

Denys Schulz

Avaliação toxicológica do extrato bruto antibacteriano de
Bacillus amyloliquefaciens R 10

Florianópolis
2008

Denys Schulz

Avaliação toxicológica do extrato bruto antibacteriano de
Bacillus amyloliquefaciens R 10

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Cleide Rosana Vieira Batista

Florianópolis
2008

Avaliação toxicológica do extrato bruto antibacteriano de

Bacillus amyloliquefaciens R 10

por

Denys Schulz

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela comissão formada por:

Presidente:

Profa. Dra. Cleide Rosana Vieira Batista (UFSC)

Membro:

Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis (USP/RP)

Membro:

Profa. Dra. Mercedes Gabriela Ratto Reiter (FURB)

Membro:

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC)

Membro:

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC)

Coordenadora:

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2008.

Aos meus pais, Ingo Schulz e Lourita Koprovski Schulz e para a estimada professora Dra. Cleide Rosana Vieira Batista, pelas preciosas orientações prestadas durante o longo caminho acadêmico percorrido até esse maravilhoso momento, bem como pelas palavras confortáveis que serviram de apoio nas horas mais difíceis para que eu pudesse realizar meus objetivos e sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de vida;

Aos meus pais Ingo Schulz (*28/05/1951 Timbó/SC) e Lourita Koprovski Schulz (*19/08/1951 Indaial/SC) pelo incentivo, suporte financeiro, amor e carinho para que eu jamais desistisse de meus sonhos;

À minha irmã Alyne Schulz (*29/05/1979 Rio dos Cedros/SC), pelo incentivo, cooperação, carinho e amizade;

Aos meus avós Ingobert Schulz (*26/12/1927 Timbó/SC e +07/05/1988 Timbó/SC, *in memoriam*), Anita Gerda Schulz, nascida Gebauer (*29/06/1930 Gaspar, distrito de Blumenau/SC, registrada em Timbó/SC e +14/07/1993 Blumenau/SC, *in memoriam*), Leopoldo Koprovski (*11/12/1909 Indaial/SC e +02/11/1984 Indaial/SC, *in memoriam*) e Anna Koprovski, nascida Coninck (*13/07/1908 Morro Pelado, distrito de Indaial/SC, atualmente limite entre Apiúna/SC e Ibirama/SC e +26/12/1995 Indaial/SC, *in memoriam*) pelo exemplo de luta e carinho;

Aos meus bisavós Leopoldo Schulz (*14/07/1901 Timbó/SC, registrado em Indaial/SC e +23/08/1972 Braço do Trombudo/SC, *in memoriam*), Marie Schulz, nascida Koffke (*18/02/1902 Indaial/SC e +08/07/1979 Indaial/SC, *in memoriam*), Ernst Paul Gebauer (*07/02/1897 *Kleinkugel*, registrado em *10/02/1897 *Dieskau, Landkreis Saalkreis, Bundesland Sachsen Anhalt, Deutschland* e +24/11/1960 Timbó/SC, *in memoriam*), Minna Elisabeth Gebauer, nascida Hörnig (*18/01/1898 e registrada em *22/01/1898 em *Bretzig, Regierungsbezirk Dresden, Landkreis Kamenz, Bundesland Sachsen, Deutschland* e +13/07/1947 Timbó/SC, *in memoriam*), Ludwig Koprowski (*13/03/1869 *Preußen*, atualmente Polônia e +03/12/1959 Lontras/SC, *in memoriam*), Josephina Koprowski, nascida Geisler (*14/05/1872 Indaial/SC e +22/05/1960 Lontras/SC, *in memoriam*), João Coninck (*20/09/1866 Ilhota/SC e +??/??/194? Aurora, distrito de Rio do Sul/SC, *in memoriam*) e Carolina Coninck, nascida Maes (*27/08/1872 Ilhota/SC e +11/10/1944 Aurora, distrito de Rio do Sul/SC, *in memoriam*) pelo exemplo de luta e carinho;

Não posso deixar de agradecer e relembrar algumas datas e fatos históricos que levaram meus ascendentes (dignos heróis) a escolher Santa Catarina, no sul do Brasil, para viver, são eles:

(1) A família do patriarca August Friedrich Ferdinand Schulz (*21/06/1836 *Preußen* e +25/11/1897 Indaial/SC, *in memoriam*), conhecido como Augusto Schulz, de *Voigtshagen, Kreis Naugard, Pommern, Preußen* (atualmente *Wojtaszyce, Gmina Dobra, Powiat Iobeski, Województwo Zachodnio-Pomorskie, Polónia*), sua esposa Friederike Henriette Wilhelmine Krüger (*1839 *Preußen, in memoriam*), conhecida como Henriette Schulz e o seu filho Herrmann Friedrich Wilhelm Schulz, conhecido como Hermann Schulz (*06/01/1862 *Voigtshagen, Kreis Naugard, Pommern, Preußen*; +02/09/1921 Timbó/SC, registrado em Indaial/SC, *in memoriam*). Essa família emigrou pelo Porto de *Hamburg* em 10/05/1868 com o navio *Victoria* sob o comando do capitão *Laura (in memoriam)*. Chegaram à Colônia Blumenau em 12/07/1868, onde se estabeleceram no lote nº 18 do XXI Distrito do Rio Benedito, margem esquerda (região atualmente pertencente ao município de Timbó/SC), conforme registros de Dr. Hermann Bruno Otto Blumenau (*in memoriam*). Tanto a certidão de casamento de August Friedrich Ferdinand Schulz com Friederike Henriette Wilhelmine Krüger (registrado no *Jahrgang: 1861, Seite: 177, Nummer: 2*) quanto a certidão de batismo de Herrmann Friedrich Wilhelm Schulz (registrado no *Jahrgang: 1862, Seite: 54, Nummer: 2*) estão arquivadas no *Landeskirchliches Archiv* da *Pommersche Evangelische Kirche* em *Greifswald* na Alemanha. Hermann Schulz casou-se com Bertha Heller (*15/07/1866 Sternitz, residia em *Hohenwardin, Kreis Belgard, Pommern, Preußen*, atualmente *Wardyń Górny, Gmina Polczyn-Zdrój, Powiat świdwiński, Województwo Zachodnio-Pomorskie, Polónia*, +22/04/1943 Blumenau/SC, *in memoriam*), em 20/07/1882 na Paróquia Evangélica do Badenfurt de Blumenau/SC, cujo registro foi realizado no Ofício do Registro Civil, Títulos e Documentos do Cartório Braga Varela® de Blumenau/SC em 23/04/1883, n. 333, fls. 98 e liv. n. B-1. Agradeço a todos os integrantes dessa família pela coragem e força que os fizeram emigrar para adquirir aqui no sul do Brasil seu sonhado pedaço de terra onde cultivaram seu próprio alimento, sustentaram sua família e acima de tudo, encontraram paz, uma vida digna para contribuir para o desenvolvimento da Colônia Blumenau e para a fundação do município de Timbó/SC;

(2) A família do patriarca Ludwig Koprowski (nascido por volta de 1836, *Preußen*, atualmente Polónia, +20/06/1913 Indaial/SC, *in memoriam*), que emigrou para a Colônia *Sandweg* (Caminho das Areias) de Indaial/SC, onde se

estabeleceram no lote nº 38, em 1874. Ludwig Koprowski era casado com Anna Koprowska, nascida Tarnowska (*21/02/1838 *Preußen*, atualmente Polônia, +03/08/1920 Indaial/SC, *in memoriam*), sepultada no cemitério Caminho das Areias em Indaial/SC. Ludwig Koprowski casou-se com Anna Tarnowska (*in memoriam*), provavelmente em 1861, na Parafii Pieniążkowo, localizada na região de Kwidzyn na Província de Pomorskie na Polônia. Vários integrantes da família afirmam que seu filho também chamado Ludwig Koprowski (*in memoriam*), meu bisavô, nasceu no navio durante a viagem para o Brasil. A investigação do local de procedência desse patriarca torna-se muito difícil, quer seja pela falta, extravio ou destruição da documentação no Brasil ou na Polônia, país esse que durante as sangrentas guerras foi invadido e dividido entre os prussianos, russos e pelo Império Austro-Húngaro. Agradeço a esses antepassados pela bravura, força e coragem de emigrar para o sul do Brasil em busca de paz e por melhores condições de vida, bem como por participarem da fundação da cidade de Indaial/SC, minha querida terra natal, onde nasci em 19/08/1977;

(3) Ao patriarca Ernst Paul Gebauer (*in memoriam*) e sua esposa Minna Elisabeth Gebauer, nascida Hörnig (*in memoriam*), que em 14/09/1922 embarcaram no porto de *Hamburg* com destino ao Rio de Janeiro onde chegaram em 03/10/1922 (permanecendo temporariamente na Hospedaria de Imigrantes – Ilha das Flôres), e depois transferidos para Santa Catarina, estabelecendo-se definitivamente em Timbó/SC, pela coragem, força e vontade de buscar novas oportunidades de trabalho e melhores condições de vida no sul do Brasil, sua nova pátria, quando aqui chegaram ainda traumatizados pela 1ª Guerra Mundial.

(4) A família do patriarca Leo De Coninck (natural da Bélgica, de onde emigrou com 48 anos, *in memoriam*) residente em *St. Bavon* na Bélgica (*Gent*) que embarcou no porto de *Ostende* a bordo do navio belga *Adèle*, capitão Cornelisse (*in memoriam*) em 30/05/1846 com destino a Santa Catarina – Brasil (MAES, 2005). Segundo Dr. John Everaert (apud MAES, 2005), do *Inst. Koloniale & Maritieme Geschiedenis* da *Universiteit Gent* da Bélgica, os imigrantes desse navio faziam parte de um projeto que propunha introduzir o cultivo do linho no Brasil. A família dos patriarcas Eugene Maes (natural de *Aarsele* na Bélgica, de onde emigrou com 43 anos, *in memoriam*) residente em *Aarsele* na Bélgica (vila do município de *Tielt* da província de Flandres Ocidental) e Pierre Brackeveld (natural de *Koekelare*, município da província de Flandres Ocidental na Bélgica,

de onde emigrou com 42 anos, *in memoriam*) residente em *S. Pieters Kapelle* na Bélgica (vila do município de *Middelkerke* do distrito de *Ostende* na província de Flandres Ocidental) que emigraram pelo porto de *Ostende* a bordo do bridge belga Jan van Eyck, sob o comando do capitão J. Minne (*in memoriam*) em 23 de agosto de 1844 com destino à Santa Catarina (MAES, 2005). Segundo Maes (2005) esses bravos flamengos, citados nas listas de passageiros da Colônia Belga do Itajaí – Brasil, obtida no Ministério de Assuntos Exteriores da Bélgica, vieram para fornecer mão-de-obra ao sonho de Charles Van Lede (*in memoriam*), cujo grande objetivo era a mineração do subsolo de Santa Catarina e não a colonização. Agradeço pela coragem, força e os admiro pela vontade de buscar novas oportunidades de trabalho e melhores condições de vida no Brasil, sua nova pátria, frente ao sofrimento e injustiças que lhes foram impostas pelos recrutadores que prometiam terras, riquezas e facilidades nunca recebidas.

A Associação Catarinense dos Professores (ACP), proprietária do edifício Christiane localizado na Rua Ferreira Lima, 96, Centro, Florianópolis, que durante nove anos disponibilizou um aconchegante apartamento para me hospedar, pensão essa onde tive a oportunidade de compartilhar o quarto com aproximadamente 30 estudantes que tinham propósitos parecidos com os meus, mesmos sonhos e dificuldades. As recordações que deixaram são a amizade, o companheirismo e os vários ensinamentos que utilizo diariamente em minha vida;

À professora Cleide Rosana Vieira Batista do Núcleo de Microbiologia de Alimentos (NUMICAL) do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que durante esses aproximadamente nove últimos anos me orientou em vários projetos, pela amizade, paciência, dedicação, apoio, incentivo e exemplo de persistência, força, humildade e humanidade;

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões do Laboratório de Virologia Aplicada do Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFSC, por ter oferecido a oportunidade da realização do Ensaio do Cometa, cedendo toda a estrutura laboratorial e material necessários, orientação, sugestões, paciência e amizade;

Ao Thiago Caon, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC, e à estagiária

Carolina Schmanech Mussi, do Laboratório de Virologia Aplicada, pelo auxílio técnico na realização do Ensaio do Cometa;

Ao professor Adair Roberto Soares dos Santos do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS) do CCB da UFSC, por ter oferecido a oportunidade da realização dos ensaios de toxicidade em camundongos, cedendo toda a estrutura laboratorial e material necessários, orientação, sugestões, paciência e amizade;

Aos assistentes do Laboratório de Fisiologia do CFS do CCB da UFSC: Ana Paula Luiz, Francisney Pinto do Nascimento, Giselle Guginski, Liana Cezar Maffi, Rodrigo Marcon, Lívia Ribas, Murilo Massaro, Sônia Maria Figueredo López, Camila Mafalda Ribas, Diana Vieira de Senne e Costa, pelo auxílio técnico na realização dos ensaios de toxicidade em camundongos, paciência e amizade;

À professora Elaine Cristina Pereira de Martinis do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP), pelas sugestões, paciência e amizade;

À professora Mercedes Gabriela Ratto Reiter do Departamento de Ciências Naturais da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), pelas sugestões, paciência e amizade;

À professora Marilde T. Bordignon Luiz do Laboratório de Bioquímica de Alimentos do CAL do CCA da UFSC, pela disponibilização do espectrofotômetro para a dosagem de proteínas e auxílio técnico, paciência e amizade;

Ao professor Ernani Sebastião Sant'Anna e ao bolsista Mauricio Villela da Costa Braga do Laboratório de Biotecnologia Alimentar do CAL do CCA da UFSC, pela disponibilização do liofilizador e auxílio técnico, paciência e amizade;

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos I e II do NUMICAL do CAL do CCA da UFSC: Rubem Abreu Machado, Murilo Anderson Pereira, Paulo Rogério Franchin, Sara Fabiana Bittencourt de Aguiar, Márcia Menezes Nunes, Roberta Juliano Ramos, Letícia Adélia Miotto, Luiz Fernando Bleyer de Faria, Fernanda Froner Ambrosini, Leonardo Nuernberg, Sabrina de Bona Sartor, Ana Cristina Tanello, Renata D'Aquino Faria, Mirelle Micheletto Carradore, Danielle Bragagnolo Martins, Alexandra Adriana Pissoli, Aline de Andrade Rodrigues, Andreza Magnabosco Mortari, Caroline Simas, Fernanda Froner Ambrosini, Gisele Corrêa Plácido, Iris, Jucieli, Nelci Rangel de Amaral,

Nilton Lourivaldo de Oliveira, Pedro Ivo Pinheiro Fuchs, Renata de Oliveira, Gelso Francisco Panho, Eliane Bressa Dalcin e Graciette V. Mottana, pela amizade, incentivo e auxílio técnico;

Aos secretários Sérgio de Souza e Maria Inês Nava Azevedo do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PGCAL) e do CAL do CCA da UFSC, respectivamente, pela amizade, favores prestados e incentivo;

Ao povo brasileiro que, através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), financiou este trabalho;

A todos os professores, colegas de curso, funcionários e amigos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

“Não procurem o sucesso. Quanto mais o procurarem e o transformarem num alvo, mais vocês vão errar. Porque o sucesso, como a felicidade, não pode ser perseguido; ele deve acontecer” (FRANKL, 1991, p. 11).

RESUMO

Alguns microrganismos possuem a capacidade de produzir substâncias que podem influenciar no desenvolvimento de outros microrganismos. Desde os anos 50 é relatada a capacidade de várias espécies de bactérias do gênero *Bacillus* de produzir substâncias com atividade antimicrobiana como peptídeos, também denominados de bacteriocinas e enzimas como a subtilisina, subtilina, as proteases e as termolisinas. Muitos desses peptídeos e enzimas têm sido caracterizados bioquimicamente e geneticamente. Embora sejam conhecidas, a função estrutural, a biossíntese e modo de ação de alguns peptídeos antimicrobianos e enzimas, muitos aspectos desses compostos ainda permanecem desconhecidos. Frente a essa realidade, o presente estudo investigou a atividade antibacteriana e antifúngica e a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi obtido por técnicas de precipitação de proteínas, centrifugação, diálise e esterilização por filtração. A padronização das análises toxicológicas e de atividade antibacteriana e antifúngica foi realizada pela determinação da concentração de proteínas do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. O ensaio de atividade antibacteriana e antifúngica foi realizado pela técnica de difusão em poços. Dentre os diferentes indicadores utilizaram-se bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* NCTC 098630, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), fungos (*Aspergillus fumigatus* ATCC 9197 e *Penicillium commune* J 238) e leveduras (*Rhodotorula mucilaginosa* J 350, *Pichia anomala* DSM 70255 e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045). O extrato bruto foi testado nas concentrações de 5, 20, 40, 60 e 80µg de proteínas, em ambos os ensaios de atividade antimicrobiana. Para avaliar a toxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foram utilizados ensaios *in vitro* (genotoxicidade) e *in vivo* (toxicidade aguda em ratos e camundongos e toxicidade de doses repetidas em camundongos). A investigação da genotoxicidade com células VERO ATCC-CCL 81 foi realizada pelo ensaio Cometa, utilizando-se 60, 80 e 100µg de proteínas do extrato bruto. Para análise toxicológica aguda em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), utilizou-se um grupo de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) tratado com o extrato bruto, por gavagem oral, com a dose de 2.000µg/kg (dose máxima recomendada). Os animais foram pesados no início e no final do experimento e observados por 14 dias quanto aos possíveis sinais de toxicidade (morte, coma, convulsão, prostração, ataxia, tremores, alteração na pele ou pêlo, alteração nas mucosas, diarreia e salivação). Para análise toxicológica aguda em camundongos Swiss (*Mus musculus*), utilizou-se o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 por gavagem oral, numa única administração, nas doses de 5, 50, 500 e 5.000µg/kg a 80 camundongos (40 machos e 40 fêmeas, contendo 10 animais por grupo). Outros 20 camundongos (10 machos e 10 fêmeas) receberam veículo (salina, NaCl 0,9%), pela mesma via. Para análise toxicológica de doses repetidas em camundongos Swiss (*Mus musculus*) utilizou-se o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 administrado por gavagem oral, por um período de 90 dias nas doses de 50, 500 e 5.000µg/kg em 120 animais (60 machos e

60 fêmeas, contendo 20 animais por grupo). Outros 40 camundongos (20 machos e 20 fêmeas) receberam veículo (salina, NaCl 0,9%), pela mesma via. Constatou-se nos ensaios de atividade antimicrobiana que o extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não apresentou atividade contra os bolores e as leveduras nas concentrações testadas, e somente apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630. O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não foi genotóxico para células VERO na concentração de 60µg/ml, porém apresentou genotoxicidade nas concentrações de 80 e 100µg/ml. Na análise toxicológica aguda em ratos a dose letal 50 (DL₅₀) foi superior a 2.000µg/kg. Na análise toxicológica aguda em camundongos, o extrato bruto apresentou boa tolerabilidade e reduzidos efeitos tóxicos agudos importantes, com DL₅₀ superior a 5.000µg/kg. Já na análise toxicológica de doses repetidas, a *non toxic adverse effect level* (NOAEL) para o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 situa-se entre as doses de 50 e 500µg/kg. Os resultados indicam que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresenta um grande potencial como conservador natural de alimentos, dada sua marcante atividade antilisterial e sua relativa segurança toxicológica.

Palavras-chave: *Bacillus amyloliquefaciens*, antimicrobianos, toxicidade.

ABSTRACT

Some microorganisms are able to produce substances that can influence the growth of other microorganisms. The ability of various bacterial species of the genus *Bacillus* to produce substances with antimicrobial activity such as peptides, also called bacteriocins, and enzymes such as subtilisin, subtilin, proteases and thermolysins has been reported since the 1950's. Many of these peptides and enzymes have been characterized biochemically and genetically. Although the structural function, biosynthesis and mode of action of some antimicrobial peptides and enzymes have been identified, many aspects of these compounds are still unknown. The present study investigated the antibacterial and antifungal activity and the *in vitro* and *in vivo* toxicity of the crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. The antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was obtained by techniques of protein precipitation, centrifugation, dialysis and sterilization through filtration. The standardization of the toxicological analysis, and antibacterial and antifungal activity was realized by determining the concentration of proteins in the crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. The assay of antibacterial and antifungal activity was done by agar diffusion technique in wells. Among the different indicators were used the Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes* NCTC 098630, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), molds (*Aspergillus fumigatus* ATCC 9197 and *Penicillium commune* J 238), and yeasts (*Rhodotorula muscilaginosa* J 350, *Pichia anomala* DSM 70255 and *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045). The crude extract was tested in concentrations of 5, 20, 40, 60 and 80 µg of protein in both assays of antimicrobial activity. To evaluate the *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 antibacterial crude extract's toxicity were used *in vitro* (genotoxicity) and *in vivo* (acute toxicity in rats and mice and repeated doses toxicity in mice) assays. The research of the genotoxicity with VERO ATCC-CCL 81 cells was made by Comet assay, using 60, 80 e 100 µg of protein of the crude extract. To the acute toxicological analysis in rats Wistar (*Rattus norvegicus*), were used one group with 10 animals (5 males and 5 females) treated with the crude extract by oral gavage, with dose of 2,000 µg/kg (maximum dose recommended). The animals were weighed at the beginning and at the end of the experiment, and observed during 14 days as the possible toxicity signs (death, coma, convulsions, prostration, ataxy, tremors, skin or hair alterations, mucous alteration, diarrhea and salivation). To the acute toxicological analysis in Swiss mice (*Mus musculus*), the antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was used by oral gavage, in a single administration, in doses of 5, 50, 500 and 5,000 µg/kg to 80 mice (40 males and 40 females, with 10 animals per group). Other 20 mice (10 males and 10 females) received the vehicle (saline, NaCl 0.9%), through the same route. To the repeated doses toxicological analysis in Swiss mice (*Mus musculus*) the antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was administrated by oral gavage during 90 days in doses of 50, 500 and 5,000 µg/kg in 120 animals (60 males and 60 females, in groups of 20 animals). Other 40 mice (20 males and 20 females) received the vehicle (saline, NaCl 0.9%), through the same route. It was verified in the antimicrobial activity assays that the crude extract of *Bacillus*

amyloliquefaciens R 10 didn't present activity against molds and yeasts in the tested concentrations, and only presented antibacterial activity against *Listeria monocytogenes* NCTC 098630. The antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was not genotoxic to VERO cells at concentration of 60µg/ml, but showed genotoxicity at concentration of 80 and 100µg/ml. In the acute toxicological analysis in rats the letal dose 50 (DL₅₀) was higher than 2,000µg/kg. In the acute toxicological analysis in mice, the crude extract presented good tolerability and little important acute toxic effects with DL₅₀ higher than 5,000µg/kg. In the repeated doses toxicological analysis, a *non toxic adverse effect level* (NOAEL) for the antibacterial crude extract is between the doses of 50 and 500µg/kg. The results showed that the antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 presents a great potential as a natural food preservative, due to its notable antilisterial activity, and its relative toxicological security.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, antimicrobials, toxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	17
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	19
LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE APÊNDICES	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Microrganismos de interesse em alimentos	27
3.1.1 Bactérias Gram-positivas.....	28
3.1.2 Bactérias Gram-negativas.....	34
3.1.3 Bolores e leveduras.....	38
3.2 Atividade antimicrobiana	39
3.2.1 Substâncias com atividade antimicrobiana.....	39
3.2.1.1 Classificação.....	41
3.2.1.2 Definição, composição química e características.....	43
3.2.1.3 Mecanismo de ação.....	45
3.2.1.4 Fatores que afetam a atividade da nisina.....	48
3.2.2 <i>Bacillus</i> produtores de bacteriocinas.....	48
3.2.3 Métodos para detecção da atividade antimicrobiana.....	52
3.2.4 Enzimas produzidas por <i>Bacillus</i> spp.....	54
3.3 Aplicação de substâncias antimicrobianas na conservação e processamento de alimentos	57
3.4 Segurança de bacteriocinas e enzimas produzidas por <i>Bacillus</i> spp	61
4 MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.1 Atividade antimicrobiana do extrato bruto de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10	67
4.1.1 Obtenção do extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10.....	67
4.1.2 Dosagem de proteínas do extrato bruto.....	69

4.1.3 Avaliação da atividade antibacteriana.....	69
4.1.4 Avaliação da atividade antifúngica.....	70
4.2 Toxicidade do extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 <i>in vitro</i>.....	71
4.2.1 Genotoxicidade.....	71
4.3 Toxicidade do extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 <i>in vivo</i>.....	75
4.3.1 Análise toxicológica aguda em ratos.....	76
4.3.2 Análise toxicológica aguda em camundongos.....	77
4.3.3 Análise toxicológica de doses repetidas.....	79
4.4 Análise estatística.....	82
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
5.1 Dosagem de proteínas do extrato bruto.....	84
5.2 Atividade antibacteriana.....	84
5.3 Atividade antifúngica.....	88
5.4 Genotoxicidade.....	90
5.5 Análise toxicológica aguda em ratos.....	92
5.6 Análise toxicológica aguda em camundongos.....	94
5.7 Análise toxicológica de doses repetidas.....	108
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	130
REFERÊNCIAS.....	131
APÊNDICES.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

AS – ágar sangue.

ATCC – *American Type Culture Collection*.

BAL - bactérias lácticas.

CDC - *National Center for Infectious Diseases*.

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais.

DL₅₀ – dose letal mediana 50.

DMSO – dimetilsulfóxido.

FAO – *Food and Agriculture Organization* (comitê conjunto da organização para alimentação e agricultura).

FDA – *Food and Drug Administration* (órgão que regulamenta o uso de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos).

FFDCA – *Federal Food, Drug and Cosmetic Act* (órgão federal que regulamenta o uso de alimentos, medicamentos e cosméticos nos Estados Unidos).

FPM – força próton-motriz.

xg – giros.

GRAS – *Substances Generally Recognized as Safe* (substâncias geralmente reconhecidas como seguras).

IDA – ingestão diária aceitável para o homem.

ISP – *Intracellular Serine Protease* (serina protease intracelular).

IV – via venosa.

kDa – kilodaltons.

MEM – meio mínimo essencial.

MTT – sal de tetrazólio.

NIS – *N-inhibitory substances* (substância N-inibitória).

NOAEL - *non toxic adverse effect level* (dose sem efeito observado).

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PAGE – gel de poliacrilamida.

PBS – tampão fosfato de sódio.

PDA – ágar dextrose batata.

ppm – partes por milhão.

