dissacarídeo N-acetilglicosamina, na cadeia carbônica ou nos fofolípídeos que, de uma maneira geral, alteram a carga negativa da membrana externa e assim diminuem a interação da bacteriocina com a célula (PRUDÊNCIO; VANETTI & PRIETO, 2015). Em condições de estresse ácido e presença de peptídeos antimicrobianos, o sistema PhoP-PhoQ de bactérias gram-negativas é ativo, e assim, sinaliza a transcrição de mais de 40 genes em resposta a esses estímulos (KAWASAKI, 2012). Tais proteínas codificadas por esses genes atuam na alteração das cargas dos polissacarídeos, dos ácidos graxos e de proteínas de membrana, que resulta nesse fenótipo de resistência (KAWASAKI, 2012). Entretanto, o mecanismo exato de resistência a nisina é pouco conhecido.

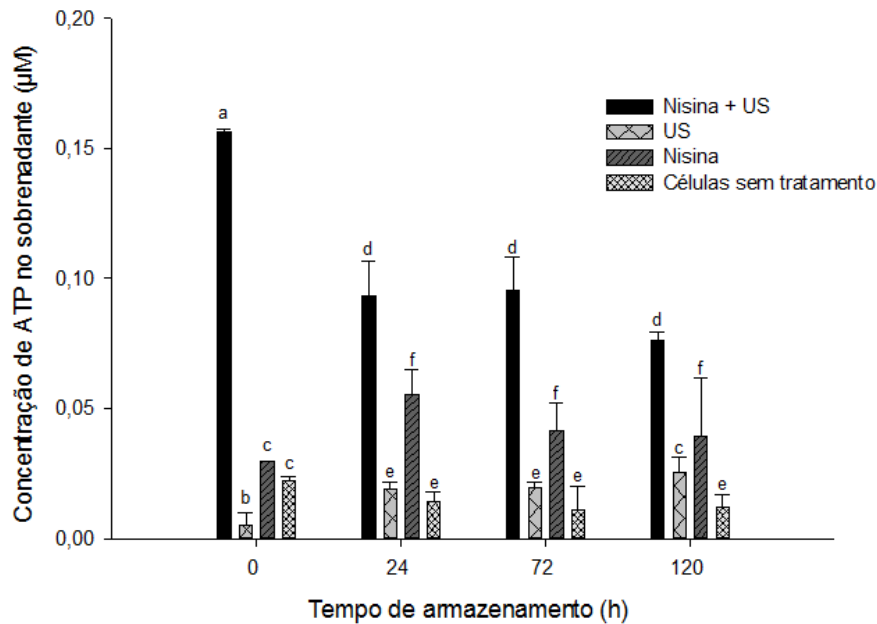
#### **4.5. Perda de ATP de células de *S. flexneri* tratadas com nisina e ultrassom**

O extravasamento de ATP foi avaliado nas duas condições testadas anteriormente (10 min de sonicação, em pH 6,0 e 175  $\mu$ M de nisina e 20 min de sonicação, em pH 4,5 e 175  $\mu$ M de nisina) e nos devidos tratamentos controles. O tratamento de *S. flexneri* somente com US não promoveu perda significativa de ATP para o meio externo, mas, a presença de nisina ocasionou o extravasamento de ATP das células, principalmente com a combinação com US (Figuras 7 e 8). Os resultados encontrados reforçam a ocorrência do mecanismo de ação da nisina, que age formando poros na membrana plasmática da célula alvo, promovendo o extravasamento de material intracelular. Além do ATP, os poros formados permitem a passagem de moléculas e íons essenciais para a sobrevivência da célula.

Como discutido anteriormente, sugere-se que a sonicação promoveu a ruptura ou sensibilização da membrana externa, tornando as células sensíveis a ação da nisina. Este efeito culmina com a morte de células de *S. flexneri* como verificado nas condições de tratamento avaliadas quando nisina foi adicionada no caldo BHI.



**Figura 7** - Extravasamento de ATP intracelular de células de *S. flexneri* em caldo BHI, pH 6,0 acrescido de nisina 175 µM após sonicação de 10 min e armazenado a 7 °C por 120 h. Tratamentos indicados com a mesma letra não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre si.



**Figura 8** - Extravasamento de ATP intracelular de células de *S. flexneri* em caldo BHI, pH 4,5 acrescido de nisina 175 µM após sonicação de 20 min e armazenado a 7 °C por 120 h. Tratamentos indicados com a mesma letra não diferiram ( $p>0,05$ ) entre si.

A maior concentração de ATP (0,15 µM) ocorreu logo após o tratamento com nisina e US em pH 4,5 (0 h) e, como avaliado anteriormente, esta condição foi a que resultou na maior inativação de *S. flexneri* (Figura 6).

Foi observado que o extravasamento de ATP ao longo do armazenamento da cultura de *S. flexneri* sob refrigeração diminuiu, embora o número de células viáveis tenha continuado a reduzir, como constatado anteriormente (Figuras 5 e 6). Isso sugere que, além do extravasamento de ATP, outros mecanismos estão envolvidos na morte deste patógeno na presença de nisina, como por exemplo, a inibição da biossíntese da parede celular e, ou o extravasamento de outros constituintes intracelulares.

De acordo com as figuras 7 e 8, observa-se que a maior concentração de ATP no meio extracelular ocorreu logo após o tratamento de nisina associada ao US. A perda de ATP para o meio externo causada por bacteriocinas também foi registrada por outros autores. Sonsa-Ard et al. (2015) avaliaram células de *L. monocytogenes* Scott A tratadas com nisina e verificaram um aumento na concentração de ATP extracelular de 12% em relação ao controle sem tratamento.

Liu et al. (2016b) observaram perda de ATP intracelular após 1,5 h de tratamento de células de *L. monocytogenes* com bifidocina A. Em *E. coli*, bifidocina A também induziu a perda de ATP após 30 min de tratamento (LIU et al., 2016c).

Além do ATP, íons como potássio já foram avaliados no meio extracelular após tratamentos com bacteriocinas. Minahk et al. (2000) observaram aumento na concentração de potássio extracelular após tratar células de *L. monocytogenes* com enterocina CRL35. Mantovani & Russell (2003) observaram redução na concentração de potássio intracelular em células *L. monocytogenes* tratadas com bovicina HC5. Zhou et al. (2008) estudaram este mesmo micro-organismo e obtiveram o mesmo padrão de resposta após tratamento com pentocina 31-1. Prudêncio et al. (2015b) mostraram que a presença de bovicina HC5 ocasiona danos no envelope celular das células de *Salmonella* Typhimurium, provocando o extravasamento de potássio.

Embora ainda não tenha sido relatado na literatura, a associação de nisina com US mostrou ser uma estratégia com potencial para ser utilizada na indústria, de preferência para alimentos de baixo pH, sendo que nessa condição ocorreu a maior inativação de *S. flexneri*. De forma geral, características como, degradação por proteases intestinais e não alteração das propriedades sensoriais dos alimentos (GHARSALLAOUI et al., 2016) tornam a nisina uma estratégia de interesse na inativação de patógenos contaminantes de alimentos. Entretanto, avanços tecnológicos devem ser alcançados na tentativa de expandir o uso desta bacteriocina sobre diversos grupos de micro-organismos, uma vez, que bactérias gram-negativas apresentam-se resistentes a ela.

## 5. CONCLUSÕES

A metodologia de superfície de resposta permitiu verificar a condição que melhor promove a inativação de *S. flexneri* e o modelo matemático foi validado.

A combinação de nisina com ultrassom promoveu redução de, aproximadamente, 5 ciclos logarítmicos na população de *S. flexneri* inoculada em caldo BHI. Esta associação mostrou ser mais eficiente quando o tempo de sonicação foi de 20 min e o pH do meio de cultura abaixo de 5 e concentrações de nisina acima de 250  $\mu\text{M}$ .

O armazenamento a 7 °C contribui para a inativação de *S. flexneri* na presença de nisina, isso indica que nisina pode ser usada em alimentos que são mantidos sob refrigeração.

O tratamento com nisina provoca o extravasamento de ATP intracelular, principalmente quando combinada com ultrassom.

Deve-se considerar que os experimentos conduzidos no presente estudo foram realizados em meio de cultura (caldo BHI) e, experimentos em matrizes alimentares são necessários para confirmar esse efeito bactericida, uma vez, que a matriz alimentar pode influenciar na propagação das ondas do US e na atividade da nisina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177–183, 2014.

AFARI, G. K.; HUNG, Y. C.; KING, C. H.; HU, A. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium DT 104 on fresh produce using an automated washer with near neutral electrolyzed (NEO) water and ultrasound. **Food Control**, v. 63, p. 246–254, 2016.