SDA – ágar dextrose sabouraud.

SDS – dodecil sulfato de sódio.

SFB – soro fetal bovino.

SLO – estreptolisina.

SNK – teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls.

TSA-YE – ágar triptona de soja suplementado com extrato de levedura.

TSB-YE – caldo triptona de soja suplementado com extrato de levedura.

UFC/g – unidades formadoras de colônia por grama.

UFC/ml – unidades formadoras de colônia por mililitro.

UI – Unidades Internacionais.

v.o. – via oral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da nisina A.....	44
Figura 2 - Modelos propostos para a formação de poros pela nisina.....	47
Figura 3 - Diferenciação das classes dos cometas em ensaios de genotoxicidade.....	75
Figura 4 - Atividade antibacteriana do extrato bruto de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, em diferentes concentrações (µg de proteínas), frente <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 098630 previamente inoculada em placa de TSA-YE e incubada a 35°C por 24h. SI – sem inoculação.....	85
Figura 5 - Efeito do tratamento agudo (14 dias) realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 (5 - 5.000 µg/kg) ou veículo, administrado pela via oral, numa única administração, sobre o peso corporal absoluto de camundongos machos (A) e fêmeas (B). Cada ponto representa a média de 10 animais e as linhas verticais representam o erro padrão da média. Difere significativamente do grupo controle (veículo, C): *p<0,05 e **p<0,01.....	102
Gráfico 1 - Atividade antibacteriana do extrato bruto de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 e nisina comercial (Nisaplin®) em placas de TSA-YE incubadas a 35°C por 24h, utilizando <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 098630 como microrganismo indicador.	86
Quadro 1 - Classificação das bacteriocinas.....	42
Quadro 2 - Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10.....	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 utilizando-se células VERO.....90
- Tabela 2 - Variação do peso dos ratos tratados com 2.000µg/kg do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, por via oral, durante 14 dias.....93
- Tabela 3 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 observado 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24h após sua administração pela via oral, sobre alguns parâmetros comportamentais indicativos de toxicidade aguda em camundongos machos.....95
- Tabela 4 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 observado 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24h após sua administração pela via oral, sobre alguns parâmetros comportamentais indicativos de toxicidade aguda em camundongos fêmeas.....97
- Tabela 5 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre a variação da massa corporal de camundongos analisados do 1º ao 14º dia após o tratamento.....100
- Tabela 6 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre a variação do consumo médio de ração e água de camundongos no final do tratamento.....101
- Tabela 7 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso relativo do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículos e glândula salivar de camundongos machos....103

Tabela 8 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre o peso absoluto do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículos e glândula salivar de camundongos machos.....	104
Tabela 9 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre o peso relativo do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, ovário e tubas uterinas, encéfalo e glândula salivar de camundongos fêmeas.....	105
Tabela 10 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre o peso absoluto do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, ovário e tubas uterinas, encéfalo e glândula salivar de camundongos fêmeas.....	106
Tabela 11 - Relação do período e número de camundongos machos ou fêmeas que morreram ao longo do tratamento realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 ou veículo (10 ml/kg), administrado pela via oral, durante 90 dias.....	109
Tabela 12 - Efeito do tratamento por doses repetidas, durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre a variação de peso corporal de camundongos ao longo do tratamento.....	110
Tabela 13 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre a variação do consumo médio de ração e água de camundongos no final do tratamento.....	113

Tabela 14 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros hematológicos em camundongos.....	115
Tabela 15 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre o número diferencial de células sangüíneas em camundongos.....	116
Tabela 16 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros bioquímicos do sangue em camundongos machos.....	118
Tabela 17 – Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros bioquímicos do sangue em camundongos fêmeas.....	121
Tabela 18 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre o peso relativo do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículo/ovário e glândula salivar de camundongos	124
Tabela 19 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10, administrado pela via oral, sobre o peso absoluto do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículo/ovário e glândula salivar de camundongos.....	126

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A.....	148
APÊNDICE B.....	152
APÊNDICE C.....	160
APÊNDICE D.....	170
APÊNDICE E.....	176

1 INTRODUÇÃO

Alimentos, industrializados ou não, podem conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos, que podem interferir em sua vida útil ou causar doenças. Existem inúmeros recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar seu desenvolvimento nos alimentos, incluindo tratamento térmico, adição de conservadores químicos e uso de baixa temperatura durante o armazenamento. No entanto, a cada dia aumenta a procura por alimentos, que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de processamento industrial, e que não sejam adicionados de produtos químicos. Com isso, aumenta também a preocupação dos fabricantes de alimentos em produzir alimentos que não necessitem desses procedimentos para que sejam saudáveis e para que atendam os parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores (MURIANA, 1996; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Assim, deu-se o início do uso de bioconservadores, onde o desenvolvimento de microrganismos em alimentos é controlado pela adição de substâncias conhecidas como bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos produzidos por uma grande variedade de bactérias, particularmente bactérias lácticas (BAL) e espécies do gênero *Bacillus* (CLEVELAND et al., 2001; PALMER, 2004).

A natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas (hemolisinas) faz com que essas substâncias sejam degradadas no trato gastrointestinal de homens e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade (PIARD et al., 1992). Segundo Marugg (1991), estudos realizados com várias bacteriocinas indicaram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos. Até o presente, as únicas bacteriocinas produzidas para conservação de alimentos são a nisina e a pediocina PA-1, vendidas com os nomes comerciais de Nisaplin[®] e Alta[®], respectivamente (MORENO et al., 1999; DEEGAN et al., 2006).

Frente a essa realidade, Schulz (2003) investigou a citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, isolado por Batista (1993).

Em continuidade aos estudos realizados, esse trabalho teve como objetivo investigar a toxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, bem como estudar seu espectro de atividade antibacteriana e antifúngica, com o intuito de utilizá-lo como conservador natural de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antibacteriana, atividade antifúngica e a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10.

2.2 Objetivos específicos

. Investigar o espectro de atividade antibacteriana e antifúngica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10;

. Investigar o potencial de genotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10;

. Verificar o comportamento do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 quando submetido à análise toxicológica oral aguda em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*);

. Investigar a toxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 administrado agudamente e por dose repetida pela via oral em camundongos Swiss (*Mus musculus*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microrganismos de interesse em alimentos

A manipulação e a exposição de alimentos antes, durante ou após o seu preparo podem introduzir contaminantes capazes de causar infecções ou intoxicações alimentares. Quando tal efeito ocorre em alimentos a gravidade e dimensões do surto são imprevisíveis (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

As toxinfecções alimentares são doenças que apresentam principalmente sintomas gastrintestinais e possuem um período de incubação relativamente curto; adquiridas pelo consumo de alimentos contendo microrganismos patogênicos, substâncias tóxicas, químicas, de origem física ou biológicas (HAZELWOOD; McLEAN, 1994).

O *National Center for Infectious Diseases* (CDC) estima que existam anualmente nos Estados Unidos 76 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos, com 325.000 hospitalizações e 5.000 óbitos (CDC, 2008).

Os microrganismos presentes nos alimentos podem ser classificados em deteriorantes, patogênicos e os causadores de alterações benéficas nos alimentos. Os deteriorantes (bolores e as leveduras) são os causadores de alterações químicas prejudiciais como: alterações de cor, odor, sabor, textura e aspecto do alimento. Os microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., são os que podem representar um risco à saúde, chegando até o alimento por condições precárias de higiene durante a produção, armazenamento, distribuição ou manuseio; podendo afetar tanto o homem como animais. Em contrapartida, os microrganismos benéficos são adicionados aos alimentos intencionalmente para que determinadas reações químicas sejam realizadas ou apenas estimulados seletivamente no próprio alimento, como ocorre nos queijos, pães e vinhos, onde estão presentes naturalmente (FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Alguns microrganismos são também utilizados como indicadores da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos ou de contaminação fecal, como os coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* e os enterococos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Existem relatos sobre casos de toxinfecção alimentar por cepas mesófilas de enterococos e *Pseudomonas*, quando presentes em números elevados, embora não sejam patogênicas via alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Nos últimos anos, várias bacteriocinas têm sido testadas contra microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos com intuito de fornecer para a população alimentos cada vez mais seguros (CLEVELAND et al., 2001; DEEGAN et al., 2006).

3.1.1 Bactérias Gram-positivas

a) *Listeria monocytogenes*

Listeriose é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*. As investigações epidemiológicas dos surtos de listeriose mostraram a sua freqüente etiologia veiculada por alimentos. *Listeria monocytogenes* distribui-se amplamente pela natureza em todo o mundo, podendo ser recuperada da água, solo, vegetação em decomposição, grãos, esgotos, insetos, crustáceos, peixes, pássaros, assim como de mamíferos selvagens e domésticos. O estado de portador intestinal assintomático em seres humanos é observado em 1 a 5% dos adultos (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

Listeria monocytogenes é um patógeno com bastante impacto na saúde pública. O perigo desse microrganismo como risco associado aos alimentos é, em grande parte, devido à sua capacidade de se adaptar a condições disgenéticas, tanto em nível do ambiente exterior que antecede a ingestão dos alimentos como também no interior do hospedeiro (GUERRA; BERNARDO, 2006).

Listeria monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo, capaz de se multiplicar nos monócitos-macrófagos não imunes. A hemolisina listeriolisina O constitui um importante fator de virulência nesse processo. A fagocitose da bactéria estimula a sua produção; a listeriolisina O liga-se ao colesterol nas membranas celulares, resultando em sua ruptura, propriedade que permite ao microrganismo escapar dos fagolisossomas, permanecendo no citoplasma, onde se multiplica. *Listeria* migra para a periferia celular, cria protrusões da membrana externa, sendo ingerida por células adjacentes. Assim, o microrganismo propaga-se diretamente de uma célula para outra, evitando o ambiente extracelular. Com isso, é capaz de causar doenças invasivas sérias, especialmente em hospedeiros imunodeprimidos, neonatos e fetos. Adultos imunodeprimidos podem desenvolver meningoencefalite e bacteremia (McLAUHLIN, 1987; KEROUANTON et al., 1998; BENNETT; GOLDMAN, 2001).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas. O reconhecimento de *Listeria monocytogenes* como patógeno veiculado por alimentos levou à descoberta de que a listeriose pode manifestar-se na forma de febre, diarreia e dor abdominal em cólica durante um a dois dias (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

Um terço dos casos de listeriose é associado à gestação. Com mais frequência, no terceiro trimestre a mãe desenvolve uma doença gripal, com febre, dor de garganta, mialgia, dor abdominal em cólica e diarreia. Depois de três a sete dias, ocorrem trabalho de parto prematuro ou aborto. A transmissão transplacentária da doença torna-se clinicamente evidente no recém-nascido algumas horas após o parto. Essa grave doença septicêmica é conhecida como granulomatose infantosséptica. Os neonatos também podem contrair essa doença no canal de parto, ou como infecção hospitalar, no berçário; a doença manifesta-se como anorexia, febre ou meningismo (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

A ampicilina é o antibiótico de escolha para o tratamento da listeriose, podendo ser administrada mesmo durante a gravidez e a lactância. A dose padrão para os pacientes com meningite é de 200mg/kg/dia em seis doses

fracionadas, administrada por via venosa (IV), durante três semanas (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

Diferentes tipos de alimentos podem apresentar *Listeria monocytogenes*. No entanto, os produtos de laticínios e, mais recentemente, os derivados de carne e aves são os mais envolvidos com casos de listeriose (FARBER et al., 1993). Queijos macios e semi-macios produzidos e importados pela Suécia foram analisados quanto à presença de *Listeria monocytogenes*. Esse patógeno foi detectado em 6% das 333 amostras estudadas. Os queijos fabricados com leite cru apresentaram maior incidência de *Listeria monocytogenes* (42%) que os queijos fabricados com leite termicamente tratado (2%). O número de *Listeria monocytogenes* detectado nos referidos queijos, variou de $<1 \times 10^2$ a 1×10^5 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g). Sendo assim, os pesquisadores afirmaram que o uso do leite cru para a fabricação de queijos representa um risco à saúde pública (LONCAREVIC; DANIELSSON-THAM; THAM, 1995).

No Brasil, 103 amostras de vários tipos de queijos, produzidos na cidade do Rio de Janeiro foram analisadas para verificar a incidência de *Listeria monocytogenes* e outras espécies de *Listeria*. Entre as amostras analisadas, 11 (10,68%) continham *Listeria monocytogenes*, 13 (12,62%) *Listeria innocua*, 6 (5,83%) *Listeria grayi* e 1 (0,97%) *Listeria welshimeri*. Nos queijos Minas Frescal, fabricados artesanalmente, foi encontrado um alto nível de contaminação; sendo que, das 17 amostras analisadas, 7 (41,17%) continham *Listeria monocytogenes*. Em queijos fabricados industrialmente como Ricota e Minas frescal, 3,03% das amostras estavam contaminadas com esse patógeno. Nos queijos maturados como o Gorgonzola, Brie e Roquefort, *Listeria monocytogenes* foi encontrada em 5,67% das amostras. De acordo com os pesquisadores, dois fatores podem ter contribuído para essa contaminação. Primeiro, a bactéria láctica utilizada no processamento não inibiu completamente *Listeria monocytogenes* e, segundo, um rápido aumento do pH durante a maturação dos queijos permitiu o crescimento desse microrganismo (SILVA; HOFER; TIBANA, 1998).

Na cidade de Goiânia, 100 amostras de leite foram analisadas, com intuito de verificar a presença de *Listeria* spp. Das amostras analisadas, 50 eram de leite cru e as outras 50 de leite pasteurizado. *Listeria* foi isolada de 8% das amostras de leite cru, mas não foi encontrada em amostras de leite pasteurizado (OLIVEIRA et al., 1998).

Baseados na gravidade da listeriose e no fato de que a dose oral necessária para causar infecção em indivíduos saudáveis ou susceptíveis não é conhecida, foi determinada tolerância zero para *Listeria monocytogenes* em alimentos de vários países, incluindo os Estados Unidos, mas os surtos continuam a ocorrer (SAMELIS; METAXOPOULOS, 1999; DEEGAN et al., 2006). No Brasil, a Resolução RDC nº 12/2001 estabelece a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25g de amostra de queijos de média (36%), alta (46%) e muito alta (55%) umidade, exceto os temperados, condimentados, adicionados de ervas ou outros ingredientes (BRASIL, 2001).

Nos últimos anos têm sido publicados vários trabalhos que demonstram a resistência térmica de *Listeria monocytogenes* ligada a fatores de adaptação, como a temperatura de incubação, tratamentos térmicos subletais precedentes à pasteurização, pH e a concentração de solutos do meio e uma recuperação anaeróbia das células danificadas pelo calor. Por outro lado, a capacidade desse microrganismo para se multiplicar a temperaturas de refrigeração constitui uma característica relevante em termos de segurança sanitária, principalmente no que se refere aos alimentos refrigerados. Também a adaptação à acidez ou à elevada osmolaridade é um aspecto da maior importância a ser considerado, pois pode corresponder a um fator que influencia na sobrevivência desse microrganismo nos alimentos (especialmente os fermentados e curados) e nas superfícies de trabalho (biofilmes). Esse comportamento de tolerância e até de adaptação de *Listeria monocytogenes*, face à aplicação de agentes e situações de exclusão e controle microbiológico habitualmente utilizados na produção de alimentos, constitui uma preocupação nos programas de higienização e de controle da produção de alimentos (BHATTI; VEERAMACHANENI; SHELEF, 2004; BOZIARIS; NYCHAS, 2006; GUERRA; BERNARDO, 2006).

Martínez e Rodrigues (2005) investigaram a segurança do uso de nisina em alimentos, frente ao risco de ocorrência de resistência cruzada com alguns antibióticos de uso clínico. Adicionalmente, relatam que algumas cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas do leite são resistentes a essa bacteriocina, porém não conseguiram estabelecer uma correlação entre resistência a nisina e o uso de antibióticos de amplo espectro, sugerindo um estudo futuro com maior número de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes alimentos.

Frente a essa realidade, várias pesquisas nos últimos anos têm sido direcionadas para busca de novos bioconservadores ativos contra *Listeria monocytogenes* (ZHENG; SLAVIK, 1999; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

b) *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são pertencentes à família *Micrococcaceae*, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais frequentemente associada às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. Os estafilococos são bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 a 47,8°C; as enterotoxinas são produzidas em temperatura ótima entre 40 e 45°C (FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

O agente causal da intoxicação (sintomas: náuseas, vômitos, câibras abdominais, diarreia e sudorese) são as várias toxinas (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E) produzidas por esta bactéria (10⁵ a 10⁶ unidades formadoras de colônias por grama de alimento para que esta seja produzida), apresentando um período de incubação de 30 minutos a 8 horas (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

O homem e os animais são os principais reservatórios de *Staphylococcus aureus*. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e, a partir desse foco atingem tanto a epiderme e feridas como a água, solo, leite, esgoto e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o homem. Nos alimentos contaminados que não são cozidos ou refrigerados

adequadamente e que permanecem a temperatura ambiente por muito tempo pode ocorrer a multiplicação do *Staphylococcus aureus* e a produção da toxina (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Para prevenir a intoxicação estafilocócica, é importante manter os alimentos sob refrigeração, manipulá-los corretamente, bem como submetê-los ao aquecimento após a sua manipulação (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

c) *Enterococcus faecalis*

Os enterococos, antes um subgrupo do gênero *Streptococcus*, a partir de 1984 passaram a pertencer ao gênero *Enterococcus*. As espécies de enterococos com maior importância em microbiologia de alimentos são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A utilização dos enterococos como indicadores de contaminação fecal dos alimentos apresenta algumas restrições, pois também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal. Além disso, apresentam uma sobrevivência maior do que outros enteropatógenos no solo, vegetais e em alimentos, principalmente naqueles submetidos à desidratação, ação de desinfetantes e a flutuações de temperatura (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Apesar dessas limitações, os enterococos em números elevados em alimentos indicam práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Enterococcus faecalis e *Enterococcus faecium* produzem uma síndrome clínica similar à intoxicação por estafilococos com diarreia, cólica abdominal, náusea, vômito, febre, calafrio e vertigem, sendo a dose infectante maior que 10^7 microrganismos. O reservatório é o ser humano. O período de incubação varia de 2 a 36 horas. A transmissão dos enterococos ocorre por alimentos preparados sob precárias condições sanitárias ou por manipuladores doentes (FDA, 2006).

As principais medidas preventivas de surtos são: (i) o afastamento de manipuladores doentes, (ii) a manipulação correta dos alimentos e (iii) evitar a ingestão de leite e derivados não pasteurizados (FDA, 2006).

Recentemente, *Enterococcus* é o gênero que apresenta a maior preocupação quanto à resistência aos antibióticos, sendo isolado em casos de endocardite, bacteremia e de infecção hospitalar. Algumas cepas desse microrganismo mostram-se resistentes a todos os antibióticos conhecidos (BENNETT; GOLDMAN, 2001; POETA; ANTUNES; RODRIGUES, 2005).

3.1.2 Bactérias Gram-negativas

a) *Escherichia coli*

O grupo dos coliformes a 35°C é composto por microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, fazendo parte deste grupo predominantemente bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destas, apenas *Escherichia coli* tem como hábitat primário o trato intestinal do homem e animais, sendo que as demais podem ser encontradas em outros ambientes como vegetais e solo (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

As bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes a 45°C, correspondem as do grupo dos coliformes a 35°C que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44-45,5°C por 24 horas. Nestas condições, cerca de 90% das culturas de *Escherichia coli* são positivas, enquanto que, nos demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

A pesquisa de coliformes a 45°C ou de *Escherichia coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e indica uma eventual presença de patógenos (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Baseando-se nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, as linhagens de *Escherichia coli* consideradas patogênicas são atualmente agrupadas em seis classes: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica - EPEC, *Escherichia coli* enteroinvasiva - EIEC, *Escherichia coli* enterotoxigênica - ETEC, *Escherichia coli* enterohemorrágica - EHEC, *Escherichia coli* enteroagregativa - EAaggEC e *Escherichia coli* facultativamente patogênica - FEEC (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A diarreia provocada por EPEC é geralmente acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre, sendo que a duração da doença varia de seis a três dias, com período de incubação variando entre 17 e 72 horas. A gastroenterite provocada por EIEC é bastante semelhante àquela provocada por *Shigella*, caracterizada por disenteria, cólicas abdominais, febre e mal-estar geral, com eliminação de sangue e muco com as fezes. O período de incubação varia entre 8 e 24 horas. As bactérias pertencentes ao grupo da ETEC são importantes causadoras de diarreia em países subdesenvolvidos, nas regiões endêmicas, caracterizando-se pela diarreia aquosa, normalmente acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas. A dose de infecção é de 10^6 a 10^8 células. A colite hemorrágica causada pela EHEC é caracterizada clinicamente por dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta, diferindo das manifestações clínicas causadas por outros agentes invasores; pela grande quantidade de sangue nas fezes e ausência de febre, tendo um período de incubação de quatro dias (FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A prevenção de muitas infecções entéricas por *Escherichia coli* está relacionada ao desenvolvimento econômico básico, a condições sanitárias adequadas e ao fornecimento de água de boa qualidade e em quantidade suficiente. As pessoas devem realizar a desinfecção dos alimentos crus (com uso de cloro), bem como o cozimento adequado da carne e leite e utilizar as boas práticas de fabricação e de higiene pessoal (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

b) *Salmonella typhimurium*

Salmonella é um gênero da família *Enterobacteriaceae* que pode causar um estado de portador intestinal assintomático ou doença clínica tanto em seres humanos quanto em animais (BENNETT; GOLDMAN, 2001; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Atualmente, *Salmonella* é um dos microrganismos mais frequentemente envolvidos em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive no Brasil, estando amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal do homem e de animais o seu principal reservatório natural (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As doenças causadas por *Salmonella* costumam ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide (sintomas: febre alta, diarreia e vômitos), causada por *Salmonella Typhi*, as febres entéricas (sintomas: diarreia, vômitos, febre e geralmente septicemia), causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites ou salmoneloses (sintomas: diarreia, febre, dores abdominais e vômitos) causadas pelas demais salmonelas. O estabelecimento dos sintomas de salmonelose, bem como sua gravidade, depende do sorotipo da *Salmonella* envolvido, da competência dos sistemas de defesa inespecíficos e específicos do indivíduo e também das características do alimento envolvido (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Salmonella Enteritidis e *Salmonella typhimurium* são as causas mais comuns de doença em seres humanos, e constituem quase 50% dos microrganismos isolados no homem. Em geral são necessários grandes inóculos (10^7 bactérias) para provocar infecção clínica no hospedeiro normal (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

A salmonelose é transmitida por alimentos contaminados e ingeridos crus ou mal cozidos, sendo a carne de frango e ovos os mais envolvidos nos casos de surtos. Os sintomas aparecem em média de 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A melhor maneira de prevenir a infecção por *Salmonella* consiste no tratamento adequado dos suprimentos de água e esgoto e refrigeração de alimentos derivados de produtos animais, pasteurização do leite e laticínios, assim como a lavagem das mãos antes do preparo dos alimentos e depois do manuseio de produtos animais crus. O calor é uma forma eficiente para a destruição de salmonelas nos alimentos, bem como a utilização da chamada exclusão competitiva, que consiste no tratamento dos animais recém-nascidos com culturas microbianas mistas contendo bactérias inócuas, que vão ocupar os sítios de adesão das salmonelas, excluindo-as da biota intestinal dos animais (BENNETT; GOLDMAN, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

c) *Enterobacter aerogenes*

Microrganismos do gênero *Enterobacter*, pertencentes à miscelânea entérica, têm sido apontados como causas de doenças gastrintestinais agudas e crônicas, haja vista que podem se transformar transitoriamente em virulentos por adquirirem elementos genéticos de mobilidade de outros patógenos (FDA, 2007).

A gastroenterite aguda é caracterizada por dois ou mais sintomas: vômito, náusea, febre, calafrio, dor abdominal, diarreia ocorrendo 12 a 24 horas após a ingestão do alimento ou água contaminada. A forma crônica é caracterizada pelos sintomas disentéricos: gosto ruim na boca, fezes diarréicas com muco, flatulência e distensão abdominal, podendo continuar por meses e requerendo tratamento com antibiótico. A dose infecciosa é desconhecida. Suspeita-se que ambas formas da doença resultam da elaboração de enterotoxinas (FDA, 2007).

Esses microrganismos têm sido isolados principalmente de laticínios, crustáceos e vegetais frescos crus, onde causam deterioração e reduzem a vida-de-prateleira desses alimentos (FDA, 2007).

d) *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é encontrada no solo, água e plantas, podendo também ser um comensal em animais e seres humanos. Esse microrganismo

causa deterioração (modificação no aroma, aumento do pH, amolecimento e liquefação, limosidade na superfície do alimento, hidrólise e oxidação de gorduras) nos alimentos ricos em proteínas, como leite, carne e ovos (BENNETT; GOLDMAN, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

É comumente encontrada em exaustores, sifão de esgotos, máquinas de gelo e cozinhas hospitalares, onde torna-se um problema particular, pois suporta a ação de vários desinfetantes e mostra-se resistente a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos. *Pseudomonas aeruginosa* causa bacteremia hospitalar, pneumonia hospitalar, infecção hospitalar das vias urinárias, infecção de feridas cirúrgicas e queimaduras, endocardite, otite e raros casos de meningite (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

A infecção por *Pseudomonas* ocorre em três estágios distintos: (i) fixação e colonização bacteriana; (ii) invasão local e (iii) disseminação pela corrente sanguínea e doença sistêmica. Esses estágios são relacionados ao fato de tal microrganismo ser tanto invasivo quanto toxigênico (BENNETT; GOLDMAN, 2001).

3.1.3 Bolores e leveduras

Os bolores são em sua maioria aeróbios, formados por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio, que promove a fixação do bolor ao substrato e a reprodução, através da produção de esporos. O micélio dos bolores é o responsável pelo aspecto característico das colônias, podendo estas terem aspecto cotonoso, serem secas, úmidas, compactas, aveludadas, gelatinosas e com variadas colorações. A presença de certos gêneros em alimentos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, está relacionada com a deterioração, principalmente nos produtos de origem vegetal (FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Além de causarem a deterioração, algumas espécies de fungos quando em condições ideais de crescimento nos alimentos produzem toxinas, denominadas micotoxinas, que quando ingeridas causam uma doença ou síndrome

denominada micotoxicose. Dentre os principais fungos de estocagem produtores de micotoxinas estão os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. *Penicillium commune* produz a micotoxina Ocratoxina A, responsável por nefropatia e necrose nas células periportais hepáticas tanto no homem quanto em animais. *Aspergillus fumigatus* produz as micotoxinas fumitremorginas A e B, que causam dano ao Sistema Nervoso Central de animais cujos sintomas de envenenamento são tremores e convulsões. A ocratoxina e as fumitremorginas podem ser encontradas principalmente no milho, cevada, feijão, amendoim, café, soja, trigo sarraceno, centeio, arroz, sorgo, castanha do Pará, superfície de presunto, pimenta do reino, ervilha, vegetação em decomposição e solo (SCUSSEL, 1998).