AL-HASHIMI, A. M.; MASON, T. J.; JOYCE, E. M. Combined effect of ultrasound and ozone on bacteria in water. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 19, p. 11697–11702, 2015.

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, n. 8, p. 2015–2021, 2003.

ALARCÓN-ROJO, A. D.; JANACUA, H.; RODRÍGUEZ, J. C.; PANIWNYK, L.; MASON, T. J. Power ultrasound in meat processing. **Meat Science**, v. 107, p. 86–93, 2015.

ALVES, F. C. B.; BARBOSA, L. N.; ANDRADE, B. F. M. T.; FABIANA, MARIANA ALBANO FURTADO, B.; PEREIRA, A. F. M.; RALL, V. L. M.; JÚNIOR, A. F. Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1–6, 2016.

ASHOKKUMAR, M. Applications of ultrasound in food and bioprocessing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 25, n. 1, p. 17–23, 2015.

AWAD, T. S.; MOHARRAM, H. A.; SHALTOUT, O. E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M. M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 410–427, 2012.

BALI, V.; PANESAR, P. Bacteriocins: Recent trends and potential applications. **Critical Reviews in Food**, v. 56, n. 5, p. 817–834, 2014.

BARBOSA, A. A. T.; SILVA DE ARAÚJO, H. G.; MATOS, P. N.; CARNELOSSI, M. A. G.; ALMEIDA DE CASTRO, A. Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 2, p. 135–140, 2013.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora UNICAMP, p. 289, 2001.

BAUER, R.; DICKS, L. M. T. Mode of action of lipid II targeting lantibiotics **International Journal of Food Microbiology**, v. 201, n. 2, p. 201–216, 2005.

BENNY, E.; MESERE, K.; PAVLIN, B.; YAKAM, L.; FORD, R.; YOANNES, M.; KISA, D.; ABDAD, M.; MENDA, L.; GREENHILL, A.; HORWOOD, P. A large outbreak of shigellosis commencing in an internally displaced population, Papua New Guinea, 2013. **Western Pacific surveillance and response journal: WPSAR**, v. 5, n. 3, p. 18-21, 2014.

BEZERRA, M.; SANTELLI, R.; OLIVEIRA, E.; VILLAR, L.; ESCALEIRA, L. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BHATIA, S.; BHARTI, A. Evaluating the antimicrobial activity of nisin, lysozyme and ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3504–3512, 2014.

BIERBAUM, G.; SAHL, H.-G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 2–18, 2009.

BIRMPA, A.; SFIKA, V.; VANTARAKIS, A. Ultraviolet light and ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 96–102, 2013.

BONDI, M.; MESSI, P.; HALAMI, P. M.; PAPADOPOULOU, C.; DE NIEDERHAUSERN, S. Emerging microbial concerns in food safety and new control measures. **BioMed Research International**, v. 14, p. 1–3, 2014.

BOZIARIS, I. S.; ADAMS, M. R. Transient sensitivity to nisin in cold-shocked Gram negatives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 233-237, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg. **Diário Oficial**. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1996.

BROTZ, H.; SAHL, H. G. New insights into the mechanism of action of lantibiotics - diverse biological effects by binding to the same molecular target. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1–6, 2000.

CAO-HOANG, L. MARECHAL, P.; LE-THANH, M.; GERVAIS, P. Synergistic action of rapid chilling and nisin on the inactivation of *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 105-109, 2008.

CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 200–207, 2012.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, 975–983, 2012.

CHUGUNOV, A.; PYRKOVA, D.; NOLDE, D.; POLYANSKY, A.; PENTKOVSKY, V.; EFREMOV, R. Lipid-II forms potential “landing terrain” for lantibiotics in simulated bacterial membrane. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–11, 2013.

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

CIUFFREDA, E.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. *Alicyclobacillus* spp.: New insights on ecology and preserving food quality through new approaches. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 625–640, 2015.

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

CREGENZÁN-ALBERTI, O.; HALPIN, R. M.; WHYTE, P.; LYNG, J.; NOCI, F. Suitability of ccRSM as a tool to predict inactivation and its kinetics for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* in homogenized milk treated by manothermosonication (MTS). **Food Control**, v. 39, n. 1, p. 41–48, 2014.