As leveduras são definidas como fungos cuja forma predominante é unicelular, requerendo maior umidade que a maioria dos bolores, sendo a sua temperatura ideal de crescimento entre 25 e 30°C, porém não existem relatos da presença de espécies patogênicas em alimentos. *Kluveromyces marxianus* é uma das espécies mais comuns em produtos lácticos, principalmente em queijos deteriorados, estando também envolvida na fermentação de alguns alimentos. As leveduras do gênero *Pichia* normalmente formam filme em substratos líquidos, estando envolvidas na deterioração de produtos ácidos como picles e azeitonas em conservas, porém algumas espécies são importantes na produção de comidas orientais. *Rhodotorula muscilaginosa* produz pigmento que varia do rosa ao vermelho, podendo ser isolada de produtos de laticínios, carnes e produtos fermentados (SPENCER; SPENCER, 1997; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

3.2 Atividade antimicrobiana

3.2.1 Substâncias com atividade antimicrobiana

Segundo Jack; Tagg e Ray (1995), a maioria, senão todas as bactérias, são capazes de produzir várias substâncias durante seu crescimento *in vitro* e, presumivelmente, nos seus habitats naturais, que podem ser inibitórias tanto para elas quanto para outras bactérias. Tais substâncias incluem:

- toxinas (muitas substâncias tradicionalmente conhecidas como toxinas bacterianas; devido sua ação contra células eucarióticas também podem ter atividade antimicrobiana);
- enzimas bacteriolíticas como lisostafina, fosfolipase A e hemolisinas;
- subprodutos das vias metabólicas primárias como ácidos orgânicos, amônia e peróxido de hidrogênio e vários outros metabólitos secundários;
- substâncias antibióticas como garamicina, valinomicina e bacitracina;
- bacteriocinas ou moléculas semelhantes às bacteriocinas.

As bacteriocinas são capazes de inibir cepas ou espécies que são, geralmente, taxonomicamente relacionadas à bactéria produtora. O mecanismo de ação das bacteriocinas sobre células vegetativas não está totalmente esclarecido, mas envolve ação sobre a membrana celular, pela formação de poros (CLEVELAND et al., 2001; PALMER, 2004).

Segundo Jack; Tagg e Ray (1995), as bacteriocinas termolábeis de alto peso molecular da classe III de Klaenhammer (>30 kilodaltons - kDa) incluem muitas enzimas extra-celulares bacteriolíticas (hemolisinas e muramidases) que podem mimetizar as atividades fisiológicas das bacteriocinas. Algumas hemolisinas pertencentes à família das citolisinas tiol-ativas, que é um grupo proeminente de toxinas microbianas, na qual a estreptolisina O (SLO) é o protótipo, também possuem efeito antimicrobiano. Os membros deste grupo envolvem mais de 20 espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo espécies do gênero *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium* e *Streptococcus*. Essas toxinas são sintetizadas como polipeptídeos hidrossolúveis de cadeia simples, com peso molecular de 47 a 60kDa e provocam a lise de células eucariontes pela formação de poros na membrana (PORTNOY et al., 1992; SHEPARD et al., 1998; BILLINGTON; JOST; SONGER, 2000).

Segundo Daeschel (1989), são seis os requerimentos para que um antimicrobiano de ocorrência natural possa ser usado como conservador alimentar:

- sua toxicidade deve ser considerada aceitável por autoridades reconhecidas;

- não deve apresentar efeito prejudicial sobre as propriedades organolépticas do alimento;
- seu custo de produção deve ser economicamente viável para a indústria;
- deve ser estável durante seu armazenamento antes do uso e, no caso de sua ação depender de um residual, deve ser suficientemente estável para a vida de prateleira do alimento;
- deve ser efetiva em concentrações relativamente baixas;
- não deve ter aplicação médica.

3.2.1.1 Classificação

As bacteriocinas de BAL investigadas até o momento diferem em seus espectros de atividade, mecanismos de ação, características bioquímicas e determinantes genéticos. Entretanto, a maioria delas possui baixo peso molecular (3 a 10kDa), alto ponto isoelétrico e contém regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Levando-se em consideração as semelhanças observadas nas suas características, a classificação de Klaenhammer (1993) acabou sendo adotada também para substâncias produzidas por outras bactérias Gram-positivas (KLEIN; ENTIAN, 1994; NAVARATNA; SAHL; TAGG, 1998; FURMANEK et al., 1999).

Klaenhammer (1993) e Cleveland et al. (2001) classificam as bacteriocinas de BAL em quatro classes, conforme mostrado na Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação das bacteriocinas.

Classe I	Classe III
Lantibióticas, caracterizadas pela presença de lantionina e Beta-metil lantionina.	Grandes (>30 kDa) proteínas termolábeis
Classe II	Classe IV
Pequenas (<10 kDa) e relativamente estáveis ao calor, são peptídeos de membrana ativa que não contém lantionina, ativos contra <i>Listeria</i> .	Bacteriocinas complexas que contém porções lipídicas ou carboidratos além da porção protéica.

Fonte: Cleveland et al. (2001).

Dentre as principais bacteriocinas pertencentes à Classe I encontram-se a nisina, lactacina 481, carnocina UI49 e lactocina S. As bacteriocinas pertencentes à classe II podem ser subdivididas em três subclasses: (i) IIa - constituída por peptídeos ativos contra *Listeria*, com uma seqüência N-terminal comum, composta por –Tir-Gli-Asn-Gli-Val-Xaa-Cis. Exemplos: pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, bavaricina MN e curvacina A; (ii) IIb – constituída por peptídeos formadores de poros na membrana celular, formados de duas subunidades importantes para a atividade. Exemplos: lactococina G, lactococina M e lactacina F; (iii) IIc – constituída por peptídeos ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos. Exemplo: lactacina B. As bacteriocinas não lantibióticas, ou seja, sem lantionina na estrutura química, produzidas por BAL da classe II, são exclusivamente formadas por aminoácidos não modificados. A helveticina J, helveticina V-1829, acidofilina e lactacinas A e B são as principais bacteriocinas pertencentes à classe III. Em contrapartida, a plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 e pediocina SJ1 são as principais representantes da classe IV (CLEVELAND et al., 2001; GARNEAU; MARTIN; VEDERAS, 2002; PAPAGIANNI, 2003; DEEGAN et al., 2006; RICHARD et al., 2006).

Cotter; Hill e Ross (2005) classificam como bacteriolisinas as mureínas hidrolases classificadas por Klaenhammer (1993) como pertencentes à Classe III.

Essas bacteriolisinas são proteínas líticas que possuem um tipo de estrutura complexa composta por vários domínios, os quais possuem funções específicas para translocação, ligação ao receptor e atividade letal. O mecanismo de ação dessas bacteriocinas ocorre através da hidrólise das membranas celulares de bactérias sensíveis. Essas moléculas também possuem uma estrutura modular composta por um domínio N-terminal homólogo às peptidases e um C-terminal que, provavelmente, compõem o sítio de ligação dessa proteína na parede bacteriana alvo.

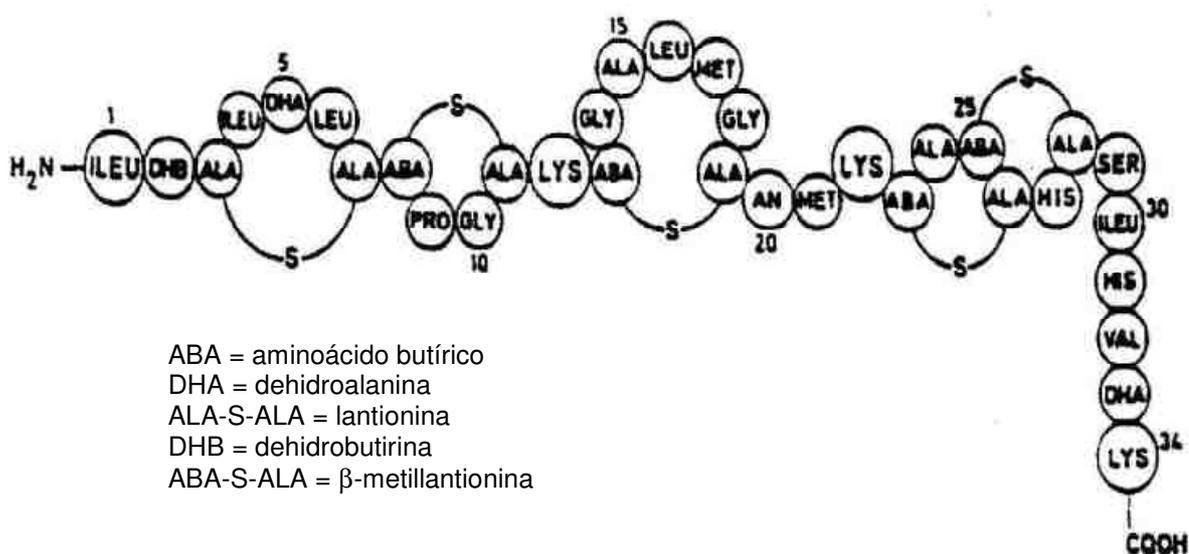
Sendo a nisina a bacteriocina mais amplamente estudada, descreve-se, a seguir, algumas características dessa substância, bem como seu mecanismo de ação e alguns fatores que afetam sua atividade em alimentos.

3.2.1.2 Definição, composição química e características

A nisina é um polipeptídeo antibacteriano produzido por certas linhagens de *Lactococcus lactis*, cujo nome é derivado do termo “N-inhibitory substances” (NIS) adicionado ao sufixo INA (DAVIES et al., 1998; CLEVELAND et al., 2001). De acordo com Harris; Fleming e Klaenhammer (1992), essa bacteriocina foi descrita pela primeira vez por Rogers (1928), como uma substância inibidora do crescimento do *Lactobacillus bulgaricus*. De modo geral, a nisina é ativa apenas frente a bactérias Gram-positivas e seus esporos, não afetando as Gram-negativas, bolores e leveduras. Postula-se que a parede das bactérias Gram-negativas, composta por lipopolissacarídeos e proteínas, atua como uma barreira de permeabilidade celular, impedindo que a nisina atinja a membrana citoplasmática. Contudo, a presença de agentes quelantes, pressão hidrostática ou injúria celular podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina (KLAENHAMMER, 1988; DELVES-BROUGHTON, 1990a; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Na literatura, o termo nisina é empregado para cinco polipeptídeos, designados como Nisinas: A, B, C, D e E; onde, entre elas, acredita-se que a Nisina A, por degradação, dá origem às demais (HARRIS; FLEMING; KLAENHAMMER, 1992). Desta forma, estudos sobre a estrutura molecular da

Nisina-A, revelaram que a mesma é um peptídeo composto de 34 aminoácidos com 3354 Daltons, incluindo um resíduo de dehidroalanina, dois resíduos de dehidrobutirina, uma lantionina e quatro metilantioninas, como mostra a Figura 1 (EAPEN; SANKARAN; VIJAYARAGHAVAN, 1983; DELVES-BROUGHTON, 1990a; HARRIS; FLEMING; KLAENHAMMER, 1992). A Nisina-B, apesar de ser tão ativa quanto a anterior, diferencia-se da mesma por apresentar como produto de degradação 32 aminoácidos. Com respeito às outras nisinas, apesar das mesmas serem bioquimicamente relacionadas e apresentarem atividade antimicrobiana similar, sua sequência de aminoácidos ainda permanece desconhecida (HOLLEY, 1981; HARRIS; FLEMING; KLAENHAMMER, 1992).



Fonte: Delves-Broughton (1990a) e Hoffmann et al. (2002).

Figura 1 - Estrutura da nisina A.

Comercialmente, a nisina produzida pela “Applin e Barrett” recebe a denominação de Nisaplin[®], cuja composição é: nisina (1.026 UI/mg), cloreto de sódio (74,7%), proteína (17,12%), umidade (1,7%), carboidratos (59,3%), gorduras (traços), chumbo (0,15 partes por milhão - ppm), arsênio (<0,5ppm), zinco (9,2ppm) e cobre (0,5ppm), definida por Fowler (1979). Esse concentrado é atualmente comercializado no Brasil pelo Grupo Bela Vista (São Paulo, SP), sendo considerado por Delves-Broughton (1990a) como bactericida.

Segundo informações fornecidas pelo Grupo Bela Vista, 100mg de Nisaplin[®] possuem 2,5mg de nisina (2,5%). O teor mínimo de nisina em 1mg de Nisaplin[®] é de 1.000 Unidades Internacionais (UI), ou seja, 1UI de nisina corresponde a 0,025µg de nisina. O fabricante do Nisaplin[®] recomenda o uso de 10 a 20g de Nisaplin[®] (250 a 500mg de nisina) por 100kg de produto final, dependendo da vida de prateleira desejada, assim como da condição microbiológica da matéria-prima (WESSELS; JELLE; NES, 1998).

A nisina comercial (Nisaplin[®]) é primeiramente obtida por fermentação do leite desnatado com *Lactococcus lactis*. O fermentado resultante é, em seguida, concentrado e separado, desidratado e triturado até obtenção de partículas de pequena granulometria (DEEGAN et al., 2006).

3.2.1.3 Mecanismo de ação

O conhecimento do mecanismo de ação da nisina torna-se, cada dia, mais importante e um pré-requisito indispensável para sua efetiva aplicação na tecnologia de alimentos (HENNING; METZ; HAMMES, 1986b). Nesse sentido, inúmeras pesquisas têm sido realizadas tanto com esporos quanto com células vegetativas (WAITE; SIRAGUSA; HUTKINS, 1998).

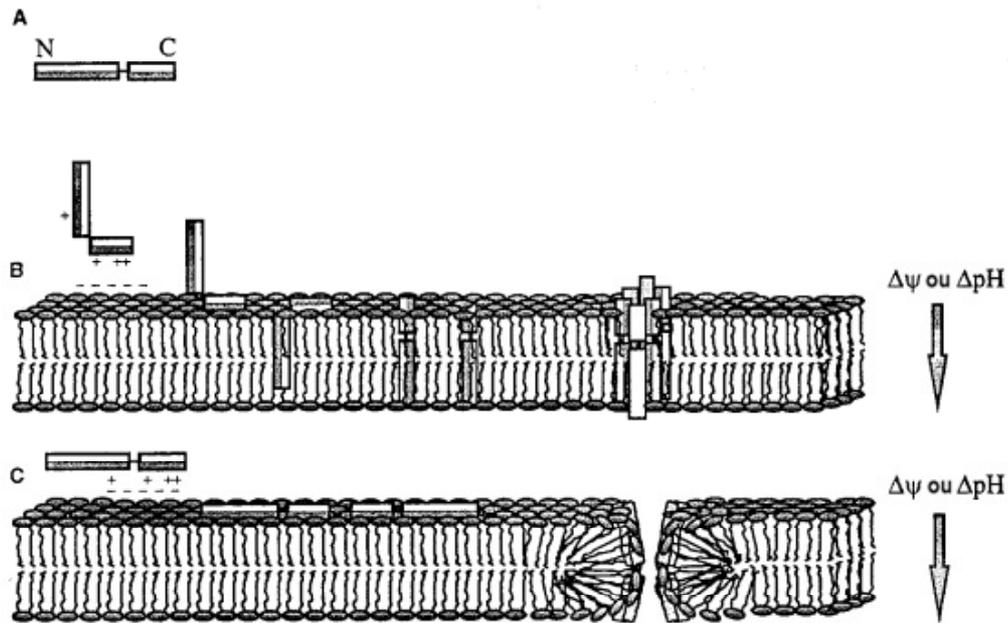
O mecanismo de ação das bacteriocinas sobre células vegetativas não está totalmente esclarecido, mas envolve ação sobre a membrana celular. O mecanismo de formação de poros é o mais aceito porque uma solubilização generalizada, como consequência da ação detergente, ocasionaria a lise total das células, levando a um colapso repentino dos parâmetros bioenergéticos. Isso leva à dissipação do gradiente eletroquímico da membrana citoplasmática, resultando em uma situação incompatível com a viabilidade celular. Podem ocorrer alguns efeitos secundários, tais como degradação de macromoléculas vitais como proteínas, DNA e RNA, ou inibição de sua síntese. Já foi relatada, inclusive, interferência na formação e degradação de ATP (JACK; TAGG; RAY, 1995; FRANCO; LANDGRAF, 2003). Hoffmann et al. (2002), Cotter; Hill e Ross (2005) e Deegan et al. (2006) relatam que além de formar poros na membrana dos

microrganismos sensíveis, a nisina interfere na biossíntese da parede celular, sendo essa ação mediada pelo receptor específico de membrana denominado lipídio II.

Outra teoria quanto ao mecanismo de ação das bacteriocinas sugere que a atividade dessas não depende de sua adsorção específica na superfície das células sensíveis. A adsorção inespecífica deriva de sua natureza hidrofóbica, enquanto que a imunidade das cepas resistentes a bacteriocina se deve mais à produção de uma enzima implicada na imunidade do que da alteração nos receptores (PIARS; DESMAZEAUD, 1992; EIJSINK et al., 1998).

A maioria das bacteriocinas de BAL caracterizadas parece ter um mecanismo de ação comum, no qual dissipam a força próton-motriz (FPM), com variação no potencial de membrana ($\Delta\psi$) e no pH (ΔpH). Tais efeitos, em microrganismos-alvo, levam à formação de poros na membrana citoplasmática (BRUNO; MONTVILLE, 1993; MOLL; KONINGS; DRIESSEN, 1999; CLEVELAND et al., 2001; PAPAGIANNI, 2003).

Montville e Chen (1998), Moll; Konings e Driessen (1999) apresentaram dois modelos que oferecem mecanismos alternativos para a formação dos poros. Ambos os modelos propõem que, inicialmente, a nisina liga-se à membrana-alvo através de algum grau de interação eletrostática. Os dois modelos descritos são mostrados na Figura 2.



A. Representação esquemática da nisina mostrando domínios N e C-terminais conectados por uma região flexível. A face hidrofílica está representada como escura e a hidrofóbica, como clara.

B. Modelo de Ojcius e Young (1991), Sahl (1991).

C. Modelo de Driessen et al. (1995).

Fonte: Montville e Chen (1998).

Figura 2 - Modelos propostos para a formação de poros pela nisina.

No primeiro (Modelo B), a nisina liga-se como um monômero, insere-se nas bicamadas de lipídeos e os monômeros inseridos agregam-se lateralmente para formar poros (OJCIUS; YOUNG, 1991; SAHL, 1991). No segundo (Modelo C), a formação dos poros é causada por uma perturbação local na camada lipídica que ocorre quando as moléculas de nisina se ligam. A nisina é então puxada para a membrana por um componente da FPM. A orientação das moléculas não muda relativamente aos grupos lipídicos, portanto, o peptídeo não entra em contato com a parte hidrofóbica da membrana. Em vez disso, os resíduos hidrofóbicos da nisina são, superficialmente, inseridos na parte externa da bicamada lipídica. Ainda não foi esclarecido como as interações eletrostáticas iniciais entre as moléculas de nisina positivamente modificadas e os fosfolipídios aniônicos da membrana transformam interações hidrofóbicas na estrutura predita (DRIESSEN et al., 1995).

3.2.1.4 Fatores que afetam a atividade da nisina

Existem alguns fatores importantes que podem afetar a atividade antimicrobiana da nisina, como por exemplo, condições de armazenamento, ação enzimática, pH e temperatura. Durante a estocagem, podem ocorrer perdas da atividade dessa bacteriocina em decorrência da temperatura e tempo de armazenamento, sendo então necessária a aplicação de diferentes concentrações de Nisaplin[®] no alimento para alcançar os objetivos desejados (DELVES-BROUGHTON, 1990a).

No que diz respeito à ação enzimática, a nisinase produzida por algumas bactérias, consegue inativar diferentes tipos de nisina (A, B, V e E) constituindo, dessa forma, um sério problema na fabricação de queijos que contém microrganismos produtores dessa enzima (KIM, 1993).

O pH exerce um efeito tanto sobre a solubilidade como também sobre a estabilidade da nisina, fazendo com que ambas diminuam com o aumento do pH (LIU; HANSEN, 1990). Baseado nisso, Henning; Metz e Hammes (1986a) sugeriram que essa bacteriocina deve ser aplicada somente em alimentos com pH inferior a 7,0 e onde o crescimento de microrganismos Gram-positivos não é desejado.

A temperatura também é importante na estabilidade da molécula de nisina, que se torna mais vulnerável ao efeito do calor, quando ocorre um aumento no valor de pH. Resultados obtidos por Delves-Broughton (1990a) revelaram que a porcentagem de retenção de atividade de Nisaplin[®], em tampão aquecido a 121°C por 15min, mostrou-se dependente do pH, com porcentagens de retenção de 100; 71; 35; 14,5 e 0,5 em pH 3; 4; 5; 6 e 7, respectivamente.

3.2.2 *Bacillus* produtores de bacteriocinas

Recentemente, vários estudos envolvendo *Bacillus* estão sendo direcionados para a produção de bacteriocinas. A subtilina, produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, é a bacteriocina mais amplamente estudada. Além de

Bacillus subtilis outras espécies de *Bacillus* estão sendo utilizadas para obtenção de bacteriocinas, como *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus megaterium* (OSCÁRIZ; LASA; PISABARRO, 1999).

Atualmente, têm sido estudadas as seguintes bacteriocinas produzidas por *Bacillus*:

- Ahern; Verschueren e Sinderen (2003) caracterizaram a thuricina 439, uma bacteriocina produzida por *Bacillus thuringiensis* B439. Os resultados obtidos nesse estudo confirmam que essa bacteriocina permanece ativa numa ampla faixa de pH e não perde a atividade antimicrobiana quando submetida a temperaturas superiores a 80°C. Para sua purificação foram utilizadas várias técnicas cromatográficas, resultando em dois peptídeos com a mesma seqüência N-terminal, mas com massas moleculares diferentes. Adicionalmente, Cherif et al. (2003) constataram que *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9 produz uma bacteriocina denominada entomocina 9, ativa contra *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e vários fungos. Essa bacteriocina manteve 72% de sua atividade antimicrobiana quando incubada a 121°C por 20min. É estável na faixa de pH de 3 a 9, perde sua atividade quando tratada com proteinase K, apresenta um peso molecular aparente de 12,4kDa e não é tóxica para células VERO. Na pesquisa não se verificou a presença de genes de virulência, incluindo hemolisina BL, enterotoxina não hemolítica e citotoxina K.

- Martirani et al. (2002) detectaram e caracterizaram a bacilocina 490 produzida por *Bacillus licheniformis*. Essa bacteriocina é inativada quando tratada com pronase E e proteinase K. Apresentou um peso molecular de 2kDa e foi ativa contra *Bacillus smithii*.

- Pattnaik; Grover e Batish (2005) estudaram o efeito de fatores ambientais na produção da lichenina, um composto codificado cromossomicamente como uma bacteriocina, produzido por *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA, isolado do rúmen de búfalo. Segundo esse estudo, a lichenina representa o primeiro composto antibacteriano de amplo espectro expresso em anaerobiose e efetivo

somente em condições de anaerobiose, sendo codificada pelo DNA cromossômico. Resultados obtidos pelos autores podem ser utilizados para a produção da lichenina em larga escala, com potencial de aplicação na manipulação da função do rúmen com o propósito de melhorar a produtividade dos ruminantes. Cladera-Oliveira; Caron e Brandelli (2004) constataram que a metodologia estatística de superfície de resposta pode ser empregada para otimizar a produção de bacteriocinas por *Bacillus licheniformis* P40. O soro de leite proveniente do queijo foi utilizado como meio para testar por superfície de resposta as variáveis temperatura, pH e concentração de leite. A análise estatística dos resultados demonstrou que todas as variáveis estudadas tiveram um efeito significativo na produção da bacteriocina. Dados da superfície de resposta demonstraram produção máxima de bacteriocina nos pHs iniciais de 6,5 e 7,5 e temperatura entre 26 e 27°C quando a concentração do soro de leite do queijo foi 70g.L⁻¹.

- A utilização de bactérias do gênero *Bacillus* como biocontroladores de fitopatógenos e patógenos humanos têm sido bastante pesquisada, haja vista que várias espécies desse gênero são responsáveis pela produção não só de bacteriocinas, mas também de antibióticos peptídicos antifúngicos e antibacterianos. Um exemplo desses compostos é a iturina A, produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* B94 utilizada no controle do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, responsável pela redução no rendimento da produção de soja. Outro exemplo desses compostos são as maltacinas, também pertencentes ao grupo de antibióticos peptídicos cíclicos de *Bacillus subtilis*, sendo ativos contra determinados patógenos humanos como *Candida albicans*, *Thricophyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus* (YU et al., 2002; HAGELIN et al., 2004).

- Kim e Chung (2004) caracterizaram uma potente proteína antifúngica isolada de uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908, proveniente do solo. A proteína isolada por cromatografia de filtração em gel apresentou, na eletroforese em poliacrilamida (SDS PAGE), um peso molecular aparente de 40kDa. A proteína isolada é estável a 80°C por 20min e apresentou um amplo espectro de atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos. Análises por microscopia mostraram que a proteína atua na parede celular do fungo

Colletotrichum lagenarium, responsável pela doença antracnose que afeta melancias. A seqüência aminoacídica N-terminal da proteína purificada também foi determinada, sendo Ser-Lys-Ile-x-Ile-Asn-Ile-Asn-Ile-x-Gln-Ala-Pro-Ala-Pro-x-Ala. A pesquisa da seqüência no programa NCBI BLAST demonstrou que a proteína purificada era inédita. Lisboa et al. (2006) caracterizaram uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens*, isolada da Floresta Atlântica brasileira, que inibe bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* e *Pasteurella haemolytica*. A substância antimicrobiana foi estável num amplo intervalo de temperatura, porém perdeu a atividade quando submetida a 121°C por 15 min. A atividade antimicrobiana máxima foi observada em valores de pH ácidos e neutros. A substância foi sensível frente à ação proteolítica da tripsina, da papaína, da proteinase K e da pronase E. Os autores concluíram o estudo afirmando que a atividade dessa bacteriocina contra *Listeria monocytogenes* atende a um aspecto importante da proteção dos alimentos.