CRUZ-CANSINO, D. S. N.; RAMIREZ-MORENO, E.; RIVERA, J. E.; DELGADO-OLIVARES, L.; GARCIA, E.; ARIZA-ORTEGA, J. A.; MANRQUEZ-TORRES, D. J. J.; JARAMILLO-BUSTOS, D. P. Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, n. 1, p. 277–286, 2015.

D'OSTUNI, V.; TRISTEZZA, M.; DE GIORGI, M. G.; RAMPINO, P.; GRIECO, F.; PERROTTA, C. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in meat processed products from industrial plants in Southern Italy. **Food Control**, v. 62, p. 104–109, 2016.

DAWSON, M. J.; SCOTT, R. W. New horizons for host defense peptides and lantibiotics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 545–550, 2012.

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, n. 9, p. 1058–1071, 2006.

DEMIRDÖVEN, A.; BAYSAL, T. The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. **Food Reviews International**, v. 25, n. 1, p. 1–11, 2008.

DIEP, D.; NES, I. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. **Current Drug Targets**, v. 3, n. 2, p. 107–122, 2002.

DISCHINGER, J.; BASI CHIPALU, S.; BIERBAUM, G. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 1, p. 51–62, 2014.

DOBSON, A.; COTTER, P. D.; PAUL ROSS, R.; HILL, C. Bacteriocin production: A probiotic trait? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1–6, 2012.

DOYLE, M. P.; ERICKSON, M. C.; ALALI, W.; CANNON, J.; DENG, X.; ORTEGA, Y.; SMITH, M. A.; ZHAO, T. The food industry's current and future role in preventing microbial foodborne illness within the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 2, p. 252–259, 2015.

FERNANDES, P. A. R.; MOREIRA, S. A.; FIDALGO, L. G.; SANTOS, M. D.; QUEIRÓS, R. P.; DELGADILLO, I.; SARAIVA, J. A. Food preservation under pressure (Hyperbaric Storage) as a possible improvement/alternative to refrigeration. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n.1, p. 1–10, 2014.

FERRARIO, M.; ALZAMORA, S. M.; GUERRERO, S. Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. **Food Microbiology**, v. 46, p. 635–642, 2015.

FIELD, D.; COTTER, D.; ROSS, P.; HILL, C. Bioengineering of the model lantibiotic nisin. **Bioengineered**, v. 6, n. 4, p. 187-192, 2015.

FRANCO-VEGA, A.; RAMIREZ-CORONA, N.; LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Estimation of *Listeria monocytogenes* survival during thermoultrasonic treatments in non-isothermal conditions: Effect of ultrasound on temperature and survival profiles. **Food Microbiology**, v. 52, p. 124–130, 2015.

GABRIEL, A. A. Inactivation behaviors of foodborne microorganisms in multi-frequency power ultrasound-treated orange juice. **Food Control**, v. 46, p. 189–196, 2014.

GALVÃO, M. F.; PRUDÊNCIO, C. V.; VANETTI, M. C. D. Stress enhances the sensitivity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to bacteriocins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1137-1143, 2015.

GANESAN, B.; MARTINI, S.; SOLORIO, J.; WALSH, M. K. Determining the effects of high intensity ultrasound on the reduction of microbes in milk and orange juice using response surface methodology. **International Journal of Food Science**, v. 15, p.1–10, 2015.

GARCIA, P.; RODRIGUEZ, L.; RODRIGUEZ, A.; MARTINEZ, B. Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 8, p. 373–382, 2010.

GHANBARI, M.; REZAEI, M.; SOLTANI, M.; SHAH-HOSSEINI, G. Production of bacteriocin by a novel *Bacillus* sp. strain RF 140, an intestinal bacterium of caspian frisian roach (*Rutilus frisii kutum*). **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 10, n. 3, p. 267–272, 2009.

GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C.; DEGRAEVE, P. Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262–1274, 2016.

GHOLAMI, M.; MIRZAEI, R.; MOHAMMADI, R.; ZARGHAMPOUR, Z.; AFSHARI, A. Destruction of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* using low frequency ultrasound technology: A response surface methodology. **Health Scope**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2014.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M.; GIL, M. I.; ALLENDE, A.; BLANCKE, J.; SCHOUTETEN, L.; SELMA, M. V. Disinfection capacity of high-power ultrasound against *E. coli* O157:H7 in process water of the fresh-cut industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3390–3397, 2014.

GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P. S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 175–180, 2010.