- He; Chen e Liu (2006) isolaram uma nova bacteriocina de *Bacillus licheniformis* ativa contra diferentes espécies de bactérias Gram-positivas e fungos. Essa bacteriocina foi sensível ao tratamento com proteinase K e tripsina e sua atividade permaneceu estável durante tratamento térmico de 100°C por 30min, porém foi inativada quando submetida a 121°C por 15 min. O composto antagonista apresentou um peso molecular aparente de 3kDa em eletroforese Tricina-SDS-PAGE. O sobrenadante, livre de células bacterianas, manteve sua atividade inibitória numa faixa de pH de 2 a 9, sendo o pH ótimo para a mesma de 6,5.

- Motta; Cladera-Oliveira e Brandelli (2004) identificaram bactérias com atividade antimicrobiana entre 86 isolados de ambientes aquáticos da Bacia Amazônica. Destes, 59 isolados (68,6%) apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos uma bactéria indicadora. A atividade inibitória foi principalmente observada contra bactérias Gram-positivas, como *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. As substâncias antimicrobianas produzidas por 19 linhagens que demonstraram maior atividade inibitória foram parcialmente caracterizadas, apresentando resistência térmica até 100°C e resistência parcial

ao tratamento proteolítico. A detecção da atividade antimicrobiana em géis de poliacrilamida mostrou que os compostos apresentaram peso molecular inferior à 14kDa. Várias linhagens apresentaram atividade antibacteriana, que em alguns casos estaria relacionada com peptídeos antimicrobianos. Os pesquisadores afirmam que o potencial destes microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas é grande e merece ser mais explorado.

3.2.3 Métodos para detecção da atividade antimicrobiana

A maioria das antibioses entre bactérias é, primeiramente, resultado de estudos envolvendo a combinação de diferentes cepas bacterianas em meio ágar através de métodos de antagonismo diretos ou indiretos (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976).

Segundo De Martinis; Alves e Franco (2002), após excluir a possibilidade da inibição ter sido devida à produção de ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio, as cepas com atividade antagonista isoladas devem ser, em seguida, submetidas a ensaios confirmatórios para detecção da atividade inibitória. Entre os métodos diretos para confirmação, podemos destacar os seguintes:

a) difusão em poços: os sobrenadantes de culturas, supostamente produtoras de bacteriocinas, são colocados em orifícios cortados em uma placa de ágar semeado com o microrganismo indicador. Durante a incubação, a bacteriocina difunde-se pelo ágar, inibindo o crescimento do indicador e formando um halo ao redor do orifício;

b) “flip-streak”: as bactérias teste são semeadas em estrias na superfície de um meio sólido, invertendo-se em seguida esse meio. O organismo sensível à bacteriocina é então semeado no lado inverso do ágar. Durante a incubação, verifica-se a inibição do crescimento do microrganismo indicador;

c) “spot-on-the-lawn”: as culturas teste são semeadas como um ponto na superfície de um meio de cultura sólido adequado contendo ágar. Após a incubação dessa placa, adiciona-se uma camada de um indicador, observando-se a inibição de seu crescimento após uma nova incubação. A sensibilidade do inibidor a enzimas proteolíticas pode ser determinada empregando-se uma modificação da técnica “spot-on-the-lawn”. Nessa técnica, antes de se adicionar a

sobrecamada com o microrganismo indicador, adicionam-se ao meio proteases, além de água deionizada como controle negativo.

No antagonismo indireto, o microrganismo teste cresce no ágar por um período de tempo. As bactérias são então destruídas por exposição a clorofórmio ou aquecimento, e uma sobrecamada do microrganismo indicador em ágar fundido é plaqueada na superfície. Procedimentos de antagonismo indireto são mais sensíveis do que o antagonismo simultâneo e permite uma variação independente do tempo e condições de incubação do teste e cultura indicadora. Uma vantagem adicional desse procedimento é a exclusão da atividade de bacteriófago, porém uma desvantagem é que os vapores de clorofórmio podem inativar alguns agentes inibitórios. É importante testar a atividade inibitória das cepas por ambos os métodos e também utilizar vários meios e condições de crescimento. A condição ótima de crescimento do microrganismo teste não necessariamente coincide com a máxima produção de bacteriocina. Entretanto, a composição do meio pode afetar indiretamente a sensibilidade do microrganismo indicador (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976).

Para a extração de substâncias semelhantes à bacteriocinas, a maioria dos métodos utiliza precipitação com sulfato de amônio (0 a 20%) a partir do meio de cultura após o crescimento da cepa produtora, mas já livre de células (NACLERIO et al., 1993; FARIAS; HOLGADO; SESMA, 1994).

Após precipitação, as bacteriocinas são submetidas a técnicas de cromatografia para purificação e determinação da composição e sequência de aminoácidos. Algumas bacteriocinas, quando purificadas, tornam-se instáveis, perdendo sua atividade biológica, já outras necessitam de duas ou mais substâncias para permanecerem ativas (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 1995; KALMOKOFF; TEATHER, 1997; ZAMFIR et al., 1999).

3.2.4 Enzimas produzidas por *Bacillus* spp.

De acordo com Abate et al. (1999), o gênero *Bacillus* é a maior fonte industrial de enzimas e *Bacillus amyloliquefaciens* é uma das espécies mais amplamente utilizadas para a produção de α -amilase e proteases.

Bactérias utilizadas para produção comercial de α -amilase foram originalmente isoladas e denominadas *Bacillus amyloliquefaciens* (PRIEST, 1993). Apesar de ser eventualmente confundido com *Bacillus subtilis*, são baixos os níveis de homologia entre as seqüências de DNA dessas duas espécies e também as amilases que produzem possuem diferentes propriedades (WELKER; CAMPBELL, 1967a; WELKER; CAMPBELL, 1967b). *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* possuem, em média, de 17 a 36% de homologia; *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis*, 9 a 17%. Assim, *Bacillus amyloliquefaciens* foi estabelecida filogeneticamente como espécie. Estudos subseqüentes revelaram que várias características fenotípicas como fermentação de lactose, utilização de gliconato e secreção de DNase e carboximetilcelulase são capazes de prontamente distingui-lo de *Bacillus subtilis* (PRIEST, 1993).

A α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* possui peso molecular aparente de 50kDa, é estável em pH de 5,5 a 9,0 e em temperaturas de até 80-90°C. Sua biossíntese é controlada tanto pela indução por substratos quanto pela repressão catabólica. É produzida no final da fase de crescimento exponencial e no começo da fase estacionária. Apresenta-se como enzima extracelular e somente pequenas quantidades dela permanecem ligadas à célula (MORCEL; BIEDERMANN, 1994).

Abate et al. (1999) relataram características interessantes do *Bacillus amyloliquefaciens* com relação à sua curva de crescimento e produção de enzimas. Segundo eles, a presença de extrato de levedura aumentou significativamente o crescimento desse microrganismo no meio de cultura utilizado. Em co-cultura com *Zimomonas mobilis*, observaram uma diminuição nos valores detectados de etanol, o qual estaria, provavelmente, sendo utilizado pelo

Bacillus amyloliquefaciens, uma vez que essa bactéria pode crescer em meio contendo etanol como única fonte de carbono. Quanto à produção de α -amilase, foi possível detectá-la no início da fase de crescimento exponencial e a adição de extrato de levedura aumentou muito a quantidade produzida e a atividade específica dessa enzima (unidades de enzima/grama de biomassa). Contudo, a produção de proteases também foi aumentada, levando à inativação da α -amilase depois de 24h; no final da fase exponencial. Mamo e Gessesse (1999) destacaram ainda a influência que a disponibilidade de oxigênio, pH e a fonte de nitrogênio podem exercer sobre a produção desta enzima.

De maneira geral, as bactérias possuem vários sistemas que as permitem controlar a secreção de enzimas. Simonen e Palva (1993) publicaram uma revisão bibliográfica sobre secreção de proteínas por espécies de *Bacillus*, onde discorrem sobre estruturas e mecanismos envolvidos na liberação (por exemplo, peptídeos sinalizadores e Complexo-S) e que influenciam na produção e no próprio processo secretório dessas substâncias (como proteólise, estrutura de parede celular e mecanismo de retroalimentação).

Schulz (2000) e Bonelli (2001) desenvolveram uma técnica de obtenção do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, em tampão fosfato, utilizando técnicas de precipitação, diálise e esterilização por filtração em membrana. No teste de sensibilidade a enzimas, esse extrato antibacteriano perdeu parcialmente sua atividade quando tratado com protease de *Streptomyces griseus*, protease de *Aspergillus saitoi* e alfa-amilase, indicando sua natureza protéica.

Adicionalmente, Schulz (2003) constatou que: (i) é possível obter o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, tanto em água destilada quanto em tampão fosfato; (ii) nos ensaios de atividade antimicrobiana utilizando *Listeria monocytogenes* a 10^5 UFC/ml como microrganismo indicador, o extrato bruto apresentou um halo de inibição máximo (raio) de 8,3mm (profundidade) e 7,5mm (superfície) numa concentração de 80 μ g e 10 μ g de proteínas, respectivamente; (iii) em ágar sangue (AS), utilizando *Listeria monocytogenes* a

10^5 UFC/ml como microrganismo indicador, observou-se que o extrato bruto apresentou um halo de inibição máximo (raio) de 4,5mm (profundidade) e 6,6mm (superfície) numa concentração de 80 μ g e 10 μ g de proteínas, respectivamente; (iv) na determinação da composição global de aminoácidos do extrato bruto em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) - 7,5 a 20%/dodecil sulfato de sódio (SDS) - 10% foram constatadas seis bandas com pesos moleculares aparentes de: 14,8; 20; 29; 30; 34 e 56,2kDa e esse é composto principalmente de aminoácidos hidrofóbicos (não polares), incluindo a prolina (446,77ppm), leucina (11,03ppm), valina (6,27ppm), isoleucina (4,59ppm), alanina (2,91ppm) e glicina (1,87ppm). A quantidade de aminoácidos totais presentes no extrato bruto foi de 526,59ppm; (v) em ensaios de citotoxicidade, o extrato bruto apresentou uma concentração hemolítica 50% em tubos na concentração de 11,43 μ g de proteínas numa suspensão de eritrócitos de carneiro e uma concentração citotóxica 50% na concentração de 32,14 μ g de proteínas em células VERO; o halo de hemólise máximo (raio) em AS foi de 5,6mm (profundidade) e 5,7mm (superfície) numa concentração de 80 μ g e 10 μ g de proteínas, respectivamente.

Schulz (2003) concluiu o estudo afirmando que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 é composto, principalmente, de proteases e outras enzimas bacteriolíticas, sugerindo estudos adicionais para se obter um resultado mais conclusivo da toxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, como ensaios *in vivo* de toxicidade aguda, sub-crônica e crônica.

Cepas geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* produziram subtilisina com peso molecular de 28,5kDa. Essa subtilisina (Carlsberg) foi, primeiramente, isolada nos anos 50 de uma cepa classificada como *Bacillus subtilis* e, posteriormente, reclassificada como *Bacillus licheniformis*. A segunda maior protease extracelular de *Bacillus subtilis* é a protease neutra (30kDa) ou metaloprotease (40kDa). Além de proteases extracelulares presentes na cultura de *Bacillus subtilis*, vários pesquisadores têm verificado a presença de outras serina proteases. Dentre essas, a Bacilopeptidase F (50kDa) que possui forte atividade proteolítica. Protease neutra, subtilisina e Bacilopeptidase F foram as

únicas proteases extracelulares originalmente detectadas em culturas de *Bacillus subtilis*. Uma das menores proteases isoladas de cepas de *Bacillus subtilis* modificados foi a metaloprotease Mpr com peso molecular de 28kDa. Duas proteases intracelulares têm sido isoladas da esporulação ou fase estacionária de células de *Bacillus subtilis*, sendo a primeira protease caracterizada a intracelular serina protease (ISP) com peso molecular de 31kDa. Estudos recentes têm indicado que essa enzima está sujeita à proteólise durante a purificação e que possui, *in vivo*, um peso molecular de 34kDa (PERO; SLOMA, 1993; OH; KIM; PARK, 2002).

A atividade hemolítica apresentada por algumas espécies de bacilos pode estar relacionada à sua atividade antimicrobiana, pois ambas são resultantes da ação de substâncias que tem como alvo primário à membrana citoplasmática, tanto em células procariontes quanto eucariontes. Isso foi observado no estudo de Boucabeille et al. (1997), que isolou a linenscina, uma substância com atividade antimicrobiana e hemolítica de *Brevibacterium linens* OC2.

A maioria dos peptídeos de *Bacillus* contém altas concentrações de prolina e glicina, o que confere dobras β no final do centro hidrofóbico na posição -5 a -7 do C-terminal (+1 refere ao aminoácido N-terminal da proteína madura), sendo suas cadeias peptídicas estabilizadas por pontes de hidrogênio. O grupo amino secundário (imino) da prolina é mantido em uma conformação rígida que reduz a flexibilidade estrutural nesse ponto da cadeia polipeptídica (PERO; SLOMA, 1993; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

3.3 Aplicação de substâncias antimicrobianas na conservação e processamento de alimentos

Com a emergência de microrganismos psicrotóxicos em alimentos, o desenvolvimento de novas tecnologias e a procura dos consumidores por alimentos naturais, as bacteriocinas e/ou seus microrganismos produtores têm sido reconhecidos como uma fonte potencial de bioconservadores para alimentos (MARTH, 1998; MORENO; LERAYER; LEITÃO, 1999).

Algumas espécies de *Bacillus* são utilizadas como probióticos em nutrição humana, bem como para prevenir distúrbios gastrintestinais. Os probióticos também são usados como suplementos de rações em aqüicultura. No sudeste asiático os produtos contendo probióticos são administrados como agentes terapêuticos, já em outros países são também usados como agentes profiláticos de diarreia infantil. Esses probióticos são comercializados na forma de endosporos em dose única contendo 10^9 esporos/g ou 10^9 esporos/ml. Dentre as espécies de *Bacillus* utilizadas como probióticos encontra-se *Bacillus subtilis*. O efeito probiótico no hospedeiro ocorre por três mecanismos básicos: (i) imunomodulação do tecido linfóide associado ao intestino; (ii) exclusão competitiva dos patógenos gastrintestinais e por (iii) secreção de compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de patógenos (DUC et al., 2004).

Apesar do grande número de trabalhos de pesquisa sobre a aplicação de bacteriocinas em bioconservação, o uso efetivo desses compostos em alimentos ainda é bastante limitado, particularmente às produzidas por *Bacillus* spp. A idéia da utilização de nisina em alimentos foi sugerida pela primeira vez por Hirsch et al. (1951), depois de realizar um experimento com linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* na fabricação do queijo suíço, obtendo como resultado a inibição do estufamento tardio causado por *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum* (DELVES-BROUGHTON, 1990b; ROBERTS; ZOTTOLA; MICKAY, 1992). Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5mg/kg e nosso país é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida a sua aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico grau alimentício (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Benkerroum e Sandine (1988) investigaram a utilização de nisina no controle de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em queijo "Cottage", realizando dois experimentos. O primeiro deles, envolveu duas séries de três amostras cada, contendo uma mistura estéril de 250g de queijo e 50ml de creme pasteurizado

(leite com 12% de gordura) cada uma. A primeira amostra de cada série foi destinada à adição de nisina e *Listeria monocytogenes*, perfazendo uma concentração final de $2,55 \times 10^3$ UI/g e $3,5 \times 10^5$ células/g de queijo, respectivamente. A outra amostra designada de controle positivo teve somente adição da bactéria estudada, enquanto que a terceira delas serviu como controle negativo. Dessas amostras, uma das séries foi incubada a 4°C e a outra a 37°C. O segundo experimento realizado foi diferente do anterior pela não esterilização da mistura e pela temperatura de incubação, que só ocorreu a 4°C. Os dados obtidos revelaram que em ambos os casos, com ou sem esterilização, a presença de *Listeria monocytogenes* não foi detectada depois de 24h nas condições estudadas, permitindo aos autores concluir que a adição da nisina não somente inibiu o crescimento, mas também eliminou esse microrganismo.

Além da nisina, outras bacteriocinas produzidas por BAL já foram testadas em alimentos, principalmente produtos cárneos e laticínios, com relativo sucesso, podendo ser adicionadas na forma purificada ou semi-purificada como um ingrediente, por incorporação de um ingrediente previamente fermentado por uma cepa bacteriogênica ou pela adição de uma cultura inicializadora em alimentos fermentados com produção da bacteriocina *in situ* (McMULLEN; STILLES, 1996; BUYONG; KOK; LUCHANSKY, 1998; WESSELS; JELLE; NES, 1998; DEEGAN et al., 2006).

No entanto, a autorização para que uma dada bacteriocina seja regulamentada para uso em alimentos, depende dos alimentos nos quais ela será usada e seu propósito nos mesmos. O uso de bacteriocinas purificadas, microrganismos produtores de bacteriocinas, ou expressão genética de bacteriocinas em microrganismos produtores de alimentos, nos Estados Unidos, está sob jurisdição da *Food and Drug Administration* (FDA) e são regulamentados como ingredientes alimentares sob o *Federal Food, Drug and Cosmetic Act* (FFDCA). No FFDCA, as substâncias são reconhecidas como seguras (*substances generally recognized as safe* - GRAS) por especialistas qualificados. A decisão é baseada em pesquisas científicas ou no fato de tais agentes já estarem presentes, historicamente, sem problemas em alimentos (FIELDS, 1996).

As bacteriocinas, em geral, são uma das opções em um mosaico de possíveis mecanismos para controlar bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos. Porém, é importante lembrar que elas jamais poderão substituir as boas práticas de fabricação fundamentais para a produção de alimentos seguros (GIRAFFA, 1995).

Nos últimos 20 anos, a redução no custo e a maior disponibilidade no mercado de enzimas tem estimulado o interesse da indústria na aplicação de catalisadores biológicos no processamento de alimentos (TUCKER; WOODS, 1995).

Proteases de *Bacillus amyloliquefaciens* são muito utilizadas na produção de queijos, com intuito de melhorar o sabor. Essas enzimas também são usadas para remover proteínas aderidas à espinha de peixes, que são difíceis de serem removidas mecanicamente, sendo posteriormente usadas na fabricação de enlatados e sopas. Na indústria de panificação, as proteases são usadas na hidrólise parcial do glúten de farinhas para massas de pães, bolos e biscoitos (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

A subtilisina de *Bacillus subtilis* vem sendo utilizada para proteólise de proteínas de soja na produção de molho de soja. Além de melhorar a capacidade emulsificante na produção de salsichas e mortadelas, as proteínas hidrolisadas de soja melhoram o sabor de carnes curadas (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

Além das proteases e subtilisina, produzidas por *Bacillus* spp., Hewitt e Solomons (1996) apresentam a α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* como uma enzima de grande importância comercial para hidrólise, tanto de dextrinas de alto peso molecular quanto de polímeros de glicose de baixo peso molecular, utilizada pela indústria alimentícia.

Esses são apenas alguns exemplos do potencial de aplicação das bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. na conservação e processamento de alimentos. Muitas dessas substâncias precisam ainda ser descobertas e melhor caracterizadas para utilização pela indústria alimentícia.

3.4 Segurança de bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp.

As bacteriocinas são ainda pouco utilizadas industrialmente como conservadores de alimentos, em função dos elevados custos dos ensaios toxicológicos necessários para liberar um novo antimicrobiano (GOULD, 1996).

Os principais estudos toxicológicos envolvendo bacteriocinas relatados até o momento se referem aos testes realizados para a aprovação do uso da nisina como bioconservador em alimentos (FDA, 1988).

Frazer; Sharratt e Hickman (1962) investigaram a toxicidade aguda e crônica dessa bacteriocina e pelo estudo de sensibilização intestinal em cobaias. No ensaio de toxicidade aguda os grupos de 10 cobaias foram tratados por 12 semanas com queijo contendo nisina. A dose máxima administrada foi de $2,4 \times 10^6$ UI/kg de peso corpóreo. Nesse estudo não foi observada diferença significativa em relação ao grupo controle, quanto ao peso, estado clínico e histologia. No ensaio de toxicidade crônica, realizado durante dois anos, foram utilizados grupos de cobaias constituídos de 30 fêmeas e 15 machos. A dose máxima administrada foi de $3,3 \times 10^6$ UI/kg de peso corpóreo/dia. O grupo tratado com a maior dose apresentou um aumento significativo do peso dos rins em relação ao grupo controle. Já no ensaio de sensibilização intestinal em cobaias não se constatou sensibilização no íleo após administração de 5×10^4 UI/kg de peso corpóreo/dia, durante três meses.

De acordo com Henning; Metz e Hammes (1986a), a nisina foi aceita como aditivo alimentar em 1969 pelo Comitê Conjunto da Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS). O mesmo estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) para a nisina de 33.000 UI/kg de peso corpóreo, baseando-se nos estudos de Frazer; Sharratt e Hickman (1962). Em nisina pura essa IDA corresponde a $821 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo, ou seja, para uma pessoa de 70kg corresponde a uma ingestão de 58mg de nisina pura por dia.

Em 1988, o FDA considerou essa bacteriocina como uma substância GRAS, ou seja, segura para a saúde do consumidor (HARRIS; FLEMING; KLAENHAMMER, 1991).

Em 1990 o Comitê Científico em Alimentos da União Européia estabeleceu uma IDA de 0,13mg/kg de peso corpóreo para o produto contendo nisina na concentração de 40×10^6 UI/kg. Isso corresponde a 5.200UI/kg de peso corpóreo (ou 130µg de nisina pura/kg de peso corpóreo), sendo aproximadamente 6,5 vezes menor que a IDA estabelecida pelo comitê FAO/OMS (WESSELS; JELLE; NES, 1998).

Considerando que a nisina é consumida por via oral, Claypool et al. (1966), realizaram estudos sobre os efeitos dessa na microbiota oral. A partir desses estudos foi constatado que um minuto após o consumo de leite achocolatado contendo nisina foi possível detectar apenas 40% de sua atividade quando comparada ao controle de saliva. Em contraste, o mesmo estudo mostrou que quando o leite achocolatado tinha penicilina, a saliva apresentava atividade antimicrobiana por um tempo maior. Outro estudo mostrou o efeito das enzimas gástricas sobre a nisina; o peptídeo antimicrobiano é inativado pela tripsina e a partir disso concluiu-se que a ingestão da nisina não interfere sobre a microbiota gastrintestinal (HARA et al., 1962).

A bacteriocina com maior uso comercial é a nisina, mas a segurança de outras bacteriocinas com potenciais aplicações em alimentos também tem sido avaliada. A pediocina PA-1 foi injetada tanto em ratos como em camundongos e o teste imunológico mostrou que a pediocina não é imunogênica para ambos animais. Esse peptídeo é também suscetível a proteólise por tripsina e quimiotripsina (BHUNIA et al., 1990).

Muitos microrganismos do gênero *Bacillus* são utilizados na fermentação de alimentos. Por outro lado, algumas espécies também podem causar deterioração e toxinfecções alimentares. *Bacillus cereus* é um patógeno clássico, causador de síndrome diarréica ou emética, porém, outras espécies de *Bacillus*, incluindo *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis* têm sido

relacionadas a enterites seguidas de ingestão de alimentos contaminados com essas bactérias (JAY, 1996; LINDSAY et al., 2000; EHLING-SCHULZ; FRICKER; SCHERER, 2004).

Contudo, a principal contribuição do gênero *Bacillus* para a indústria dá-se através da produção de uma grande variedade de enzimas como, por exemplo, xilanase, α -amilase e proteases (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003; ASGHARI et al., 2004; HECK et al., 2005).

Segundo Fermanian e Wong (2000), a hemolisina BL produzida por *Bacillus cereus* é composta de três proteínas distintas B, L1 e L2; as quais não são tóxicas individualmente, mas quando combinadas são hemolíticas, enterotoxigênicas, dermonecroticas e citotóxicas para vários tipos de células e tecidos.

A citotoxicidade da toxina CytK, produzida por *Bacillus cereus*, foi avaliada utilizando uma linhagem de células epiteliais intestinais denominada CACO-2. Nesse estudo foi constatado que a quantidade de proteína necessária para inibir em 50% a síntese de proteínas foi de 16ng, sendo aproximadamente 10.000 vezes mais potente que a β -toxina produzida por *Clostridium perfringens*, que é considerada citotóxica e não citolítica. A atividade da CytK está diretamente relacionada com a formação de poros na membrana das células CACO-2. Os valores obtidos no estudo foram cinco vezes menores do que os encontrados utilizando a linhagem de células epiteliais renais VERO (HARDY; LUND; GRANUM, 2001).

Pariza e Foster (1983) discutiram os critérios de segurança para enzimas industriais usadas no processamento de alimentos, derivadas de cepas melhoradas via metodologias tradicionais (não-recombinantes). Os seguintes pontos foram analisados: a segurança da cepa com atenção especial para o seu potencial toxigênico e patogênico; alergias e irritações primárias; carcinogênese e mutagênese; teratogênese e efeitos reprodutivos; antibióticos; produtos de reação enzimática; interações entre enzimas e outros componentes alimentares e efeitos diretos das enzimas alimentares sobre o consumidor. Segundo esses mesmos

autores, a avaliação de segurança de enzimas alimentares começa pelo teste oral de toxicidade aguda em ratos com dose única, onde essa deve ser equivalente, no mínimo, a 100 vezes a exposição humana média estimada ou no mínimo 2.000mg/kg de peso corporal, conforme diretrizes estabelecidas para testes em animais (OECD, 1987). O segundo teste de toxicidade proposto é um estudo da dose oral repetida (14-91 dias) de preferência em ratos, onde o material teste pode ser administrado na ração ou via sonda esofágica. A dose mínima para esse teste deve ser ao menos 100 vezes a exposição média humana estimada. Além disso, os autores recomendam que o material teste seja avaliado quanto à presença de micotoxinas, como as aflatoxinas, zearalenona, toxina T-2, ocratoxina A e esterigmatocistina.

O ensaio de toxicidade aguda determina o potencial de letalidade através da determinação da dose letal mediana (DL_{50}), tendo em vista que, com raras exceções, as únicas toxinas produzidas por bactérias são proteínas ou peptídeos, como, por exemplo, certas enterotoxinas ou neurotoxinas (PARIZA; FOSTER, 1983). De acordo com o protocolo internacional, um ensaio limite pode ser realizado com apenas 10 animais quando utiliza-se dose única de no mínimo 2.000mg/kg. No caso de não observação de mortalidade, esse ensaio pode ser considerado como definitivo. Em havendo mortalidade, esse deve ser realizado com três doses. O protocolo internacional não preconiza a necessidade de um grupo controle negativo paralelo ao grupo experimental em caso da utilização do veículo para o qual há controle histórico do laboratório (OECD, 1987).