GRANATO, D.; MASSON, M. L. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: A response surface approach. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 1090–1096, 2010.

HSU, S.; BREUKINK, E.; TISCHENKO, E.; LUTTERS, M.; KRUIJFF, B.; KAPTEIN, R.; VAN NULAND, N. The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 10, p. 963–967, 2004.

ISLAM, M. N.; ZHANG, M.; FANG, Z.; SUN, J. Direct contact ultrasound assisted freezing of mushroom (*Agaricus bisporus*): Growth and size distribution of ice crystals. **International Journal of Refrigeration**, v. 57, p. 46–53, 2015.

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

JALILZADEH, A.; TUNÇTÜRK, Y.; HESARI, J. Extension shelf life of cheese: A review. **International Journal of Dairy Science**, v. 10, n. 2, p. 44–60, 2015.

JAMBRAK, A. R.; MASON, T. J.; LELAS, V.; PANIWNKY, L.; HERCEG, Z. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 121, n. 1, p. 15–23, 2014.

JOZALA, A. F.; DE ANDRADE, M. S.; DE ARAUZ, L. J.; PESSOA, A.; PENNA, T. C. V. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 7, p. 515–528, 2007.

JÚNIOR, J. **Métodos estatísticos aplicados à melhoria da qualidade**. Editora UFV, p. 237–255, 2008.

KAKATKAR, A. S.; GAUTAM, R. K.; SHASHIDHAR, R. Combination of glazing, nisin treatment and radiation processing for shelf-life extension of seer fish (*Scomberomorous guttatus*) steaks. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 130, p. 303–305, 2017.

KAWASAKI, K. Complexity of lipopolysaccharide modifications in *Salmonella enterica*: Its effects on endotoxin activity, membrane permeability, and resistance to antimicrobial peptides. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 493-501, 2012.

KHANDPUR, P.; GOGATE, P. R. Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 337–353, 2016.

KIANI, H.; ZHANG, Z.; SUN, D.-W. Effect of ultrasound irradiation on ice crystal size distribution in frozen agar gel samples. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 126–131, 2013.

KIRIMLI, S.; KUNDUHOGLU, B. Inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* using power ultrasound at different temperatures, ph and water activity conditions. **Italian Journal of Food Science**, v. 28, n. 1, p. 64–72, 2016.

KJOS, M.; BORRERO, J.; OPSATA, M.; BIRRI, D. J.; HOLO, H.; CINTAS, L. M.; SNIPEN, L.; HERNÁNDEZ, P. E.; NES, I. F.; DIEP, D. B. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Microbiology**, v. 157, n. 12, p. 3256–3267, 2011.

KNORR, D.; FROEHLING, A.; JAEGER, H.; REINEKE, K.; SCHLUETER, O.; SCHOESSLER, K. Emerging technologies in food processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 203–235, 2011.

KOPERMSUB, P.; MAYEN, V.; WARIN, C. Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 605–612, 2011.

LI, H.; XU, Z.; ZHAO, F.; WANG, Y.; LIAO, X. Synergetic effects of high-pressure carbon dioxide and nisin on the inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 180–186, 2016a.

LI, J.; AHN, J.; LIU, D.; CHEN, S.; YE, X.; DING, T. Evaluation of ultrasound induced damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1828–1837, 2016b.

LIU, G.; REN, G.; ZHAO, L.; CHENG, L.; WANG, C.; SUN, B. Antibacterial activity and mechanism of bifidocin A against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 73, p. 1–8, 2016a.

LIU, G.; SONG, Z.; YANG, X.; GAO, Y.; WANG, C.; SUN, B. Antibacterial mechanism of bifidocin A, a novel broad-spectrum bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04. **Food Control**, v. 62, p. 309–316, 2016b.

LIU, J.; MIAO, S.; HUANG, W.; TURNER, E. R.; LUO, Y.; LI, J.; WANG, Q.; YAN, S. Identification of *Clostridium butyricum* as the bacteria causing soy sauce explosion and leakage and its control using nisin. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 509–513, 2013c.

LYU, C.; HUANG, K.; YANG, N.; WANG, H.; WANG, J. Combination of thermosonication and pulsed electric fields treatments for controlling *Saccharomyces cerevisiae* in chinese rice wine. **Food Bioprocess Technology**, v. 9, n. 11, p. 1854–1864, 2016.