Apesar de Pariza e Foster (1983) questionarem se é cientificamente justificado e necessário testar novas preparações de enzimas alimentares quanto à atividade mutagênica, os testes continuam sendo conduzidos, muitas vezes devido a exigências regulamentares em determinados países. Vale, portanto, mencionar que, os testes de toxicidade *in vitro* quanto a agentes mutagênicos e clastogênicos exigidos para novas preparações enzimáticas se mostraram semelhantes aos determinados por química analítica e testes em animais. Segundo esses autores, existem três razões para isso: (i) proteínas, incluindo enterotoxinas e neurotoxinas alimentares produzidas por algumas bactérias não são genotóxicas; (ii) todas as micotoxinas conhecidas, algumas das quais

genotóxicas, também induzem outros efeitos tóxicos em animais de laboratório, facilmente detectáveis em testes alimentares de curto prazo; e (iii) existem procedimentos analíticos confiáveis para virtualmente todas as toxinas e micotoxinas protéicas alimentares.

Phelps e McKillip (2002) investigaram a presença dos genes *hbIC*, *hbID*, *hbIA*, *nheA* e *nheB* e dos operons HBL e NHE, responsáveis pela produção de enterotoxinas, em 39 espécies de *Bacillus* incluindo *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentimorbis*, *Bacillus pasteurii* e *Bacillus thuringienses*, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaios imunológicos e a detecção em placa de lecitinase e hemólise. Os resultados obtidos confirmam a presença dos genes em espécies de *Bacillus* fora do grupo do *Bacillus cereus* e a habilidade em produzir toxinas em sistemas alimentares em aerobiose a 32°C.

Recentemente, têm sido realizados vários estudos do potencial citotóxico de cepas industriais de *Bacillus sp.* utilizando ensaios *in vitro*. Pedersen et al. (2002) investigaram o potencial citotóxico de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* em células de óvário de hamsters utilizando o ensaio do sal de tetrazólio (MTT) e ensaios imunológicos, onde concluíram que as espécies de *Bacillus* pertencentes ao grupo *subtilis* são seguras para uso industrial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O extrato bruto antibacteriano foi obtido de uma cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, isolada por Batista (1993).

Nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto foram utilizadas culturas de *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Aspergillus fumigatus* ATCC 9197, *Penicillium commune* J238, *Rhodotorula muscilaginosa* J350, *Pichia anomala* DSM 70255 e *Kluveromyces marxianus* ATCC 16045, adquiridas da Fundação André Tosello de Campinas, SP.

Para o ensaio de genotoxicidade foram utilizadas células VERO ATCC-CCL 81, que são culturas contínuas de fibroblastos de *Cercopithecus aethiops*, adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC).

No ensaio de toxicidade aguda em ratos, foram utilizados 10 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), brancos, adultos e sadios, com sete semanas de idade de ambos os sexos, pesando entre 202 e 380g, adquiridos junto ao Setor de Criação do Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP de São Paulo, SP.

Para análise toxicológica aguda do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 também foram utilizados 100 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas, pesando entre 25 e 35g, adquiridos do Biotério Central da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) de Tubarão, SC.

Na análise toxicológica de doses repetidas foram utilizados 160 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas, pesando entre 25 e 35g, adquiridos do Biotério Central da UNISUL de Tubarão, SC.

4.1 Atividade antimicrobiana do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

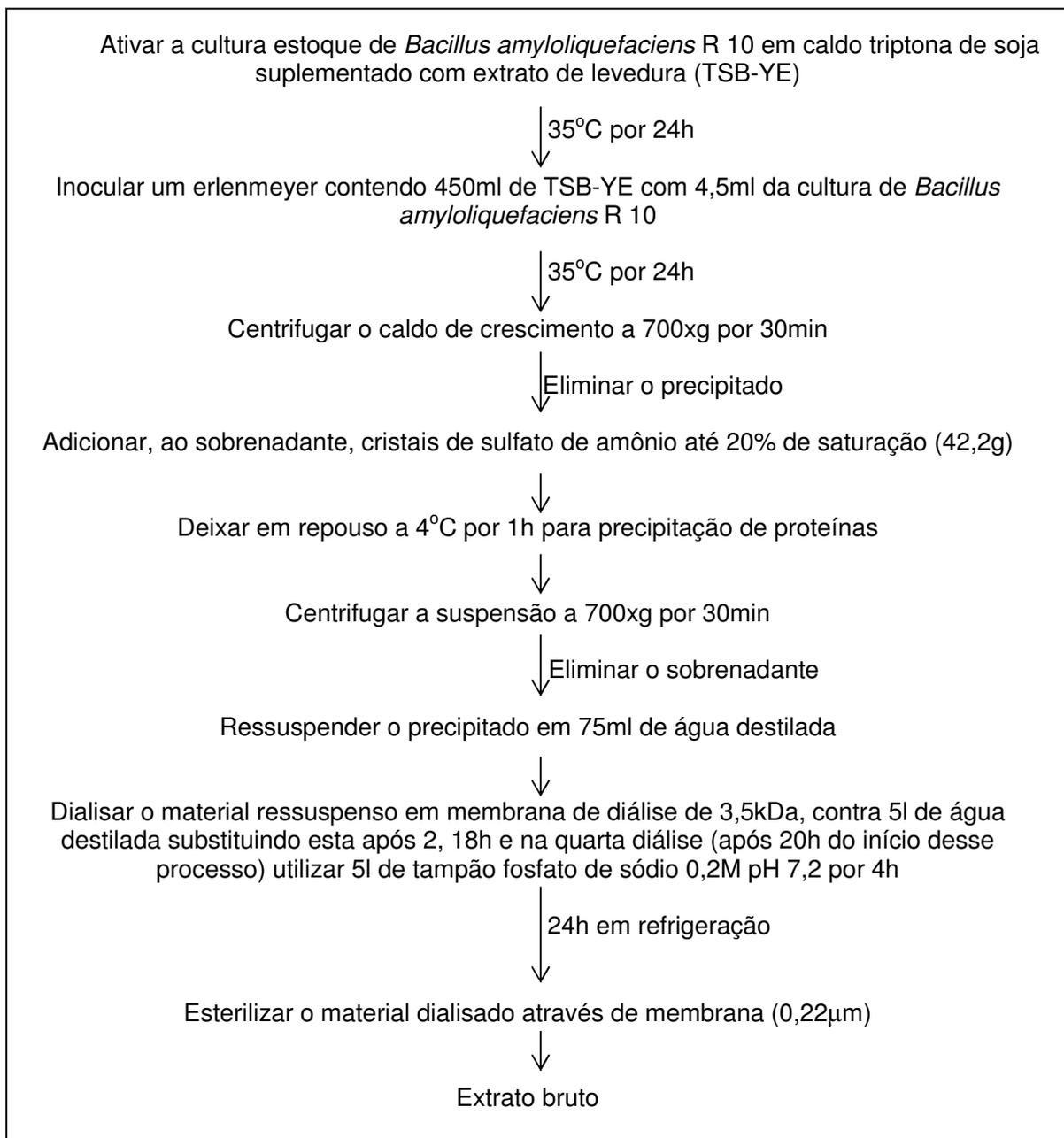
4.1.1 Obtenção do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

O processo de obtenção do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 e a triagem de sua atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CAL do CCA da UFSC, de acordo com a metodologia utilizada por Schulz (2003), com algumas modificações.

Todos os ensaios desse trabalho foram realizados com dois *pools* de extrato bruto, sendo um obtido pela mistura de extratos brutos extraídos em tampão (Quadro 2) e o outro obtido pela mistura de extratos brutos extraídos em água, constituídos de 1l e 3l de extrato bruto, respectivamente. O *pool* extraído em água foi obtido utilizando somente água destilada no processo de ressuspensão do precipitado e em todas as etapas de diálise. Esse foi utilizado em todos os ensaios, exceto para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto utilizando diferentes indicadores. Os *pools* foram concentrados por liofilização (Liofilizador Terroni Favel LT1000/8) conforme a necessidade, sendo previamente testados quanto à atividade antimicrobiana antes de serem utilizados nos ensaios (DAWSON et al., 1969; KAISER; MONTVILLE, 1996). Os *pools* de extratos brutos foram liofilizados no Laboratório de Biotecnologia Alimentar do CAL do CCA da UFSC.

O processo de diálise foi monitorado, qualitativamente, com o reagente de Nessler, objetivando o controle da remoção de todo o sulfato de amônio utilizado no processo de precipitação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996).

Quadro 2 – Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10.



Fonte: Schulz (2003), com algumas modificações.

Para triagem da atividade inibitória do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 obtido foram preparadas placas contendo ágar triptona de soja suplementado com extrato de levedura (TSA-YE) que, após solidificado, foi inoculado, por semeadura em superfície, com 0,1ml de *Listeria monocytogenes* na concentração de 10^5 UFC/ml, previamente ativada em TSB-YE a 35°C por 24h.

Volumes de 10µl do extrato bruto foram aplicados na superfície de placas de TSA-YE. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30min para difusão do extrato bruto no ágar e depois incubadas a 35°C por 24h. Após incubação foi realizada a leitura para observação dos halos de inibição. Essa triagem da atividade antimicrobiana do extrato bruto foi realizada a cada extração para ser em seguida padronizada pela dosagem de proteínas e, posteriormente, avaliada nos ensaios de atividade antimicrobiana utilizando diferentes indicadores (BATISTA, 1993; SCHULZ, 2000; BONELLI, 2001; SCHULZ, 2003).

4.1.2 Dosagem de proteínas do extrato bruto

A dosagem de proteínas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do CAL do CCA da UFSC.

A padronização da atividade antimicrobiana e dos ensaios de toxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada pela determinação da concentração de proteínas utilizando o Kit de Ensaio para Dosagem de Proteínas Totais (Analisa Diagnóstica - Método de Biureto) por comparação com padrão de albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi em espectrofotômetro (Hitachi U2010) a 545 nm.

4.1.3 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CAL do CCA da UFSC.

Para o estudo foram utilizadas placas de TSA-YE, previamente inoculadas com 0,1ml de cada microrganismo na concentração de 10⁵UFC/ml, pela técnica de difusão em poços. Foram testados 5, 20, 40, 60 e 80µl de uma solução estoque de 1000µg de proteínas/ml em tampão fosfato 0,2M pH 7,2, contendo 5, 20, 40, 60 e 80µg de proteínas, respectivamente. A atividade antibacteriana do

extrato bruto foi comparada com a nisina comercial (Nisaplin[®]), por ser essa a primeira bacteriocina utilizada comercialmente na conservação de alimentos. A partir de uma solução estoque de Nisaplin[®] contendo 1000µg de nisina/ml em tampão fosfato 0,2M pH 7,2, foram utilizados 5, 20, 40, 60 e 80µl contendo 5, 20, 40, 60 e 80µg de nisina, respectivamente. Após inoculação nas placas, foram necessários 30min para difusão do inóculo no ágar. Após esse período as placas inoculadas foram incubadas a 35°C por 24h. Como controle negativo foi utilizado tampão fosfato 0,2M pH 7. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela medida do raio do halo de inibição utilizando um paquímetro (BATISTA, 1993; SCHULZ, 2003).

4.1.4 Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CAL do CCA da UFSC, de acordo com Yu et al. (2002), Magnusson et al. (2003) e Kim e Chung (2004), com algumas modificações. Após reativação dos esporos e células liofilizadas em água destilada realizaram-se diluições decimais seguintes em água peptonada a 0,1%p/v.

Foram utilizadas placas de ágar dextrose batata (PDA) e ágar dextrose sabouraud (SDA) para os fungos e leveduras, respectivamente. As placas foram previamente inoculadas com 0,1ml de cada microrganismo na concentração de 10⁵esporos/ml e 10⁵UFC/ml para fungos e leveduras, respectivamente. O ensaio foi realizado pela técnica de difusão em poços. Para o estudo foram utilizados 5, 20, 40, 60 e 80µl de uma solução estoque de 1000µg de proteínas/ml em tampão fosfato 0,2M pH 7,2 contendo 5, 20, 40, 60 e 80µg de proteínas, respectivamente.

A atividade antifúngica do extrato bruto foi comparada com a nisina comercial (Nisaplin[®]), por ser essa a primeira bacteriocina utilizada comercialmente na conservação de alimentos. A partir de uma solução estoque de Nisaplin[®] contendo 1000µg de nisina/ml em tampão fosfato 0,2M pH 7,2, foram utilizados 5, 20, 40, 60 e 80µl contendo 5, 20, 40, 60 e 80µg de nisina,

respectivamente. Após inoculação nas placas foram necessários 30min para difusão do inóculo no ágar. Após esse período as placas inoculadas foram incubadas a 24°C por 96h e 28°C por 48h para fungos e leveduras, respectivamente. Como controle negativo foi utilizado tampão fosfato 0,2M pH 7. A atividade antifúngica foi avaliada pela medida do raio do halo de inibição utilizando um paquímetro (BATISTA, 1993; SCHULZ, 2003).

4.2 Toxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 *in vitro*

O estudo de toxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizado de acordo com o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos descrito na Resolução RE nº 90/2004 (BRASIL, 2004).

4.2.1 Genotoxicidade

A avaliação da genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada do MIP do CCB e do CIF do CCS da UFSC.

Para o estudo da genotoxicidade foi utilizado o Ensaio do Cometa, segundo a técnica alcalina originalmente proposta por Singh et al. (1988), com algumas modificações na preparação das lâminas propostas por Klaude et al. (1996) e de acordo com as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000).

a) Procedimento

As células VERO ATCC-CCL 81, foram cultivadas em placas de 24 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/ml, 1ml/cavidade), formando uma monocamada confluyente em 24h a 37°C/5% de CO₂. Essas células foram cultivadas em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100U/ml de estreptomicina/penicilina/fungizona. Após o tapete formado, cada uma das

amostras foi adicionada à placa (500µl/cavidade), a qual foi incubada durante 90min, a 37°C/5% CO₂, para avaliação da indução de genotoxicidade por exposição aguda das células ao extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. As concentrações utilizadas do extrato bruto foram 60, 80 e 100µg/ml de proteínas. Os controles positivos foram lâminas preparadas com células VERO tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 200 e 100µM, durante 90min, a 37°C/5% CO₂. A titulação da solução a 30% de H₂O₂ por permanganometria, foi realizada periodicamente, para garantir a concentração dos controles positivos. Os controles negativos foram lâminas preparadas com células VERO não tratadas, ou seja, contendo apenas meio de manutenção, submetidas ao mesmo tratamento que as demais.

b) Preparação da suspensão celular

Após os tratamentos, o tapete celular de cada cavidade das placas foi lavado três vezes com 300µl de tampão fosfato de sódio (PBS) e então tripsinizado. Em cada cavidade, foram adicionados 150µl da solução de tripsina (0,05%): EDTA (0,02%), deixando-se agir por até 5min, para a obtenção da suspensão celular a ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio mínimo essencial (MEM)/5% soro fetal bovino - SFB (500µl/cavidade). A suspensão celular foi recolhida com auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugada a 350xg por 3min em tubo Falcon. Após o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram ressuspendidas com 200µl de meio MEM de forma a obter uma suspensão de aproximadamente 1x10⁸células/ml. Essa suspensão celular foi, posteriormente, adicionada à agarose de baixo ponto de fusão (Gibco BRL) para formar a segunda camada sobre as lâminas. Foram utilizadas duas lâminas por tratamento.

c) Preparação das lâminas

Conforme as modificações propostas por Klaude et al. (1996), foram utilizadas lâminas de microscópio foscas apenas numa das extremidades, desengorduradas, e que já tiveram uma primeira camada de agarose formada com uma solução de agarose de ponto de fusão normal (Gibco BRL) a 1,5% em

PBS livre de íons cálcio e magnésio e deixadas à temperatura de 4°C para secagem. Após coloração e análise, as lâminas podem, ainda, ser secadas novamente e guardadas sem que haja perda importante de material ou alteração na aparência dos cometas.

Para cada lâmina foram usados 40µl da suspensão celular, previamente preparada e tratada, e 60µl de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio, mantida a 37°C. Uma lamínula de 24x60mm foi colocada sobre cada lâmina, imediatamente, para que a agarose não secasse, antes de se espalhar por toda lâmina. As lâminas foram deixadas a 4°C, por 15min, para a solidificação da agarose.

d) Lise celular

Em seguida, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram submersas em 100ml de solução de lise gelada (4°C), recém-preparada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris-HCl 10mM, qsp de NaOH 10N para obter pH 10) adicionada de 10% DMSO e 1% Triton X-100. A solução de lise é uma solução detergente contendo altas concentrações de sais, que promove a desintegração das membranas celulares. As lâminas podem permanecer nesta solução, no mínimo, por 1h e, no máximo, por 30 dias.

e) Tratamento alcalino e eletroforese

Após a lise celular, as lâminas foram lavadas com PBS gelado com auxílio de uma pipeta Pasteur e submetidas ao tratamento alcalino em solução tampão de pH 13 (300mM NaOH e 1mM EDTA), previamente refrigerada, por 30min, em banho de gelo. A eletroforese foi feita numa cuba horizontal disposta num banho de gelo, com voltagem constante (25Volts) e amperagem de 280-300mA, por 30min. Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespirilização dos sítios de rompimento da molécula de DNA (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

f) Neutralização

Após eletroforese, as lâminas foram lavadas três vezes com uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), por 5min cada, sendo em seguida secadas e posteriormente colocadas numa cuba com etanol absoluto por alguns segundos. Após secagem, as lâminas foram submetidas à coloração.

g) Coloração

As lâminas foram coradas com 30µl de uma solução aquosa de brometo de etídeo a 20µg/ml e cobertas com lamínulas. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

h) Análise dos cometas

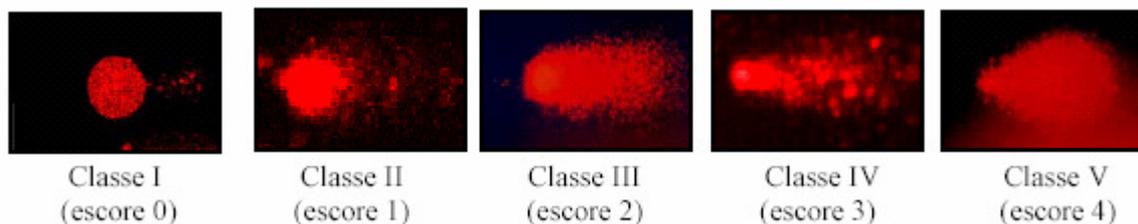
Após coradas, as lâminas foram avaliadas, imediatamente, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm, com aumento de 400X.

A análise dos cometas foi realizada visualmente, conforme classificação proposta por Kobayashi et al. (1995), seguindo algumas modificações introduzidas por Miyamae et al. (1998).

Através da análise microscópica, os cometas foram classificados em cinco categorias: **classe I**, sem cauda; **classe II**, cometas com pequenas caudas (comprimento da cauda menor que 25% do diâmetro da cabeça); **classe III**, cometas com caudas médias (comprimento da cauda entre 25 e 100% do diâmetro da cabeça); **classe IV**, cometas com caudas longas (comprimento da cauda maior do que o diâmetro da cabeça); e **classe V**, cometas mal definidos ou com cabeças pequenas (KOBAYASHI et al., 1995).

Cinqüenta células foram analisadas, ao acaso, na região central de cada lâmina e diferenciadas visualmente em cinco classes, utilizando-se um escore,

onde foram atribuídos valores 0, 1, 2, 3 e 4 para as classes I, II, III, IV e V, respectivamente, conforme Figura 3 (COLLINS et al., 1997; DA SILVA, 2000; SILVA et al., 2002). Os cometas localizados nas bordas do gel não foram quantificados a fim de evitar resultados falso-positivos.



Fonte: Savi (2004).

Figura 3 – Diferenciação das classes dos cometas em ensaios de genotoxicidade.

4.3 Toxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 *in vivo*

Com intuito de melhor investigar o indicativo de toxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresentado no ensaio do Cometa, optou-se pela realização de análises toxicológicas *in vivo*.

Todos os ensaios *in vivo*, utilizando ratos e camundongos, foram previamente submetidos à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP e UFSC, protocolos números 2374/2002/USP e 23080.0011700/2005-03/UFSC, respectivamente.

Esses ensaios foram realizados com intuito de detectar a toxicidade oral associada às toxinas microbianas ativas por via oral conhecidas até o momento, bem como investigar a toxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, quando administrado em doses menores por longo período de tempo, como ocorre geralmente com o consumo dos aditivos alimentares (PARIZA; FOSTER, 1983).

4.3.1 Análise toxicológica aguda em ratos

A análise toxicológica aguda do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 em ratos foi realizada no setor de Toxicologia do Laboratório de Tecnologia Ambiental Ltda (TECAM) de São Paulo, SP.

O presente estudo foi conduzido de acordo com os procedimentos descritos na OECD (1987).

a) Animais

Os animais foram aclimatados no biotério por 5 dias em condições de temperatura de $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de 30 a 70% e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro, recebendo dieta basal (ração Nuvilab CR1, São Paulo, SP) e água *ad libitum*. O alimento e água foram retirados 1h antes do início do ensaio. Durante esse período, as condições de saúde dos animais foram atentamente observadas e registradas (morte, coma, convulsão, prostração, ataxia, tremores, alteração na pele ou pêlo, alteração nas mucosas, diarreia e salivação). Antes da exposição à amostra, todos os animais foram pesados e identificados individualmente.

b) Preparação do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi mantido em geladeira e diluído momentos antes das administrações diárias. A amostra liofilizada utilizada no ensaio era constituída de $610,89\mu\text{g/ml}$ de proteínas.

c) Toxicidade aguda (DL_{50})

Um grupo de 10 ratos (5 machos e 5 fêmeas) foi tratado com o extrato bruto em água, por via oral (gavagem), com a dose de $2.000\mu\text{g/kg}$ (dose máxima recomendada). O protocolo internacional não preconiza a necessidade de um

grupo controle negativo paralelo ao grupo experimental em caso de utilização de veículo para o qual há controle histórico do laboratório.

A amostra foi solubilizada em água deionizada (998µg/ml) e administrada na dose de 0,2ml/100g de peso do animal. O volume de amostra administrado foi calculado de acordo com o peso corpóreo. Os animais receberam uma dose única, utilizando uma seringa descartável e tubo de silicone e foram observados por 14 dias quanto às condições de saúde (morte, coma, convulsão, prostração, ataxia, tremores, alteração na pele ou pêlo, alteração nas mucosas, diarreia e salivação). No final do experimento todos os animais foram pesados.

4.3.2 Análise toxicológica aguda em camundongos

A análise toxicológica aguda em camundongos do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada no Laboratório de Fisiologia do CFS do CCB da UFSC.

O presente estudo foi conduzido utilizando normas de Boas Práticas de Laboratório (OECD, 1998b) e de acordo com as metodologias descritas na Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001a; OECD, 2001b).

a) Animais

Os animais foram mantidos no Biotério de setorial do CFS do CCB da UFSC, em caixas plásticas (medindo 40x32x17cm) dentro de estufas ventiladas Alesco (Monte Mor, SP), com temperatura controlada ($22\pm 2^\circ\text{C}$) e ar filtrado, em ciclo claro/escuro de 12h, tratados com água e ração *ad libitum*. A ração Nuvilab CR-1 utilizada foi fornecida pela Nuvital Nutriente S.A., apresentando a seguinte composição básica: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos. Os animais foram aclimatizados no laboratório por um período de adaptação de pelo menos uma semana antes da realização dos experimentos, sendo que os mesmos foram realizados de acordo com orientações para os

cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para experimentação animal (COBEA, 1991). Os animais foram inicialmente identificados, individualmente, para permitir a avaliação comportamental e do peso corporal ao longo do estudo, bem como do peso dos órgãos ao final do experimento.

b) Preparação do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi mantido em geladeira e diluído momentos antes das administrações diárias. A solução estoque de extrato bruto utilizada no ensaio era constituída de 567,75µg de proteínas/ml.

c) Toxicidade aguda (DL₅₀)

O objetivo desse estudo foi investigar a possível toxicidade aguda (letalidade) do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado por via oral, numa única administração, nas doses de 5, 50, 500 e 5.000 µg/kg a 80 camundongos (40 machos e 40 fêmeas, contendo 10 animais por grupo), sendo 20 camundongos (10 machos e 10 fêmeas) para cada dose, mantidos em jejum por cerca de 4h. Outros 20 camundongos (10 machos e 10 fêmeas), pertencentes aos grupos controles, receberam veículo (salina, NaCl 0,9%, 10 ml/kg), pela mesma via, utilizado para diluir o extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. Foi avaliado o efeito do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre a letalidade nas primeiras 24h e durante os 14 dias após a administração do extrato, a fim de verificar possíveis alterações relacionadas ao curso do tratamento. Após a administração do extrato bruto ou do veículo, os animais foram agrupados e mantidos em caixas plásticas, por um período de 14 dias nas condições descritas acima, sendo que nas primeiras 4 horas subseqüentes os mesmos foram mantidos em jejum. Os parâmetros indicadores de toxicidade (Teste Hipocrático): resposta ao toque, aperto da cauda, reflexo córneoal, aumento da freqüência respiratória, taquicardia, contorção, tônus corporal, tremores, convulsões, sinal de straub, ptose, piloereção, força de

agarar e a eventual mortalidade foram observados às 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 24h após o tratamento dos animais.

No decorrer do experimento, foi investigada a possível influência da administração aguda do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre o consumo de comida, água e ganho de peso, bem como sobre alguns órgãos vitais. Para isto, os animais foram mantidos em caixas plásticas, sendo que no 1º, 4º, 7º, 9º, 11º e 14º dias após a administração do extrato bruto ou do veículo, o peso corporal, consumo de água e comida foram avaliados. No 14º dia de observação, os animais foram sacrificados, mediante anestesia através de éter, seguida por deslocamento cervical, e submetidos a uma laparotomia, que permitiu a observação macroscópica (aspecto geral do órgão, cor e peso) dos órgãos e/ou glândulas, tais como: coração, pulmão, fígado, rins, baço, estômago, testículos, ovário e tubas uterinas, glândula salivar, glândula adrenal, timo, linfonodo mesentérico e encéfalo.

4.3.3 Análise toxicológica de doses repetidas

A análise toxicológica de doses repetidas em camundongos do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada no Laboratório de Fisiologia do CFS do CCB da UFSC.

O presente estudo foi conduzido utilizando normas de Boas Práticas de Laboratório (OECD, 1998b) e de acordo com as metodologias descritas na Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998a).

a) Animais

Idem a análise toxicológica aguda em camundongos.

b) Preparação do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

Idem a análise toxicológica aguda em camundongos.

c) Toxicidade por doses repetidas

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade por doses repetidas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, através de gavagem, uma vez ao dia (entre 8 e 12h da manhã) por 90 dias consecutivos, nas doses de 50, 500 e 5.000µg/kg em 120 camundongos (60 machos e 60 fêmeas, contendo 20 animais por grupo). Outros 40 camundongos (20 machos e 20 fêmeas), animais controles, receberam apenas o veículo (salina, NaCl 0,9%), pela mesma via.

A diluição do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi realizada em solução NaCl 0,9% e o volume administrado foi de 10ml/kg, pela via oral. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e as gaiolas foram lavadas e trocadas três vezes por semana. Após a administração do extrato ou do seu veículo, os animais foram mantidos em caixas plásticas (medindo 40x32x17cm), durante todo o período de experimentação, sendo que diariamente foram observados alguns parâmetros indicadores de toxicidade: resposta ao toque, aperto da cauda, reflexo córneoal, aumento da frequência respiratória, taquicardia, contorção, tônus corporal, tremores, convulsões, sinal de straub, ptose, piloereção, força de agarrar e a eventual mortalidade dos animais.

Durante o estudo foi registrado o peso corporal, o consumo de ração e de água dos animais. Ao final dos 90 dias, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado para a determinação do hemograma completo e análise bioquímica do sangue. Alguns órgãos e/ou glândulas foram retirados para a verificação de alterações macroscópicas.

d) Influência do tratamento prolongado dos animais com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre a massa corporal, consumo de comida e água

No decorrer do experimento, foi também investigada a influência da administração de doses repetidas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre o consumo de comida, água e o ganho de peso dos

animais. Para isto, os animais foram mantidos em caixas plásticas, sendo semanalmente, após a administração diária do extrato ou do veículo, submetidos à pesagem (para verificação de ganho ou perda de massa corpórea). O consumo de comida e água foi medido duas vezes por semana.

e) Análise dos parâmetros hematológicos dos animais após o tratamento com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

Ao final do tratamento prolongado (90 dias) com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, o sangue dos animais foi retirado através da punção do globo ocular (plexo orbital), com o animal previamente anestesiado em éter, com o auxílio de uma pipeta Pasteur contendo EDTA (anticoagulante). A seguir, foi realizado o hemograma completo para verificar a possível influência do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre a atividade hematopoiética da medula óssea dos animais através dos seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito (através da utilização da centrífuga de microhematócrito), contagem de hemácias, leucócitos, plaquetas e determinação de hemoglobina (através do aparelho de hematologia, ADVIATM 60 – Bayer) e diferenciação das células sangüíneas (através da confecção de esfregaço sangüíneo (lâminas) e coloração pelo método de May Grünward-Giemsa).

f) Análise dos parâmetros bioquímicos dos animais após tratamento prolongado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

Vários parâmetros bioquímicos (enzimas e produtos provenientes do metabolismo orgânico) foram também avaliados com o objetivo de verificar possíveis efeitos tóxicos sobre órgãos alvos específicos. Para tal, o sangue coletado de cada animal contendo anticoagulante (EDTA) foi centrifugado (840xg, por 7min) e o plasma obtido foi congelado para posterior determinação dos seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, ácido úrico, albumina, proteínas totais e frações, bilirrubinas (total, direta e indireta), colesterol total e frações, triglicerídeos, creatinina, uréia, sódio, potássio, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase

(γ GT) através de metodologias específicas contidas nos kits fornecidos pela LabTest (Minas Gerais, Brasil), também utilizadas por Eno; Konya e Ibu (1998).

g) Análise anátomo-patológica (autópsia) dos animais após o tratamento prolongado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

Após a coleta de sangue para análise dos parâmetros bioquímicos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e submetidos à laparotomia, que permitiu a observação macroscópica (autópsia) de alguns órgãos, tais como: coração, pulmão, fígado, rins, baço, estômago, testículos, ovário e tubas uterinas, glândula salivar, glândula adrenal, timo, linfonodo mesentérico e encéfalo.

4.4 Análise estatística

a) Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato bruto utilizando diferentes indicadores

Os valores obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana foram submetidos à análise de regressão não linear e análise de variância (WINER, 1971) utilizando o programa SAS[®], versão 6.12 (Copyright[®] 1989-1996, SAS Institute Inc, Cary, NC 27513, USA). O gráfico foi plotado utilizando o programa Microsoft[®] Excel 2000, versão 9.0.2812. O teste de separação de médias utilizado foi o teste F ao nível de significância de 5%. Os dados de todas as investigações tratados, estatisticamente, foram obtidos de três ensaios independentes, cada um em triplicata. Os resultados de avaliação da atividade antifúngica não foram submetidos à análise estatística, haja vista que essa não foi detectada em nenhuma das concentrações testadas, tanto com o extrato bruto quanto com a nisina.

b) Genotoxicidade

Os resultados da avaliação da genotoxicidade através do Ensaio Cometa foram submetidos ao teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de significância de 5%. Os dados foram obtidos de três ensaios

independentes, cada um em duplicata. Os valores referentes às repetições foram obtidos mediante somatório dos resultados experimentais, para as diferentes classes de cometas.

c) Análise toxicológica aguda em ratos

Os valores obtidos no ensaio foram submetidos ao teste t ao nível de significância de 5%.

d) Análise toxicológica aguda e de doses repetidas em camundongos

Os resultados estão apresentados como a média \pm erro padrão da média ou como a média seguida do intervalo de confiança a 95%. A DL_{50} foi estimada utilizando o método de regressão linear através do programa "Graph Pad Prism". A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste SNK, quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dosagem de proteínas do extrato bruto

O *pool* de extratos brutos de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 obtido em tampão (1l) apresentou 246,15 μ g de proteínas/ml e o *pool* de extratos brutos obtido em água (3l) apresentou 283,88 μ g de proteínas/ml.

5.2 Atividade antibacteriana

Para calcular a concentração de proteína do extrato bruto responsável por 50% (X_{50}) da máxima atividade antibacteriana, utilizou-se como referência a melhor equação da reta para o fenômeno observado. Os resultados observados para o extrato bruto e nisina são os dados constatados no laboratório e os estimados são os calculados com a equação da reta.

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 somente apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630 (Figura 4). O extrato bruto quando inoculado em placas de TSA-YE, previamente inoculadas com *Listeria monocytogenes*, apresentou um halo de inibição de 1,3 e 8,3mm numa concentração de 5 e 80 μ g de proteínas, respectivamente. Em contrapartida, a nisina não apresentou halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas.



Figura 4 – Atividade antibacteriana do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, em diferentes concentrações (μg de proteínas), frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630 previamente inoculada em placa de TSA-YE e incubada a 35°C por 24h. SI – sem inoculação.

Os resultados para o extrato bruto inoculado em profundidade de placas de TSA-YE, foram ajustados pela seguinte equação: $Y_i = 18,77X_i / (108,24 + X_i)$, com um $R^2 = 0,94$. Portanto, se considerarmos que o halo de inibição na concentração de $80\mu\text{g}$ de proteínas corresponde a atividade máxima, com uma concentração de $X_{50} = 29,22\mu\text{g}$ do extrato bruto, obtivemos uma atividade antibacteriana de 50% com um halo de inibição de aproximadamente 4mm. Todos os resultados de atividade antibacteriana em profundidade para o extrato bruto e nisina em placas de TSA-YE, previamente inoculadas com *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, podem ser observados no Gráfico 1.

Analisando os resultados de atividade antibacteriana, podemos constatar que o extrato bruto, quando inoculado em profundidade em placas de TSA-YE, apresentou inibição em todas as concentrações testadas; ao contrário da nisina. Logo, o extrato bruto é mais potente do que a nisina nas concentrações testadas, e pode ser considerado um potencial candidato a bioconservador de alimentos.

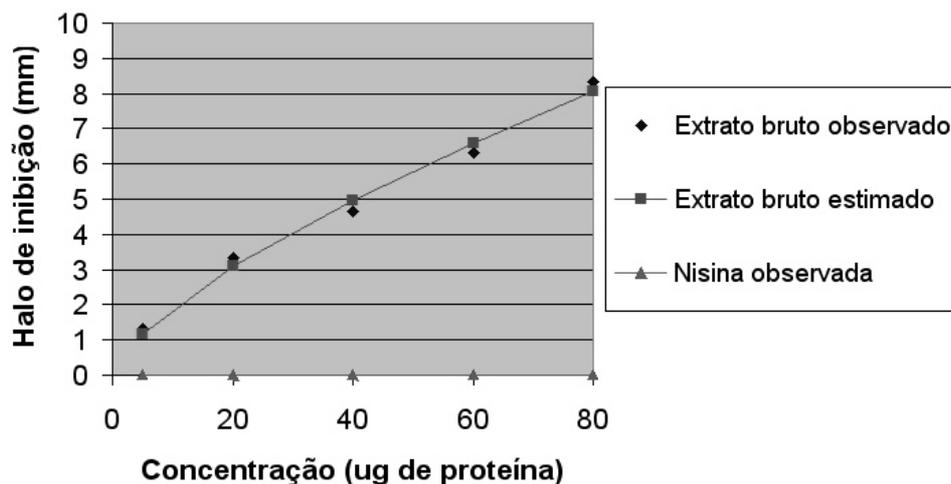


Gráfico 1 – Atividade antibacteriana do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 e nisina comercial (Nisaplin[®]) em placas de TSA-YE incubadas a 35°C por 24h, utilizando *Listeria monocytogenes* NCTC 098630 como microrganismo indicador.

Apesar da nisina não ter sido ativa frente *Listeria monocytogenes* nesse estudo, deve-se levar em consideração que essa foi diluída em tampão fosfato, o que pode ter influenciado na atividade antibacteriana. Isso é um indicativo de que seja necessária maior concentração de nisina diluída em tampão fosfato para talvez compensar o efeito sinérgico que essa apresenta quando aplicada com solução de ácido fosfórico para inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

As bacteriocinas são comumente vistas como única solução para garantir a segurança microbiológica dos alimentos, quando deveriam representar uma excelente alternativa para uso em combinação com outros métodos de barreira para proteger os consumidores de doenças transmitidas por alimentos. Logo, o extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 poderia ser submetido a ensaios de atividade antimicrobiana em associação com agentes quelantes como o EDTA, os quais agem quelando os íons Mg^{2+} da membrana externa das bactérias Gram-negativas, tornando esses microrganismos mais sensíveis à ação da bacteriocina. Além disso, esse extrato pode ser adicionado a alimentos submetidos a outros métodos de conservação, como aumento da pressão hidrostática, luz pulsada, combinação com citrato de sódio, lactato e diacetato de sódio e incorporados a

embalagens que visam aumentar a vida-de-prateleira dos alimentos. Exemplos de sucesso utilizando a associação de métodos de conservação são a eliminação completa de cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* O157:H7 em queijos pelo efeito sinérgico da nisina A, bacteriocina TAB 57 e enterocina ou bacteriocina AS-48, com elevada pressão hidrostática (DIELBANDHOESING et al., 1998; DEEGAN et al., 2006).

A atividade antimicrobiana de uma bacteriocina depende da concentração, composição e potencial da membrana citoplasmática da célula-alvo, nível de expressão das proteínas de imunidade e da composição química do ambiente onde se encontra ou do meio de cultura utilizado para sua produção. Pesquisas recentes demonstram uma forte correlação entre as pontes dissulfeto presentes nas moléculas das bacteriocinas da classe II e seu espectro de atividade (RICHARD et al., 2006).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, classificadas como não lantibióticas (classes II e III), incluem tanto as bacteriocinas de alto como as de baixo peso molecular. As pertencentes à subclasse IIa apresentam atividade antibacteriana frente *Listeria* (anti-listerial) e as da classe IIb são as que necessitam de dois peptídeos para a atividade antibacteriana (GARNEAU; MARTIN; VEDERAS, 2002; DRIDER et al., 2006; RICHARD et al., 2006).

A(s) substância(s) antibacteriana(s) presente(s) no extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, provavelmente pertence(m) a subclasse IIa das bacteriocinas não lantibióticas, haja vista que foi ativa apenas frente *Listeria monocytogenes*.

Para a confirmação dessa hipótese, estudos futuros de caracterização e do mecanismo de ação da(s) substância(s) antibacteriana(s) presente(s) no extrato bruto serão de vital importância para sua classificação definitiva.

5.3 Atividade antifúngica

Nem o extrato bruto nem a nisina apresentaram halos de inibição frente a fungos em nenhuma das concentrações testadas pela técnica de difusão em poços.

A deterioração de alimentos por fungos causa significativas perdas econômicas, além de constituir um perigo à saúde dos consumidores, com a produção de esporos alergênicos e possibilidade de formação de micotoxinas. Nesse contexto, vários bioconservadores e biocontroladores têm sido estudados para inibir o crescimento desses microrganismos nos alimentos (MAGNUSSON et al., 2003).

Segundo Paster et al. (1999), a nisina é freqüentemente aplicada em alimentos para prevenir a deterioração induzida por bactérias e não por bolores, porém na presença de pequenas concentrações de ácido propiônico essa bacteriocina também pode prevenir a deterioração por bolores, ou seja, a nisina apresenta efeito sinérgico com o ácido propiônico. Nesse estudo constatou-se que o crescimento de *Aspergillus ochraceus* foi completamente inibido no meio contendo ácido propiônico e nisina nas concentrações de 0,05% de ácido propiônico com 1.000ppm de nisina e 0,1% de ácido propiônico com 500 ou 1.000ppm de nisina. O crescimento de *Fusarium moniliformes* e *Aspergillus parasiticus*, bem como a germinação dos esporos de *Aspergillus parasiticus* foram completamente inibidos com 0,1% de ácido propiônico e 1.000ppm de nisina. Já os esporos de *Fusarium moniliformes* não germinaram no meio contendo 0,05% de ácido propiônico com 500 ou 1.000ppm de nisina. Adicionalmente, observou-se que a germinação dos esporos de *Aspergillus ochraceus* foi completamente inibida no meio contendo 0,1% de ácido propiônico com 500 ou 1.000ppm de nisina.

Segundo Dielbandhosing et al. (1998), a parede celular das leveduras, constituída principalmente de quitina, glucanos e proteínas, forma uma barreira para várias moléculas proteináceas e não proteináceas, incluindo a nisina. A variação da sensibilidade à nisina varia de acordo com o estágio do ciclo celular

das leveduras, sendo essas mais sensíveis à nisina na fase S. Em contrapartida, na fase G2, constatou-se maior resistência das células à nisina. Essa resistência a nisina parece estar relacionada à expressão de determinadas proteínas da parede celular (mannoproteínas) durante os estágios do ciclo celular das leveduras.

A atividade fungicida e hemolítica dos peptídeos antimicrobianos catiônicos é fortemente dependente da força iônica dos tampões utilizados nos ensaios de citotoxicidade. Helmerhorst et al. (1999) constataram forte atividade fungicida e hemolítica de peptídeos antimicrobianos catiônicos (histatinas e magainas) em tampão fosfato de potássio 1mM, suplementados com glicose 287mM. Porém, esses mesmos peptídeos apresentaram-se inativos contra eritrócitos humanos e células de *Candida albicans* em tampão PBS, o que comprova a influência da força iônica dos tampões utilizados nos ensaios de atividade fungicida e hemolítica.

Enzimas que degradam a parede celular, tais como β -1,3 glucanases, proteases e quitinases são envolvidas na atividade antagonista de alguns agentes de controle biológico contra fungos fitopatogênicos. Nos últimos anos têm-se observado várias correlações entre antagonismos fúngicos e a produção de quitinases e/ou β -1,3 glucanases; haja vista que a quitina e os β -1,3 glucanos são os principais constituintes da parede celular dos fungos (KIM; CHUNG, 2004).

Sant-Lang et al. (2002) investigaram a atividade antifúngica do extrato bruto do *Bacillus subtilis* W113 e *Bacillus subtilis* W118 em tampão fosfato de sódio frente *Fusarium oxysporum*. A cultura foi obtida em meio base contendo quitina pré-tratada de resíduos de animais marinhos, nas concentrações de 0, 0,75, 1,75 e 3%. A atividade antifúngica máxima foi obtida no meio contendo 1,75 e 0,75% de quitina para *Bacillus subtilis* W113 e *Bacillus subtilis* W118, respectivamente. Os pesquisadores demonstraram, assim, que a quitina é um elemento essencial para indução de atividade antifúngica, sugerindo que o composto em questão trata-se de uma quitinase.

5.4 Genotoxicidade

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não foi genotóxico para células VERO na concentração de 60µg/ml, haja vista que não se diferenciou, estatisticamente, do controle negativo. As demais concentrações testadas, 80 e 100 µg/ml, foram genotóxicas para células VERO (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 utilizando-se células VERO

Concentração	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média	Desvio-padrão	Tratamento estatístico
100µg/ml	215	162	144	173,67	36,91	a
80 µg/ml	120	126	89	111,67	19,86	b
60µg/ml	81	46	38	55,00	22,87	c
C (+) H ₂ O ₂ 100 µM	160	147	174	160,33	13,50	a
C (+) H ₂ O ₂ 200 µM	197	151	189	179,00	24,58	a
C (-)	34	34	37	35,00	1,73	c

Os valores referentes às repetições foram obtidos mediante somatório dos resultados experimentais, para as diferentes classes de Cometa, seguindo-se as classificações de Silva et al., 2002. C(+) Controle positivo; C(-) Controle negativo. Letras diferentes significam que houve diferença significativa entre os grupos; teste SNK.

Analisando-se a Tabela 1, constata-se que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 na concentração de 100µg/ml foi altamente genotóxico para células VERO, pois não se diferenciou, estatisticamente, dos controles positivos. Já na concentração de 80µg/ml apresentou uma genotoxicidade intermediária, pois se constatou uma diferença estatística significativa, tanto em relação ao controle negativo, quanto em relação aos controles positivos.

Cabe ressaltar, que mesmo em função da ausência de genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano na concentração de 60µg/ml, não devemos descartar o indicativo de genotoxicidade apresentado nas demais concentrações testadas.

Assim, esses resultados foram importantes para justificar a realização dos estudos toxicológicos *in vivo* do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10.

Poucos estudos de genotoxicidade *in vitro* têm sido realizados com bacteriocinas para uso em alimentos. Esses ensaios conseguem detectar a maioria das substâncias ou seus metabólitos genotóxicos, porém os resultados positivos precisam ser confirmados com ensaios de toxicidade *in vivo* (BARLOW et al., 2002).

Tanto os ensaios de genotoxicidade quanto os de toxicidade de dose repetida são fundamentais para avaliação da segurança dos aditivos alimentares, sendo importantes na predição de toxicidade e identificação dos alvos de toxicidade. Em alguns casos, quando constatada toxicidade em tecidos ou órgãos-alvos, torna-se necessária à realização de ensaios complementares para investigação definitiva da segurança desses compostos (BARLOW et al., 2002).

Levando-se em consideração a crescente resistência ao uso de nisina e outras bacteriocinas em alimentos por certos países, principalmente da União Européia, deve-se considerar a necessidade de estudos sistemáticos de mutagenicidade, teratogenicidade, de efeitos alérgicos, genotoxicidade, bem como de ação dessas substâncias na microbiota intestinal, haja vista a possibilidade de resistência cruzada desses antimicrobianos com os antibióticos utilizados rotineiramente no combate a infecções (WESSELS; JELLE; NES, 1998).

Recentemente, SASAKI et al. (2002) investigaram a genotoxicidade *in vivo* de 39 aditivos alimentares em uso, pertencentes a seis categorias: (1) corantes, (2) fixadores de cor, (3) conservantes, (4) antioxidantes, (5) fungicidas e (6) adoçantes. No estudo foram testados grupos de quatro camundongos machos tratados por via oral com cada aditivo na dose de até $0,5 \times DL_{50}$ ou dose limite (2.000mg/kg). Os animais foram sacrificados 3 e 24h após o tratamento e suas vísceras (estômago, cólon, fígado, rins, bexiga, pulmão, cérebro e medula óssea) submetidas ao ensaio do Cometa. De todos os aditivos, os corantes foram os

mais genotóxicos, induzindo danos no DNA do estômago, cólon e/ou bexiga. Todos os corantes induziram danos no DNA dos órgãos gastrintestinais nas doses mais baixas testadas (10 ou 100mg/kg). Dois antioxidantes, três fungicidas e quatro adoçantes também induziram danos no DNA dos órgãos gastrintestinais. Os autores acreditam que são necessárias avaliações de genotoxicidade *in vivo* em larga escala para os aditivos alimentares, em função do elevado número de pessoas expostas diariamente aos mesmos.

A genotoxicidade *in vivo* nem sempre resulta em carcinogenicidade, haja vista que esse ensaio detecta o dano no DNA após administração de dose única relativamente alta, enquanto carcinogenicidade é detectada após longo tratamento com doses relativamente menores. O desenvolvimento de tumores em órgãos-alvos não depende somente do nível inicial de dano induzido no DNA ou do seu reparo, mas também de outros fatores, como a produção de metabólitos reativos, sua distribuição e seus efeitos na proliferação celular (SASAKI et al., 2002).

5.5 Análise toxicológica aguda em ratos

a) Toxicidade aguda (DL₅₀)

Não foi observado mortalidade ou sinais de intoxicação entre os 10 ratos durante os 14 dias de teste. Todos os animais apresentaram aumento de peso durante o período do teste. A variação de peso observada entre os machos foi superior à observada entre as fêmeas. Os pesos iniciais e finais dos dez animais (5 machos e 5 fêmeas) tratados com 2.000µg/kg de extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, a variação de peso obtida após 14 dias de observação e os resultados referentes aos sinais clínicos de intoxicação dos animais no período do teste são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Variação do peso dos ratos tratados com 2.000µg/kg do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, por via oral, durante 14 dias

Animais*	PI (g)	PF (g)	PF-PI (g)	Sintomas
1	332	373	+41	NA
2	311	350	+39	NA
3	380	436	+56	NA
4	310	355	+45	NA
5	340	382	+42	NA
Média	335	379	+44	-
6	230	248	+18	NA
7	209	235	+26	NA
8	202	217	+15	NA
9	206	227	+21	NA
10	218	238	+20	NA
Média	213	233	+20	-

*1 a 5: Machos; 6-10: fêmeas. PI- peso inicial (dia 0); PF- peso final (dia 14). NA- nenhuma alteração. Sintomas avaliados: morte, coma, convulsões, prostração, ataxia, tremores, alteração na pele ou pêlo, alteração nas mucosas, diarreia e salivação.

De acordo com o protocolo internacional (OECD, 1987), no caso de não ocorrência de mortalidade na dose máxima recomendada e se as condições de teste respeitarem os procedimentos descritos no protocolo, a toxicidade aguda oral da amostra, nas condições de teste e em termos de dose nominal, pode ser considerada superior a 2.000µg/kg ($DL_{50} > 2.000\mu\text{g/kg}$).

Durante o teste, a temperatura no biotério variou de 21,1 a 23,0°C e a umidade foi de 72%.

Harbak e Thygesen (2002) investigaram a segurança da xilanase produzida por *Bacillus subtilis* utilizando ensaios de toxicidade oral aguda e subcrônica em ratos, ensaio de Ames e de aberração cromossômica *in vitro*. Os pesquisadores não detectaram toxicidade em nenhum dos ensaios, afirmando que o microrganismo utilizado para produção da enzima é seguro para uso em panificação. Adicionalmente, relataram que o uso de preparações enzimáticas derivadas de *Bacillus* em alimentos é seguro, quando obedecidas às boas práticas de fabricação.

5.6 Análise toxicológica aguda em camundongos

a) Toxicidade aguda (DL₅₀)

Os resultados obtidos indicam que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5–5.000µg/kg) administrado agudamente pela via oral, tanto para camundongos machos quanto para fêmeas, não causou letalidade dos animais até a dose de 5.000µg/kg. Assim, a DL₅₀ foi superior a 5.000µg/kg para camundongos machos ou fêmeas. Além disso, o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5–5.000µg/kg) não produziu letalidade adicional dos animais durante todo o período de observação. Pode ser observado, também, que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5–5.000µg/kg), administrado agudamente pela via oral, tanto para camundongos machos quanto para fêmeas, produziu piloereção e alteração da sensibilidade ao aperto da cauda, principalmente em doses mais elevadas (500-5.000µg/kg). As alterações foram observadas somente durante as 24h após a administração do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. No entanto, o mesmo tratamento dos animais com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não foi capaz de produzir outras alterações comportamentais significativas sugestivas de toxicidade aguda (tais como: contorções abdominais, tremores, convulsões, aumento da frequência cardíaca e respiratória, sinal de straub, ptose, entre outros), quando comparado com os animais controles, tratados com salina (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 observado 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24h após sua administração pela via oral, sobre alguns parâmetros comportamentais indicativos de toxicidade aguda em camundongos machos

(continua)

Parâmetros avaliados	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$, v.o.)	0,25h	0,5h	1h	2h	4h	8h	24h
Resposta ao toque	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	9/1
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
Aperto da cauda	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	9/1	9/1	10/0	10/0	8/2
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	10/0	9/1	4/6	10/0	5/5	10/0
	5.000	8/2	9/1	7/3	7/3	10/0	9/1	10/0
Reflexo córneoal	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
Aumento da frequência respiratória	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/9
	5	0/10	0/10	1/9	0/10	0/10	0/10	2/8
	50	0/10	0/10	1/9	1/9	1/9	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	1/9	0/10	0/10
Aumento da frequência cardíaca	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/9
	5	0/10	0/10	1/9	0/10	0/10	0/10	2/8
	50	0/10	0/10	1/9	3/7	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Contorção	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Tônus corporal	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
Tremores	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Os valores foram expressos pelo número de animais que apresentaram as alterações comportamentais observadas em relação ao número total de animais. v.o.– via oral.

Tabela 3 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 observado 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24h após sua administração pela via oral, sobre alguns parâmetros comportamentais indicativos de toxicidade aguda em camundongos machos

(conclusão)

Parâmetros avaliados	Dose (µg/kg, v.o.)	0,25h	0,5h	1h	2h	4h	8h	24h
Convulsões	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Sinal de straub	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	3/7	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Ptose (lacrimação)	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Piloereção	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	7/3	1/9
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	4/6	2/8
	50	0/10	0/10	0/10	6/4	5/5	2/8	3/7
	500	5/5	4/6	6/4	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	10/0	5/5	5/5	4/6	4/6	4/6	1/9
Força de agarrar	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	8/2	10/0	10/0	9/1	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	7/3	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	9/1	9/1	7/3	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0

Os valores foram expressos pelo número de animais que apresentaram as alterações comportamentais observadas em relação ao número total de animais. v.o.– via oral.