MARTINEZ, R. C. R.; ALVARENGA, V. O.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; SANT'ANA, A. DE S. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 67–75, 2016.

MASON, T. J.; LORIMER, J. P. The Uses of power ultrasound in chemistry and processing. **Applied Sonochemistry**, v. 1, p. 304–305, 2002.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum Technology**, v. 23, n. 6, p. 1537–1546, 2001.

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, n. 1, p. 77–83, 2003.

MEIRA, S. M. M.; JARDIM, A. I.; BRANDELLI, A. Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays. **Food Chemistry**, v. 188, n. 1, p. 161–169, 2015.

MIANO, A. C.; IBARZ, A.; AUGUSTO, P. E. D. Mechanisms for improving mass transfer in food with ultrasound technology: Describing the phenomena in two model cases. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 413–419, 2016.

MILLAN-SANGO, D.; GARRONI, E.; FARRUGIA, C.; VAN IMPE, J. F. M.; VALDRAMIDIS, V. P. Determination of the efficacy of ultrasound combined with essential oils on the decontamination of *Salmonella* inoculated lettuce leaves. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 80–87, 2016.

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, n. 1, p. 79–83, 2000.

MINITAB. **Minitab Statistical Software**. Version 17.0. Pennsylvania State University, United States, 2014.

MORTON, R. D. Aerobics Plate Count. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ª edição. American Public Health Association-APHA, Washington, United States, p.63-67, 2001.

MUKHOPADHYAY, S.; RAMASWAMY, R. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 666–677, 2012.

NAFAR, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; YOUSEFI, S.; HASHEMI RAVAN, M. An Optimization study on the ultrasonic treatments for *Saccharomyces cerevisiae* inactivation in red grape juice with maintaining critical quality attributes. **Journal of Food Quality**, v. 36, n. 4, p. 269–281, 2013.

NAGAO, J.; ASADUZZAMAN, S. M.; ASO, Y.; OKUDA, K.-I.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 139–149, 2006.

NAGAR, V.; PANSARE GODAMBE, L.; SHASHIDHAR, R. Radiation sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Shigella* spp. and *Aeromonas* spp. on food and food-contact surfaces. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 1, p. 258-265, 2017.

NASCIMENTO, E. M. G. C.; MULET, A.; ASCHERI, J. L. R.; DE CARVALHO, C. W. P.; CÁRCEL, J. A. Effects of high-intensity ultrasound on drying kinetics and antioxidant properties of passion fruit peel. **Journal of Food Engineering**, v. 170, p. 108–118, 2015.

NASCIMENTO, M.; MORENO, I. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120–127, 2008.

NDOTI-NEMBE, A.; VU, K. D.; HAN, J.; DOUCET, N.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of nisin, essential oil, and  $\gamma$  -irradiation treatments against high load of *Salmonella* Typhimurium on mini-carrots. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 7, p. 1544–1548, 2015.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HÅVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 70, p. 113-128, 1996.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HOLO, H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 1189–1198, 2007.

NISHIE, M.; NAGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. **Biocontrol Science**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2012.

O’SULLIVAN, J.; MURRAY, B.; FLYNN, C.; NORTON, I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 141–154, 2014.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

OZCAN, G.; ZORBA, N. N. D. Combined effect of ultrasound and essential oils to reduce *Listeria monocytogenes* on fresh produce. **Food Science & Technology International**, v. 22, n. 4, p. 353–362, 2015.

PAJOHI, M. R.; TAJIK, H.; FARSHID, A. A.; HADIAN, M. Synergistic antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum L.* seed and nisin in a food model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 4, p. 943–951, 2011.

PANIWNYK, L. Applications of ultrasound in processing of liquid foods (A Review). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, p. 1–32, 2016.

PARK, S. Y.; MIZAN, M. F. R.; HA, S.-D. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in head lettuce by using a combination of ultrasound and sodium hypochlorite. **Food Control**, v. 60, p. 582–587, 2016.

PENNA, T. C.; JOZALA, A. F.; GENTILE, T. R.; PESSOA JUNIOR, A.; CHOLEWA, O. Detection of nisin expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the effects of nisin with EDTA. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129–132, p. 334–346, 2006.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 1-13, 2014.

PIMENTEL-FILHO, N. DE J.; MANTOVANI, H. C.; DE CARVALHO, A. F.; DIAS, R. S.; VANETTI, M. C. D. Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 416–422, 2014.