Tabela 4 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 observado 0,25, 0,5, 1, 2, 4 , 8 e 24h após sua administração pela via oral, sobre alguns parâmetros comportamentais indicativos de toxicidade aguda em camundongos fêmeas

(continua)

Parâmetros avaliados	Dose (µg/kg, v.o.)	0,25h	0,5h	1h	2h	4h	8h	24h
Resposta ao toque	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	10/0	9/1	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
Aperto da cauda	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	8/2	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	7/3	10/0	10/0	10/0	10/0
Reflexo córneoal	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
Aumento da freqüência respiratória	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	2/8	0/10	0/10	0/10	0/10
Aumento da freqüência cardíaca	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	2/8	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	2/8	0/10	0/10
Contorção	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Tônus corporal	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
Tremores	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Os valores foram expressos pelo número de animais que apresentaram as alterações comportamentais observadas em relação ao número total de animais. v.o.– via oral.

Tabela 4 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 observado 0,25, 0,5, 1, 2, 4 , 8 e 24h após sua administração pela via oral, sobre alguns parâmetros comportamentais indicativos de toxicidade aguda em camundongos fêmeas

(conclusão)

Parâmetros avaliados	Dose (µg/kg, v.o.)	0,25h	0,5h	1h	2h	4h	8h	24h
Convulsões	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Sinal de straub	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	7/3	9/1	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10
Ptose (lacrimação)	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Piloereção	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/8	0/10
	50	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	0/10	0/10	0/10	1/9	10/0	0/10	0/10
	5.000	0/10	0/10	2/8	0/10	8/2	1/9	0/10
Força de agarrar	0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	50	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	500	9/1	9/1	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	5.000	10/0	10/0	9/1	8/2	10/0	10/0	10/0

Os valores foram expressos pelo número de animais que apresentaram as alterações comportamentais observadas em relação ao número total de animais. v.o.– via oral.

b) Toxicidade aguda após tratamento por via oral

O tratamento de camundongos com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5 – 5.000 µg/kg), administrado agudamente por via oral, tanto para camundongos machos quanto para fêmeas, não alterou de forma significativa o peso corporal relativo dos animais (com exceção das fêmeas na dose de 50 µg/kg que aumentou), nem tampouco o consumo de água e de comida (Tabelas 5 e 6).

Os dados apresentados na Figura 5 mostram que o tratamento dos camundongos machos com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5 – 5.000 mg/kg), administrado agudamente pela via oral não alterou, de forma significativa, o peso corporal absoluto dos animais, ao longo de todo o período analisado, em relação ao controle. Contudo, o mesmo tratamento dos camundongos fêmeas, alterou de forma significativa o peso corporal absoluto dos animais, somente na dose de 500 µg/kg e nos 1º, 4º, 11º e 14º dias de observação em relação ao controle. No entanto, é importante mencionar, que esta redução é devido à diferença de peso dos animais no início do tratamento e não em função do tratamento específico (Figura 5).

Tabela 5 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre a variação da massa corporal de camundongos analisados do 1º ao 14º dia após o tratamento

Grupo (µg/kg, v.o.)	Sexo	1ª dia Peso dos animais (g)	4ª dia Peso dos animais (g)	7ª dia Peso dos animais (g)	9ª dia Peso dos animais (g)	11ª dia Peso dos animais (g)	14ª dia Peso dos animais (g)	Diferença Final Peso dos animais (g)
0	Macho	2,6 ± 0,27	-0,2 ± 0,42	0,5 ± 0,31	-0,7 ± 0,33	1,0 ± 0,70	0,6 ± 0,16	3,8 ± 0,58
5	Macho	3,6 ± 0,65	-0,6 ± 0,70	0,8 ± 0,29	-0,2 ± 0,49	1,1 ± 0,82	-0,2 ± 0,41	5,5 ± 1,23
50	Macho	3,5 ± 0,50	0,8 ± 0,33	0,3 ± 0,21	0,8 ± 0,80	-0,4 ± 0,22	0,4 ± 0,16	4,6 ± 0,52
500	Macho	1,5 ± 0,73	1,1 ± 0,94	0,1 ± 0,10	0,8 ± 0,20	0,5 ± 0,37	0,4 ± 0,30	4,4 ± 0,84
5.000	Macho	3,3 ± 0,21	-0,7 ± 0,33	1,4 ± 0,60	-0,5 ± 0,80	0,7 ± 0,39	0,4 ± 0,22	4,6 ± 0,72
0	Fêmea	2,0 ± 0,47	0,6 ± 0,50	0,3 ± 0,36	0,1 ± 0,55	0,3 ± 0,33	0,5 ± 0,30	3,8 ± 1,30
5	Fêmea	2,0 ± 0,44	0,0 ± 1,01	0,5 ± 0,30	1,4 ± 1,72	-1,9 ± 1,49	0,7 ± 0,26	2,7 ± 1,00
50	Fêmea	3,6 ± 1,04	0,7 ± 0,26	0,3 ± 0,33	0,7 ± 0,21	0,2 ± 1,04	0,7 ± 0,26	6,2 ± 0,87***
500	Fêmea	-1,5 ± 0,93**	0,1 ± 0,23	1,7 ± 0,26*	-4,0 ± 0,76**	2,9 ± 0,74	0,4 ± 0,22	1,6 ± 1,00
5.000	Fêmea	1,9 ± 0,38	-0,7 ± 0,47	-0,3 ± 0,26	1,3 ± 0,55	1,5 ± 0,6	0,5 ± 0,30	4,2 ± 0,36

Os valores representam a média de 10 animais ± o erro padrão da média. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da variação do peso dos animais (em gramas, g) nos respectivos dias (1º, 4º, 7º, 9º, 11º e 14º) ao longo do tratamento.

A diferença final representa a diferença de massa corpórea obtida da variação média do peso dos animais no 14ª dia com a variação média do peso dos animais no 1ª dia.

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001; teste SNK.

Tabela 6 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre a variação do consumo médio de ração e água de camundongos no final do tratamento

Grupo ($\mu\text{g/kg}$, v.o.)	Sexo	Ração (g)	Água (ml)
0	Macho	$6,59 \pm 0,29$	$6,39 \pm 1,05$
5	Macho	$7,16 \pm 0,29$	$7,01 \pm 0,83$
50	Macho	$6,18 \pm 0,23$	$6,65 \pm 0,64$
500	Macho	$6,75 \pm 1,67$	$5,21 \pm 1,05$
5.000	Macho	$6,10 \pm 0,22$	$5,26 \pm 0,51$
0	Fêmea	$5,43 \pm 0,32$	$6,53 \pm 0,92$
5	Fêmea	$5,54 \pm 0,24$	$5,87 \pm 0,39$
50	Fêmea	$5,05 \pm 0,38$	$5,11 \pm 0,21$
500	Fêmea	$5,27 \pm 0,42$	$7,61 \pm 1,34$
5.000	Fêmea	$4,84 \pm 0,26$	$4,88 \pm 0,15$

Os valores representam a média da variação da ingestão sólida (g/animal/dia) e líquida (ml/animal/dia) de 10 animais \pm o erro padrão da média. v.o.– via oral.

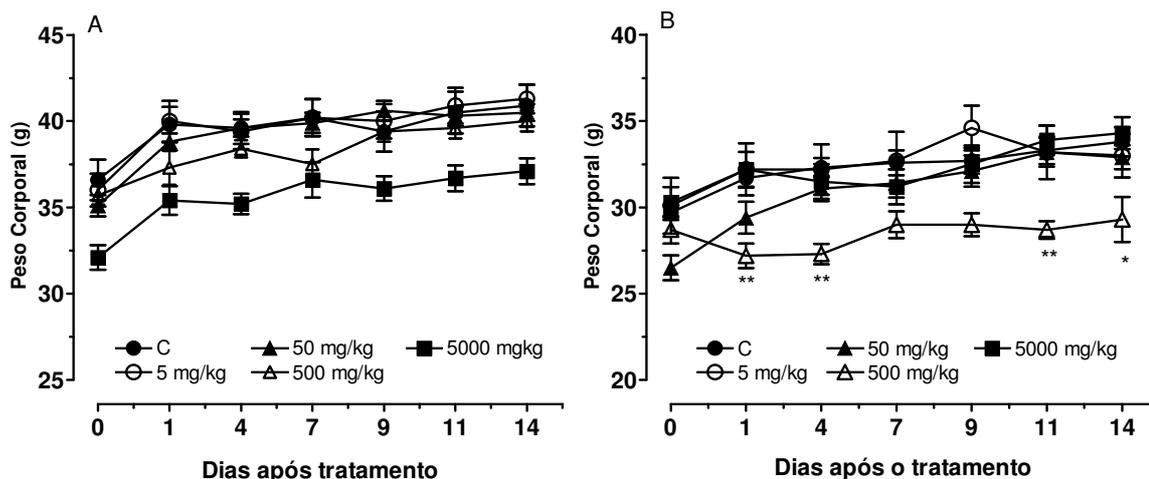


Figura 5 - Efeito do tratamento agudo (14 dias) realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5 - 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ou veículo, administrado pela via oral, numa única administração, sobre o peso corporal absoluto de camundongos machos (A) e fêmeas (B). Cada ponto representa a média de 10 animais e as linhas verticais representam o erro padrão da média. Difere significativamente do grupo controle (veículo, C): * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; teste SNK.

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não causou alteração macroscópica importante quanto ao aspecto e a cor de alguns órgãos e/ou glândulas analisados (coração, pulmão, fígado, rins, baço, estômago, testículos, ovário e tubas uterinas, glândula salivar, glândula adrenal, timo, linfonodo mesentérico e encéfalo), quando comparado com o grupo controle e avaliado no 14º dia após sua administração. Além disso, o tratamento dos camundongos machos com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5 – 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), administrado agudamente pela via oral, não causou alteração de forma significativa tanto do peso relativo quanto do peso absoluto do coração, testículos, fígado, linfonodo mesentérico, rins, baço, estômago, glândula salivar, glândula adrenal, timo e encéfalo, quando comparado com o grupo controle e avaliado no 14º dia após sua administração, com exceção do pulmão, onde causou um aumento significativo no peso absoluto na dose de 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabelas 7, 8, 9 e 10). No entanto, os camundongos fêmeas tratados

Tabela 7 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso relativo do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículos e glândula salivar de camundongos machos

Estrutura	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 ($\mu\text{g}/\text{kg}$, v.o.)				
	0	5	50	500	5.000
Baço	0,35 (0,29 – 0,40)	0,39 (0,31 – 0,48)	0,36 (0,30 – 0,42)	0,34 (0,29 – 0,40)	0,37 (0,32 – 0,41)
Rins	0,68 (0,64 – 0,71)	0,67 (0,61 – 0,72)	0,73 (0,60 – 0,85)	0,66 (0,60 – 0,74)	0,67 (0,63 – 0,71)
Coração	0,46 (0,43 – 0,50)	0,50 (0,44 – 0,56)	0,47 (0,40 – 0,53)	0,44 (0,41 – 0,46)	0,46 (0,40 – 0,52)
Pulmão	0,64 (0,59 – 0,69)	0,68 (0,60 – 0,75)	0,65 (0,54 – 0,76)	0,78 (0,69 – 0,88)	0,94 (0,80 – 0,11)
Fígado	4,6 (4,3 – 4,9)	4,3 (3,5 – 5,2)	4,5 (4,3 – 4,7)	4,3 (3,8 – 4,7)	4,6 (4,4 – 4,8)
Linfonodo mesentérico	0,06 (0,04 – 0,08)	0,04 (0,02 – 0,06)	0,02 (0,004 – 0,03)	0,05 (0,02 – 0,08)	0,04 (0,03 – 0,05)
Glândula adrenal	0,013 (0,009 – 0,017)	0,011 (0,007 – 0,016)	0,011 (0,005 – 0,016)	0,010 (0,006 – 0,013)	0,008 (0,005 – 0,003)
Timo	0,11 (0,08 – 0,14)	0,09 (0,05 – 0,13)	0,10 (0,04 – 0,15)	0,11 (0,08 – 0,14)	0,09 (0,04 – 0,14)
Estômago	0,69 (0,64 – 0,74)	0,75 (0,65 – 0,85)	0,70 (0,58 – 0,83)	0,71 (0,61 – 0,81)	0,70 (0,62 – 0,78)
Encéfalo	1,16 (1,10 – 1,22)	1,17 (1,07 – 1,27)	1,14 (1,07 – 1,22)	1,08 (0,92 – 1,23)	1,24 (1,15 – 1,34)
Testículos	0,18 (0,14 – 0,22)	0,11 (0,06 – 0,16)	0,14 (0,09 – 0,18)	0,16 (0,11 – 0,20)	0,16 (0,13 – 0,10)
Glândula salivar	0,29 (0,20 – 0,38)	0,31 (0,22 – 0,40)	0,39 (0,18 – 0,60)	0,28 (0,23 – 0,33)	0,25 (0,18 – 0,33)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 10 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. Os valores foram obtidos através da relação (em porcentagem) do peso dos órgãos pela massa corpórea dos animais (através da seguinte fórmula: peso do órgão/peso do animal x 100). v.o.– via oral. Teste SNK.

Tabela 8 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso absoluto do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículos e glândula salivar de camundongos machos

Estrutura	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 (µg/kg, v.o.)				
	0	5	50	500	5.000
Baço	137,20 (113,70 – 160,80)	157,20 (132,50 – 181,90)	151,40 (124,60 – 178,20)	136,80 (118,60 – 154,90)	136,10 (118,40 – 153,70)
Rins	268,80 (242,20–295,40)	273,20 (250,80–295,50)	272,40 (238,60–306,30)	263,90 (244,60–283,30)	249,20 (231,70–266,60)
Coração	185,20 (163,70 – 206,70)	202,30 (183,30 – 221,30)	192,00 (162,50 – 221,50)	175,10 (161,50 – 188,60)	169,20 (146,20 -192,20)
Pulmão	253,00 (231,80 – 274,20)	284,80 (253,40 – 316,20)	271,20 (221,90 – 320,60)	309,90 (281,60 – 338,20)	350,00** (298,80 – 403,20)
Fígado	1.840,00 (1656,00 – 2024,00)	1671,00 (1364,00 – 1978,00)	1875,00 (1729,00 – 2020,00)	1696,00 (1537,00 -1854,00)	1714,00 (1567,00 – 1861,00)
Linfonodo mesentérico	25,20 (17,62 – 32,90)	17,72 (9,94 – 25,50)	12,93 (6,04 – 19,82)	17,50 (5,34 – 29,65)	14,08 (9,51 – 18,65)
Glândula adrenal	4,97 (3,43 – 6,50)	7,30 (2,57 – 12,02)	4,92 (2,69 – 7,15)	4,06 (2,50 – 5,61)	6,57 (2,41 – 10,73)
Timo	45,14 (34,51 – 55,77)	38,96 (23,60 – 54,32)	34,94 (23,46 – 46,42)	45,53 (31,71 – 59,15)	61,36 (33,32 – 89,41)
Estômago	272,70 (253,40 – 292,10)	305,90 (272,50 – 339,20)	295,20 (238,80 – 351,60)	281,30 (247,30 – 315,30)	260,40 (231,60 – 289,20)
Encéfalo	71,59 (53,68 – 89,50)	52,17 (29,90 – 74,54)	65,87 (55,19 – 76,55)	71,24 (61,47 – 81,02)	64,71 (53,07 – 76,35)
Testículos	461,10 (435,50 – 486,60)	476,20 (462,20 – 490,20)	474,80 (446,80 – 502,90)	447,20 (427,80 – 466,60)	417,60 (320,60 – 514,50)
Glândula salivar	127,5 (111,30 – 143,70)	132,70 (97,28 -168,20)	126,40 (106,10 – 146,60)	110,70 (93,13 – 128,20)	102,00 (83,21 – 120,80)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 4 - 10 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da média dos pesos dos órgãos em mg.

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): ** p<0,01; teste SNK.

Tabela 9 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso relativo do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, ovário e tubas uterinas, encéfalo e glândula salivar de camundongos fêmeas

Estrutura	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 ($\mu\text{g}/\text{kg}$, v.o.)				
	0	5	50	500	5.000
Baço	0,63 (0,41 – 0,84)	0,49 (0,43 – 0,55)	0,50 (0,45 – 0,54)	0,46 (0,41 – 0,50)	0,53 (0,47 – 0,59)
Rins	0,60 (0,55 – 0,66)	0,61 (0,45 – 0,78)	0,49 (0,47 – 0,52)	0,54 (0,57 – 0,62)	0,54 (0,50 – 0,57)
Coração	0,46 (0,43 – 0,49)	0,50 (0,43 – 0,57)	0,41 (0,38 – 0,43)	0,48 (0,41 – 0,55)	0,44 (0,39 – 0,49)
Pulmão	1,04 (0,90 – 1,18)	0,77 (0,66 – 0,88)	0,77 (0,65 – 0,89)	0,77 (0,68 – 0,86)	0,73 (0,58 – 0,88)
Fígado	4,80 (4,20 – 5,30)	4,40 (4,20 – 4,70)	4,20 (3,90 – 4,40)	4,20 (3,90 – 4,60)	4,30 (4,10 – 4,40)
Linfonodo mesentérico	0,05 (0,03 – 0,069)	0,05 (0,03 – 0,063)	0,04 (0,01 – 0,061)	0,04 (0,01 – 0,061)	0,06 (0,02 – 0,091)
Glândula adrenal	0,031 (0,022 – 0,041)	0,022 (0,014 – 0,029)	0,026 (0,020 – 0,034)	0,025 (0,017 – 0,033)	0,024 (0,017 – 0,031)
Timo	0,200 (0,129 – 0,271)	0,225 (0,186 – 0,265)	0,208 (0,161 – 0,255)	0,312 (0,229 – 0,395)	0,214 (0,186 – 0,243)
Estômago	1,02 (0,91 – 1,12)	0,92 (0,86 – 0,98)	0,94 (0,87 – 1,01)	1,07 (0,98 – 1,17)	0,94 (0,87 – 1,01)
Ovário e tubas uterinas	1,37 (1,00 – 1,73)	1,13 (0,70 – 1,56)	1,14 (1,32 – 1,54)	1,15 (1,33 – 1,60)	1,38 (1,31 – 1,44)
Encéfalo	0,92 (0,69 – 1,15)	1,31 (1,06 – 1,57)	0,74 (0,59 – 0,89)	0,75 (0,63 – 0,86)	0,68 (0,58 – 0,79)
Glândula salivar	0,32 (0,24 – 0,40)	0,41 (0,19 – 0,64)	1,95 (0,15 – 0,24)	1,69 (0,09 – 0,24)	1,72 (0,15 – 0,19)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 4 - 10 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da relação (em porcentagem) do peso dos órgãos pela massa corpórea dos animais (através da seguinte fórmula: peso do órgão/peso do animal x 100). Teste SNK.

Tabela 10 - Efeito do tratamento agudo realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso absoluto do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, ovário e tubas uterinas, encéfalo e glândula salivar de camundongos fêmeas

Estrutura	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 (µg/kg, v.o.)				
	0	5	50	500	5.000
Baço	192,90 (141,00 – 244,70)	165,30 (140,20 – 190,40)	171,20 (151,80 – 190,70)	130,00* (116,30 – 143,80)	180,50 (162,50 -198,50)
Rins	184,50 (156,70 -212,30)	201,60 (134,80 – 268,50)	170,10 (155,70 – 184,40)	169,70 (158,50 – 180,90)	182,70 (171,70 – 193,70)
Coração	146,00 (133,60 – 158,30)	156,20 (135,90 – 176,50)	138,20 (126,70 -149,80)	146,70 (103,80 – 189,60)	149,40 (133,40 – 165,40)
Pulmão	325,90 (289,50 -362,40)	258,60* (229,90 – 287,70)	263,70** (223,80 – 303,60)	218,50*** (193,80 – 243,20)	247,80** (200,70 – 295,00)
Fígado	1480,00 (1377,00 – 1583,00)	1481,00 (1304,00 – 1659,00)	1427,00 (1288,00 – 1566,00)	1208,00** (1102,00 – 1314,00)	1448,00 (1359,00 -1538,00)
Linfonodo mesentérico	18,26 (10,97 – 25,55)	15,80 (10,46 – 21,14)	14,60 (6,65 – 22,54)	12,80 (5,36 – 20,24)	22,24 (10,02 – 34,47)
Glândula adrenal	10,39 (7,65 – 13,13)	9,70 (5,64 – 13,75)	9,26 (6,98 -11,53)	7,23 (4,99 – 9,46)	8,68 (6,13 – 11,23)
Timo	73,20 (63,73 – 82,67)	75,55 (60,66 – 90,44)	72,78 (55,78 – 89,78)	89,86 (62,95 – 117,0)	73,20 (63,73 – 82,67)
Estômago	320,30 (282,80 – 357,90)	306,30 (277,40 – 335,30)	322,20 (292,70 – 351,70)	305,00 (281,30 – 328,60)	321,90 (298,40 – 345,40)
Ovário e tubas uterinas	294,90 (207,30 – 382,50)	433,20** (356,80 – 509,60)	250,00 (179,80 – 269,50)	224,70 (179,80 – 269,50)	232,10 (197,20 – 267,00)
Encéfalo	463,00 (431,90 – 494,00)	477,10 (456,10 – 449,90)	472,30 (449,90 – 494,60)	433,80 (400,00 – 467,60)	468,90 (441,50 – 496,30)
Glândula salivar	100,40 (74,95 – 126,20)	130,50 (96,48 – 164,50)	70,10 (53,35 – 86,85)	55,51** (41,41 – 69,61)	59,65** (52,65 – 65,51)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 4 - 10 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da média dos pesos dos órgãos em mg.

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001; teste SNK.

agudamente com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5 - 5.000 µg/kg), administrado pela via oral, apresentaram redução significativa do peso absoluto do baço, fígado, glândula salivar e pulmão na dose de 500 µg/kg, 500 µg/kg, 500 e 5.000 µg/kg e 5, 50, 500 e 5.000 µg/kg, respectivamente. Em contrapartida, no ovário e tubas uterinas dos camundongos fêmeas, o tratamento com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (5 - 5.000 µg/kg), administrado pela via oral, causou aumento significativo do peso absoluto na dose de 5 µg/kg (Tabela 10).

A ausência de letalidade observada no estudo de toxicidade aguda oral do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 em camundongos, está de acordo com os realizados com outras bacteriocinas produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*.

He; Chen e Liu (2006) constataram, no estudo de toxicidade aguda em camundongos, que a nova bacteriocina isolada de *Bacillus licheniformes* não apresentava efeitos colaterais, quando administrada por via oral (gavagem), numa dose de 0,8mg/20g de peso corpóreo. Não houve mortalidade nos 6 grupos de animais estudados. Cada grupo foi tratado, diariamente, com 0,26, 0,33, 0,41, 0,51, 0,64 e 0,80ml/20g do sobrenadante estéril da cultura de *Bacillus licheniformes* numa concentração de 1mg/ml. Não foram encontradas alterações histológicas no coração, fígado, baço, pulmões, rins, estômago e intestino. Os autores concluíram que essa substância antimicrobiana poderia ser utilizada como bioconservante natural, haja vista que é ativa contra alguns microrganismos patogênicos e deteriorantes, como *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus flavus*.

Conclui-se, portanto, que o extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, quando administrado agudamente pela via oral até a dose de 5.000µg/kg em camundongos de ambos os sexos, demonstrou boa tolerabilidade e poucos efeitos tóxicos importantes. Contudo, as principais alterações observadas foram somente nos camundongos fêmeas, justificando assim a continuação dos estudos toxicológicos por doses repetidas.

5.7 Análise toxicológica de doses repetidas

a) Toxicidade por doses repetidas

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (nas doses de 50, 500 e 5.000 μ g/kg, contendo 20 animais por grupo) administrado diariamente por 90 dias consecutivos, pela via oral, tanto em camundongos machos quanto para fêmeas, produziu a morte de 5 a 15% dos animais durante os 90 dias de tratamento, sendo a DL₅₀ superior a 5.000 μ g/kg, enquanto que a letalidade observada nos animais tratados com veículo (grupos controles) foi de 5%. A Tabela 11 mostra o período (em dias) após o início do tratamento com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50 – 5.000 μ g/kg) ou com o veículo (10ml/kg) em que ocorreram as mortes, bem como o número de camundongos machos e fêmeas que morreram em cada período. Além disso, o tratamento dos animais durante 90 dias com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não produziu outras alterações comportamentais significativas, sugestivas de toxicidade, quando comparado com os animais controles (tratados com o veículo), que compromettesse a continuidade do tratamento.