PRUDÊNCIO, C. V.; DOS SANTOS, M. T.; VANETTI, M. C. D. Strategies for the use of bacteriocins in gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5408–5417, 2015.

PRUDÊNCIO, C. V.; FERREIRA, S. O.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Morphological changes in *Salmonella* Typhimurium caused by the lantibiotic bovicin HC5 in association with EDTA. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 373–379, 2015a.

PRUDÊNCIO, C.; MANTOVANI, H. C.; CECON, P. R.; PRIETO, M.; VANETTI, M. C. D. Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to nisin combined with EDTA. **Food Control**, v. 61, p. 248–253, 2016.

PRUDÊNCIO, C.; MANTOVANI, H.; CECON, P.; VANETTI, M. Differences in the antibacterial activity of nisin and bovicin HC5 against *Salmonella* Typhimurium under different temperature and pH conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 18–26, 2015b.

PRUDÊNCIO, C.; VANETTI, M.; PRIETO. Tolerance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to nisin combined with EDTA is accompanied by changes in cellular composition. **Food Research International**, v. 69, p. 281-288, 2015.

REA, M. C.; DOBSON, A.; O'SULLIVAN, O.; CRISPIE, F.; FOUHY, F.; COTTER, P. D.; SHANAHAN, F.; KIELY, B.; HILL, C.; ROSS, R. P. Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 4639–44, 2011.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, n. 5–6, p. 357–364, 2002.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Editora Cárita, 3ª edição, Campinas, São Paulo, p. 153-162, 2014.

ROSÁRIO, D. K. A.; DA SILVA MUTZ, Y.; PEIXOTO, J. M. C.; OLIVEIRA, S. B. S.; DE CARVALHO, R. V.; CARNEIRO, J. C. S.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; BERNARDES, P. C. Ultrasound improves chemical reduction of natural contaminant microbiota and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* on strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 23–29, 2017.

SAAVEDRA, L.; MINAHK, C.; DE RUIZ HOLGADO, A. P.; SESMA, F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH<sub>2</sub>-terminal sequence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2778–2781, 2004.

SAGONG, H. G.; LEE, S. Y.; CHANG, P. S.; HEU, S.; RYU, S.; CHOI, Y. J.; KANG, D. H. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 287–292, 2011.

SALDAÑA, G.; PUÉRTOLAS, E.; CONDÓN, S.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 290–298, 2010.

SALLEH-MACK, S. Z.; ROBERTS, J. S. Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 3, p. 323–329, 2007.

SÁNCHEZ-RUBIO, M.; TABOADA-RODRÍGUEZ, A.; CAVA-RODA, R.; LÓPEZ-GÓMEZ, A.; MARÍN-INIESTA, F. Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 140–146, 2016.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; ANDRADE, N. J. DE; RAMOS, A. M.; VANETTI, M. C. D.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, J. B. P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, v. 45, p. 36–50, 2014.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; VANETTI, M. C. D. Application of ultrasound and chemical sanitizers to watercress, parsley and strawberry: Microbiological and physicochemical quality. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, p. 946–952, 2015.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; VANETTI, M. C. D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v. 24, n. 1, p. 95-99, 2012.

SARA, S.; MARTINA, C.; GIOVANNA, F. High pressure carbon dioxide combined with high power ultrasound processing of dry cured ham spiked with *Listeria monocytogenes*. **Food Research International**, v. 66, p. 264–273, 2014.

SARAMAGO, P.; STEFFEN JÚNIOR, V.; SILVA J.; SARAMAGO, S. Planejamento de experimentos e otimização de sistemas mistos. **FAMAT em Revista**, v. 11, p. 231–246, 2008.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R. Bacteriocinas : Mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 229–235, 2003.

SHAMILA-SYUHADA, A. K.; CHUAH, L. O.; WAN-NADIAH, W. A.; CHENG, L. H.; ALKARKHI, A. F. M.; EFFARIZAH, M. E.; RUSUL, G. Inactivation of microbiota and selected spoilage and pathogenic bacteria in milk by combinations of ultrasound, hydrogen peroxide, and active lactoperoxidase system. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 120–125, 2016.

SHI, C.; ZHANG, X.; ZHAO, X.; MENG, R.; LIU, Z.; CHEN, X.; GUO, N. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **Food Control**, v. 71, p. 10–16, 2017.

SHIVHARE, M.; MCCREATH, G. Practical considerations for DoE implementation in quality by design. **Bioprocess International**, v. 8, n. 6, p. 2230–2240, 2010.

SIGMAPLOT. **Systat Software SigmaPlot**. Version 12.0. San Jose, California, United States, 2003.

SILVA, J.; SOUZA, E.; MODESTA, R.; GOMES, I.; SILVA, O.; FRANCO, B. Antibacterial activity of nisin, oregano essential oil, EDTA, and their combination against *Salmonella* Enteritidis for application in mayonnaise. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 83-91, 2016.

SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D. I.; VANNINI, L.; SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. **Food Microbiology**, v. 54, p. 11–19, 2016.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 4, p. 329–343, 2008.

SONSA-ARD, N.; RODTONG, S.; CHIKINDAS, M. L.; YONGSAWATDIGUL, J. Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. **Food Control**, v. 54, p. 308–316, 2015.

TSIRAKI, M. I.; KARAM, L.; ABIAD, M. G.; YEHIA, H. M.; SAVVAIDIS, I. N. Use of natural antimicrobials to improve the quality characteristics of fresh “Phyllo” - A dough-based wheat product - Shelf life assessment. **Food Microbiology**, v. 62, p. 153–159, 2017.

TURANTAS, F.; KILIÇ, G. B.; KILIÇ, B. Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. **International Journal of Food Microbiology**, v. 198, p. 59–69, 2015.

TURGIS, M.; VU, K. D.; DUPONT, C.; LACROIX, M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 696–702, 2012.

UGARTE-ROMERO, EDGAR FENG, H.; MARTIN, S. E. Inactivation of *Shigella boydii* 18 IDPH and *Listeria monocytogenes* Scott A with power ultrasound at different acoustic energy densities and temperatures. **Food Microbiology and Safety**, v. 72, n. 4, p. 103–107, 2007.

UMU, ZGUEN C. O.; BAEUERL, C.; OOSTINDJER, M.; POPE, P. B.; HERNANDEZ, P. E.; PEAREZ-MARTOANEZ, G.; DIEP, D. B. The potential of class II bacteriocins to modify gut microbiota to improve host health. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–22, 2016.

VESKOVIĆ, S. M. M.; DUKIĆ, D. A.; MEMIŠI, N. R. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review. **Acta Periodica Technologica**, v. 45, n. 1, p. 271–283, 2014.

WAN NORHANA, M. N.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A. Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 °C. **Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 43–50, 2012.

WUYTACK, E. Y.; PHUONG, L. D. T.; AERTSEN, A.; REYNS, K. M. F.; MARQUENIE, D.; DE KETELAERE, B.; MASSCHALCK, B.; VAN OPSTAL, I.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 1, p. 31–37, 2003.

XIE, L.; MILLER, L. M.; CHATTERJEE, C.; AVERIN, O.; KELLEHER, N. L.; VAN DER DONK, W. A. Lacticin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 679–681, 2004.

XU, M.; LIU, Q.; MA, D.; WU, G.; HU, B.; MA, L. Effects of ultrasound on the degassing of molten steel in the RH refining process. **Steel Research International**, v. 85, n. 5, p. 771–775, 2014.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.

ZAFRA-ROJAS, Q. Y.; CRUZ-CANSINO, N.; RAMÍREZ-MORENO, E.; DELGADO-OLIVARES, L.; VILLANUEVA-SÁNCHEZ, J.; ALANÍS-GARCÍA, E. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1283–1288, 2013.

ZAHRAN, D. A. Combinations of nisin and  $\gamma$  irradiation to improve microbiological quality of minced chicken during refrigerated storage. **Life Science Journal**, v. 12, n. 2, p. 147–152, 2015.

ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; CORNEA, P. C.; DE VUYST, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 305–308, 2000.

ZHANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, S.; HAN, Y.; ZHOU, Z. Modelling growth and bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* PA003 as a function of temperature and pH value. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1388–400, 2012.

ZHOU, K.; ZHOU, W.; LI, P.; LIU, G.; ZHANG, J.; DAI, Y. Mode of action of pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from chinese traditional ham. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 817–822, 2008.

ZOU, Y.; JUNG, L. S.; LEE, S. H.; KIM, S.; CHO, Y.; AHN, J. Enhanced antimicrobial activity of nisin in combination with allyl isothiocyanate against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium and *Shigella boydii*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 324–333, 2013.