Tabela 11 - Relação do período e número de camundongos machos ou fêmeas que morreram ao longo do tratamento realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 ou veículo (10 ml/kg), administrado pela via oral, durante 90 dias

Período após tratamento (dias)	Camundongos machos				Camundongos fêmeas			
	Extrato bruto (µg/kg, v.o.)				Extrato bruto (µg/kg, v.o.)			
	0	50	500	5.000	0	50	500	5.000
2º								
3º								
4º								
5º								
6º			1				1	
7º				1				
9º						1		
10º								
12º	1							1
14º		1						
15º								
16º				1			1	
20º								
21º			1					
32º								
37º								
39º		1						
45º								
46º			1					
Total	1	2	3	2	0	1	2	1

v.o.– via oral.

b) Influência do tratamento prolongado dos animais com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre a massa corporal, consumo de comida e água

O tratamento com doses repetidas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (nas doses de 50, 500 e 5.000µg/kg), administrado por 90 dias consecutivos, pela via oral, tanto em camundongos machos quanto fêmeas, promoveu redução ou aumento de forma significativa da massa corporal dos animais ao longo do tratamento, quando comparado com o grupo controle. Contudo, é importante mencionar que camundongos fêmeas, mas não os camundongos machos, apresentaram maior sensibilidade a redução do peso corporal ao final do tratamento, sendo que este efeito foi significativo na dose de 50µg/kg (Tabela 12). É importante ressaltar que a redução significativa

Tabela 12 - Efeito do tratamento por doses repetidas, durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre a variação de peso corporal de camundongos ao longo do tratamento

(continua)

Grupo ($\mu\text{g/kg}$, v.o.)	Sexo	1 ^a semana Peso dos animais (g)	2 ^a semana Peso dos animais (g)	3 ^a semana Peso dos animais (g)	4 ^a semana Peso dos animais (g)	5 ^a semana Peso dos animais (g)	6 ^a semana Peso dos animais (g)
0	Macho	1,67 \pm 0,19	0,07 \pm 0,28	-0,36 \pm 0,34	3,10 \pm 0,25	-1,73 \pm 0,50	2,07 \pm 0,68
50	Macho	1,09 \pm 0,38	0,17 \pm 0,14	-1,51 \pm 0,48	4,36 \pm 0,63	-4,1 \pm 0,29***	3,87 \pm 0,38**
500	Macho	1,39 \pm 0,50	-0,70 \pm 0,19*	0,66 \pm 0,53	3,88 \pm 0,21	-1,72 \pm 0,20	4,02 \pm 0,25*
5.000	Macho	1,61 \pm 0,38	-0,35 \pm 0,17	-0,24 \pm 0,38	1,93 \pm 0,56	-0,38 \pm 0,42*	1,88 \pm 0,34
0	Fêmea	0,79 \pm 0,13	-0,72 \pm 0,22	1,51 \pm 0,18	-0,28 \pm 0,28	1,45 \pm 0,30	0,19 \pm 0,23
50	Fêmea	0,25 \pm 0,25	-2,46 \pm 0,22***	3,24 \pm 0,53**	-0,29 \pm 0,20	-0,90 \pm 0,38***	0,16 \pm 0,26
500	Fêmea	0,28 \pm 0,12	-1,47 \pm 0,23	3,24 \pm 0,19**	-0,30 \pm 0,24	-0,11 \pm 0,29**	-0,005 \pm 0,20
5.000	Fêmea	1,46 \pm 0,37	-0,74 \pm 0,31	2,73 \pm 0,37*	-0,04 \pm 0,25	0,40 \pm 0,25*	-0,22 \pm 0,24

Os valores representam a média de 17 - 20 animais \pm o erro padrão da média. v.o. – via oral.

Os valores foram obtidos através da variação semanal de peso dos animais (em gramas, g) ao longo do tratamento.

A diferença final representa a diferença de massa corpórea obtida da variação média do peso dos animais na 13^a semana com a variação média do peso dos animais na 1^a semana.

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; teste SNK.

Tabela 12 - Efeito do tratamento por doses repetidas, durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre a variação de peso corporal de camundongos ao longo do tratamento

		(conclusão)							
Grupo ($\mu\text{g/kg}$, v.o.)	Sexo	7 ^a semana Peso dos animais (g)	8 ^a semana Peso dos animais (g)	9 ^a semana Peso dos animais (g)	10 ^a -semana Peso dos animais (g)	11 ^a semana Peso dos animais (g)	12 ^a semana Peso dos animais (g)	13 ^a semana Peso dos Animais (g)	Diferença de Peso final (g)
0	Macho	0,37 \pm 0,19	2,29 \pm 0,41	1,02 \pm 0,46	0,57 \pm 0,54	1,15 \pm 0,78	0,09 \pm 0,26	0,87 \pm 0,64	8,56 \pm 0,62
50	Macho	0,10 \pm 0,19	3,09 \pm 0,76	2,16 \pm 0,76	2,15 \pm 0,48	0,87 \pm 0,56	0,81 \pm 0,47	1,22 \pm 0,51	11,22 \pm 0,80
500	Macho	0,28 \pm 0,20	1,29 \pm 0,45	0,98 \pm 0,38	0,54 \pm 0,34	0,86 \pm 0,41	1,54 \pm 0,69	1,89 \pm 0,28	11,16 \pm 0,94
5.000	Macho	0,20 \pm 0,17	2,80 \pm 0,87	0,20 \pm 0,41	0,71 \pm 0,26	1,68 \pm 0,18	1,32 \pm 0,35	0,44 \pm 0,34	10,05 \pm 1,68
0	Fêmea	0,015 \pm 0,34	2,35 \pm 0,36	-0,61 \pm 0,77	2,12 \pm 0,56	-0,12 \pm 0,25	1,92 \pm 0,41	1,00 \pm 0,33	9,32 \pm 0,60
50	Fêmea	0,32 \pm 0,43	3,016 \pm 0,27	0,69 \pm 0,21	0,42 \pm 0,29	0,05 \pm 0,17	2,04 \pm 0,48	0,35 \pm 0,22	5,33 \pm 0,70**
500	Fêmea	0,06 \pm 0,67	1,27 \pm 0,30	0,58 \pm 0,40	1,56 \pm 0,28	0,21 \pm 0,37	0,44 \pm 0,74	1,18 \pm 0,35	7,53 \pm 0,91
5.000	Fêmea	-0,64 \pm 0,67	1,64 \pm 0,30	0,62 \pm 0,37	0,93 \pm 0,89	-0,40 \pm 0,98	-0,38 \pm 0,84	0,64 \pm 0,15	6,78 \pm 1,19

Os valores representam a média de 17 - 20 animais \pm o erro padrão da média. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da variação semanal de peso dos animais (em gramas, g) ao longo do tratamento.

A diferença final representa a diferença de massa corpórea obtida da variação média do peso dos animais na 13^a semana com a variação média do peso dos animais na 1^a semana.

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001; teste SNK.

da massa corpórea de camundongos fêmeas tratados com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não foi acompanhada de redução significativa da ingestão de comida e líquido (água), tanto em camundongos machos quanto fêmeas (Tabela 13). Logo, o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não alterou o consumo de ração e água e nem tão pouco o ganho de peso em camundongos machos e fêmeas ao final do experimento.

Em estudos de toxicidade de longo prazo é comum ocorrer obesidade nos animais. A propensão à obesidade ocorre, geralmente, quando a ração é administrada *ad libitum* ou quando não existem condições adequadas para o exercício físico. Alguns genes que determinam a propensão à obesidade têm sido descobertos em algumas linhagens de roedores, porém deve-se analisar com cautela a verdadeira relevância do modelo animal para o estudo da interação da obesidade com a toxicidade de aditivos alimentares, bem como sua influência na saúde dos animais e do próprio ser humano. Vários estudos mostram que uma pequena restrição calórica na dieta de ratos pode reduzir a incidência e severidade de várias patologias, incluindo a formação de tumor (BARLOW et al., 2002).

Tabela 13 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre a variação do consumo médio de ração e água de camundongos no final do tratamento

Grupo ($\mu\text{g}/\text{kg}$, v.o.)	Sexo	Ração (g)	Água (ml)
0	Macho	$5,13 \pm 0,30$	$7,56 \pm 0,32$
50	Macho	$5,50 \pm 0,18$	$7,04 \pm 0,33$
500	Macho	$5,83 \pm 0,14$	$6,98 \pm 0,30$
5.000	Macho	$5,72 \pm 0,09$	$7,41 \pm 0,33$
0	Fêmea	$5,21 \pm 0,18$	$6,43 \pm 0,23$
5	Fêmea	$5,05 \pm 0,09$	$6,67 \pm 0,26$
500	Fêmea	$4,96 \pm 0,13$	$6,41 \pm 0,23$
5.000	Fêmea	$4,86 \pm 0,11$	$6,56 \pm 0,24$

Os valores representam a média da variação da ingesta sólida (g/animal/dia) e líquida (ml/animal/dia) de 17 - 20 animais \pm o erro padrão da média. v.o.– via oral. Teste SNK.

c) Influência do tratamento prolongado dos animais com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre alguns parâmetros hematológicos

O tratamento prolongado dos camundongos machos ou fêmeas com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50 – 5.000µg/kg), administrado diariamente por 90 dias consecutivos, por via oral, produziu alterações pontuais na atividade hematopoiética da medula óssea, determinada através dos seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, contagem de hemácias, plaquetas, hemoglobina e contagem de leucócitos. O tratamento de camundongos machos e fêmeas com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50 – 5.000µg/kg), administrado por via oral, não produziu alteração significativa dos parâmetros hematológicos analisados (hematócrito, contagem de hemácias, leucócitos, plaquetas e hemoglobina) quando comparados com o grupo controle (Tabela 14). Por outro lado, a contagem diferencial das células sangüíneas não foi alterada nos diferentes grupos experimentais quando comparados com o grupo controle (Tabela 15).

Pablo et al. (1999), investigaram o efeito da nisina na resposta imunológica em camundongos. A nisina comercial (Nisaplin[®]) foi incorporada à dieta dos animais por 30, 75 e 100 dias. Quando administrada por curto prazo, a nisina induziu um aumento na contagem de linfócitos T e diminuiu a contagem dos linfócitos B. Esse efeito não foi observado quando a bacteriocina foi administrada por longo prazo, porém observou-se um aumento significativo na fração de monócitos/macrófagos no sangue periférico após 100 dias de administração. Após administração de baixas doses de Nisaplin[®] observou-se uma diminuição da atividade fagocítica das células peritoniais. Além das ações imunomodulatórias observadas, os pesquisadores descrevem que o uso de nisina na dieta induz ao aumento de peso, beneficiando a nutrição dos animais.

Tabela 14 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros hematológicos em camundongos

Grupo ($\mu\text{g/kg}$, v.o.)	Sexo	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
0	Macho	8,2 (7,70-8,69)	41,05 (38,58-43,52)	13,03 (11,93-14,12)	6,28 (4,67 – 7,89)	902,00 (842,71-961,29)
50	Macho	8,08 (7,14-9,01)	40,32 (35,65-44,99)	13,17 (11,65-14,70)	9,65 (7,83 – 11,98)	965,30 (919,16-1011,40)
500	Macho	8,56 (8,07-9,05)	42,75 (40,32-45,18)	13,97 (13,17-14,76)	8,99 (7,44 – 10,54)	939,90 (874,10-1005,60)
5.000	Macho	8,12 (6,84-9,41)	40,45 (34,81-46,09)	12,96 (11,98-14,73)	8,22 (6,06 – 10,39)	918,50 (839,70-997,30)
0	Fêmea	8,01 (7,46-8,55)	39,97 (37,25-42,67)	13,06 (12,17-13,95)	8,77 (6,14 – 11,40)	808,70 (680,34-937,06)
50	Fêmea	8,27 (7,88-8,65)	41,27 (39,36-43,17)	13,49 (12,86-14,11)	9,98 (7,02 – 12,94)	977,00 (804,57-1149,40)
500	Fêmea	8,08 (7,80-8,36)	40,35 (39,96-41,74)	13,19 (12,74-13,64)	7,93 (5,95 – 9,91)	838,70 (676,57-1000,80)
5.000	Fêmea	7,49 (6,83-8,15)	37,48 (34,2-40,76)	12,25 (11,18-13,32)	10,18 (6,65 – 13,71)	1008,60 (815,77-1201,40)

Os valores representam a média de 10 - 12 animais juntamente com o intervalo de confiança de 95%. v.o.– via oral.
Teste SNK.

Tabela 15 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o número diferencial de células sangüíneas em camundongos

Grupo ($\mu\text{g/kg}$, v.o.)	Sexo	Basófilo (%)	Bastão (%)	Segmentado (%)	Linfócito (%)	Monócito (%)
0	Macho	0,08 (-0,10-0,27)	0,33 (-0,08-0,740)	7,08 (5,56-8,60)	89,08 (86,59-91,57)	3,33 (2,05-4,61)
50	Macho	0	0	6,0 (4,46-7,54)	92,92 (91,09-94,76)	1,08 (0,50-1,65)
500	Macho	0	0,25 (-0,04-0,54)	6,41 (3,63-9,19)	91,42 (88,42-94,42)	2,08 (1,21-2,96)
5.000	Macho	0	0,14 (-0,21-0,49)	9,0 (3,41-14,60)	88,0 (80,19-95,81)	2,86 (0,38-5,33)
0	Fêmea	0	0	4,6 (2,71-6,67)	94,38 (92,16-96,61)	0,92 (0,46-1,38)
50	Fêmea	0	0	5,6 (4,46-7,65)	90,37 (86,07-94,68)	2,25 (1,18-3,32)
500	Fêmea	0	0,14 (-0,07-0,35)	3,21 (1,38-5,04)	95,07 (92,73-97,41)	1,57 (0,86-2,28)
5.000	Fêmea	0	0,07 (-0,08-0,23)	4,21 (3,15-5,28)	94,35 (92,64-96,08)	1,36 (0,52-2,19)

Os valores representam a média de 10 - 12 animais juntamente com o intervalo de confiança de 95%.
v.o.– via oral. Teste SNK.

d) Influência do tratamento prolongado dos animais com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre alguns parâmetros bioquímicos

O tratamento prolongado de camundongos machos com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50 – 5.000µg/kg), administrado diariamente por 90 dias consecutivos, por via oral, não causou alterações significativas dos níveis plasmáticos de glicose, globulinas, albumina, proteínas totais, bilirrubina total e indireta, creatinina, sódio, fosfatase alcalina (FA), γ -glutamil transferase (γ GT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ácido úrico, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol VLDL, triglicérides quando comparado com os animais controle. No entanto, o mesmo tratamento de camundongos machos com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, aumentou de forma significativa, os níveis de potássio nas doses de 50 e 5.000µg/kg e diminuiu os níveis de uréia nas doses de 50, 500 e 5.000µg/kg, em relação ao grupo controle, tratado com veículo (Tabela 16).

O aumento dos níveis séricos de potássio, constatado nos grupos de camundongos machos tratados com 500 e 5.000µg/kg do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, pode ser um indicativo de nefropatias, principalmente com insuficiência renal e insuficiência hepática. Apesar dessa alteração não estar associada a alterações de outros indicadores de função renal e hepática analisados, essa hipótese só pode ser descartada por exames histopatológicos. Já a diminuição dos níveis séricos de uréia, constatado nos grupos de camundongos machos tratados com 50, 500 e 5.000µg/kg do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, não apresenta significado clínico, dada a presença de níveis séricos de uréia menores que os constatados no grupo controle (FLEURY, 2006).

Tabela 16 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros bioquímicos do sangue em camundongos machos

(continua)

Parâmetro bioquímico	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 (µg/kg, v.o.)			
	0	50	500	5.000
Proteínas totais (g/%)	4,46 (4,26-4,66)	4,53 (4,09-4,97)	4,54 (4,27-4,97)	4,28 (3,94-4,62)
Albumina (g/%)	1,21 (1,11-1,32)	1,22 (1,02-1,42)	1,19 (1,07-1,31)	1,11 (0,98-1,24)
Globulinas (g/%)	3,24 (3,10-3,39)	3,31 (3,04-3,58)	3,35 (3,13-3,57)	3,17 (2,88-3,46)
Relação Albumina/Globulina	0,38 (0,34-0,41)	0,37 (0,32-0,41)	0,36 (0,32-0,40)	0,35 (0,31-0,40)
Glicose (mg/dL)	136,86 (126,00-147,71)	141,20 (90,19-122,21)	133,10 (120,49-145,71)	130,60 (117,44-143,76)
Creatinina (mg/dL)	0,24 (0,17-0,30)	0,19 (0,14-0,24)	0,22 (0,12-0,31)	0,24 (0,14-0,34)
Uréia (mg/dL)	54,00 (46,90-61,10)	46,60* (42,24-50,96)	43,00* (38,11-47,89)	43,60* (40,72-46,48)
Sódio (mEq/L)	146,07 (141,92-150,22)	145,00 (141,48-148,52)	139,30 (136,34-142,26)	144,00 (135,40-152,60)
Potássio (mEq/L)	4,63 (4,40-4,85)	5,17** (4,91-5,43)	4,85 (4,61-5,09)	5,38*** (5,04-5,72)
Ácido úrico (mg/dL)	0,56 (0,39-0,74)	0,99 (0,69-1,29)	0,59 (0,36-0,82)	0,89 (0,52-1,26)
Bilirrubina total (mg/dL)	0,33 (0,30-0,35)	0,35 (0,30-0,39)	0,30 (0,28-0,33)	0,33 (0,28-0,38)

Os valores representam a média de 10 - 12 animais juntamente com o intervalo de confiança de 95%. v.o.– via oral.
Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. Teste SNK.

Tabela 16 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros bioquímicos do sangue em camundongos machos

(conclusão)

Parâmetro bioquímico	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 (µg/kg, v.o.)			
	0	50	500	5.000
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,23 (0,21-0,25)	0,25 (0,22-0,28)	0,22 (0,20-0,23)	0,23 (0,20-0,26)
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,16 (0,03-0,28)	0,10 (0,08-0,12)	0,09 (0,08-0,10)	0,10 (0,08-0,13)
Alanina aminotransferase (U/L)	71,57 (52,65-90,50)	79,10 (60,65-97,55)	76,00 (61,81-90,19)	70,00 (57,44-82,56)
Aspartato aminotransferase (U/L)	145,21 (116,29-174,14)	148,40 (109,43-187,37)	124,30 (99,99-148,61)	127,10 (100,56-153,64)
Fosfatase alcalina (U/L)	0,21 (-0,25-0,68)	0 (0,00-0,00)	0 (0,00-0,00)	0 (0,00-0,00)
Gama GT (U/L)	1,16 (0,32-1,99)	2,00 (0,65-3,35)	0,98 (0,30-1,66)	1,38 (0,84-1,92)
Colesterol total (mg/dl)	89,71 (78,01-101,42)	78,80 (60,58-97,02)	79,40 (68,70-90,10)	79,50 (69,16-89,84)
Colesterol HDL(mg/dl)	17,43 (13,15-21,70)	19,4 (17,08-21,72)	24,8 (19,10-30,50)	19,5 (11,06-27,95)
Colesterol LDL(mg/dl)	55,28 (48,26-68,31)	48,30 (31,46-65,14)	43,00 (36,02-49,98)	46,90 (37,74-56,06)
Colesterol VLDL (mg/dl)	17,00 (10,38-23,62)	11,10 (8,98-13,22)	11,60 (9,54-13,66)	13,10 (10,27-15,93)
Triglicerídeos	84,93 (52,28-117,58)	56,40 (46,28-66,52)	57,30 (47,27-67,33)	65,20 (51,08-79,32)

Os valores representam a média de 10 - 12 animais juntamente com o intervalo de confiança de 95%. v.o.– via oral.
Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. Teste SNK.

Os dados apresentados na Tabela 17 demonstram que o tratamento prolongado dos camundongos fêmeas com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50 – 5.000µg/kg), administrado diariamente por 90 dias consecutivos por via oral, não causou alterações significativas dos níveis plasmáticos de glicose, albumina, globulinas, creatinina, fosfatase alcalina, γ -glutamil transferase (γ GT), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total, direta e indireta, colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL, colesterol HDL, triglicerídeos, sódio, potássio, uréia e ácido úrico, quando comparado com os animais controle. No entanto, o mesmo tratamento de camundongos fêmeas com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 aumentou de forma significativa os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e diminuiu os níveis de sódio na dose de 500 e 5.000µg/kg, respectivamente, em relação ao grupo controle, tratado com veículo (Tabela 17).

O aumento dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) constatado nos grupos de camundongos fêmeas tratadas com 500µg/kg do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, pode ser um indicativo de hepatopatias, como necrose hepatocística tóxica ou isquêmicas e anemias hemolíticas. Já a diminuição dos níveis séricos de sódio, constatado nos grupos de camundongos fêmeas tratadas com 5.000µg/kg do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, pode ser um indicativo de síndrome nefrótica e de nefropatias com perda de sódio. Apesar dessa alteração não estar associada a alterações de outros indicadores de função hepática e renal analisados, essa hipótese só pode ser descartada por exames histopatológicos (FLEURY, 2006).

Tabela 17 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros bioquímicos do sangue em camundongos fêmeas

(continua)

Parâmetro bioquímico	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 (µg/kg, v.o.)			
	0	50	500	5.000
Proteínas totais (g/%)	4,48 (4,25 - 4,71)	4,87 (4,55 - 5,19)	4,63 (4,35 - 4,91)	4,68 (4,50 - 4,86)
Albumina (g/%)	1,17 (1,06 - 1,28)	1,23 (1,04 - 1,41)	1,23 (1,05 - 1,41)	1,09 (0,99 - 1,19)
Globulinas (g/%)	3,31 (3,10 - 3,52)	3,64 (3,31 - 3,97)	3,40 (3,22 - 3,58)	3,59 (3,37 - 3,81)
Relação Albumina/Globulina	0,36 (0,31 - 0,40)	0,34 (0,29 - 0,40)	0,36 (0,31 - 0,41)	0,31 (0,27 - 0,35)
Glicose(mg/dL)	113,00 (105,99 - 120,01)	113,90 (94,31 -133,48)	120,46 (109,69 - 131,23)	126,70 (107,21 -146,19)
Creatinina (mg/dL)	0,30 (0,19 - 0,41)	0,40 (0,27 - 0,53)	0,45 (0,34 - 0,56)	0,31 (0,21 - 0,41)
Uréia (mg/dL)	39,00 (35,93 - 42,07)	35,90 (29,82 - 41,97)	36,80 (27,95 -45,66)	41,50 (35,19 - 47,81)
Sódio (mEq/L)	142,60 (138,05 - 147,15)	140,80 (136,00 - 145,60)	137,00 (131,53 -142,47)	129,50*** (124,60 -134,40)
Potássio (mEq/L)	4,70 (4,29 - 5,12)	4,86 (4,60 - 5,12)	7,78 (0,43 - 15,13)	4,79 (4,47 - 5,11)
Ácido úrico (mg/dL)	0,58 (0,10 - 1,06)	0,22 (0,11 - 0,33)	0,31 (0,11 - 0,51)	0,31 (0,11 - 0,51)
Bilirrubina total (mg/dL)	0,30 (0,27 - 0,33)	0,31 (0,28 - 0,34)	0,31 (0,27 - 0,35)	0,27 (0,25 - 0,29)

Os valores representam a média de 10 - 12 animais juntamente com o intervalo de confiança de 95%. v.o.- via oral.

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): * p <0,05, *** p <0,001; teste SNK.

Tabela 17 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre alguns parâmetros bioquímicos do sangue em camundongos fêmeas

(conclusão)

Parâmetro bioquímico	Extrato bruto antibacteriano de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> R 10 (µg/kg, v.o.)			
	0	50	500	5.000
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,20 (0,18 - 0,22)	0,21 (0,19 - 0,23)	0,23 (0,20 - 0,26)	0,20 (0,19 - 0,21)
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,10 (0,08 - 0,12)	0,10 (0,07 - 0,12)	0,08 (0,07 - 0,10)	0,07 (0,06 - 0,08)
Alanina aminotransferase (U/L)	60,90 (48,26 - 73,54)	45,50 (35,32 - 55,68)	71,00 (60,44 - 81,56)	52,10 (36,65 - 67,55)
Aspartato aminotransferase (U/L)	100,90 (78,43 - 123,36)	77,90 (60,67 - 95,12)	154,40 * (114,91 - 193,89)	127,90 (90,59 - 165,21)
Fosfatase alcalina (U/L)	0,40 (-0,29 - 1,09)	0,20 (-0,10 - 0,50)	0,40 (-0,29 - 1,09)	0,30 (-0,04 - 0,64)
Gama GT (U/L)	2,70 (0,76 - 4,64)	2,50 (1,14 - 3,86)	6,50 (-1,99 - 14,99)	2,10 (0,91 - 3,29)
Colesterol HDL (mg/dl)	11,20 (8,66 - 13,74)	10,60 (7,56 - 13,64)	10,40 (7,87 - 12,93)	14,50 (11,52 - 17,48)
Colesterol LDL (mg/dl)	30,30 (17,04 - 43,56)	27,40 (16,38 - 38,42)	27,80 (13,57 - 42,02)	21,40 (8,22 - 34,58)
Colesterol total (mg/dl)	66,70 (58,20 - 75,20)	65,20 (55,95 - 74,45)	61,20 (48,05 - 74,35)	54,50 (44,84 - 64,16)
Colesterol VLDL (mg/dl)	25,20 (17,92 - 32,48)	27,20 (20,06 - 34,33)	23,00 (17,35 - 28,65)	18,60 (11,26 - 25,94)
Triglicérides (mg/dL)	126,30 (90,19 - 162,41)	136,00 (99,99 - 172,00)	115,30 (86,77 - 143,83)	93,40 (56,47 - 130,33)

Os valores representam a média de 10 - 12 animais juntamente com o intervalo de confiança de 95%. v.o.- via oral. Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): * p <0,05, *** p <0,001; teste SNK.

e) Influência do tratamento prolongado dos animais com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 sobre determinadas características de alguns órgãos

O tratamento com doses repetidas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (nas doses de 50, 500 e 5.000µg/kg), administrado por 90 dias consecutivos por via oral, tanto em camundongos machos quanto fêmeas, não causou alterações macroscópicas importantes quanto ao aspecto e a cor de alguns órgãos analisados, como o coração, pulmão, fígado, rins, baço, estômago, testículos, ovário e tubas uterinas, glândula salivar, glândula adrenal, timo, linfonodo mesentérico e encéfalo, quando comparado ao grupo controle e avaliado no final do experimento.

Os camundongos machos e fêmeas tratados com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50 - 5.000µg/kg) não apresentaram alteração significativa do peso relativo do coração, pulmão, baço, rins, estômago, testículos, ovário e tubas uterinas, glândula salivar, glândula adrenal, timo, linfonodo mesentérico e encéfalo, quando comparado ao grupo controle e avaliado no final do experimento. No entanto, os camundongos machos apresentaram diminuição significativa do peso relativo do fígado nas doses de 50 e 5.000µg/kg, enquanto que a dose de 5.000µg/kg do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 aumentou o peso relativo do fígado de camundongos fêmeas, quando comparado ao grupo controle (Tabela 18).

Por outro lado, os dados apresentados na Tabela 19 mostram que o tratamento de camundongos machos e fêmeas com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50 – 5.000µg/kg) não causou alteração significativa do peso absoluto do coração, baço, rins, pulmão, estômago, testículos, ovário e tubas uterinas, glândula salivar, glândula adrenal, timo, linfonodo mesentérico e encéfalo, quando comparado ao grupo controle e avaliado no final do experimento. No entanto, os camundongos machos e fêmeas apresentaram diminuição e aumento, respectivamente, significativos do peso absoluto do fígado na dose de 5.000µg/kg, quando comparado ao grupo controle.

Tabela 18 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso relativo do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículo/ovário e glândula salivar de camundongos

(continua)

Grupo ($\mu\text{g}/\text{kg}$, v.o.)	Sexo	Baço (%)	Rins (%)	Coração (%)	Pulmão (%)	Fígado (%)	Linfonodo mesentérico (%)
0	Macho	0,29 (0,27 – 0,30)	0,58 (0,56 – 0,61)	0,41 (0,38 – 0,44)	0,56 (0,50 – 0,63)	4,60 (4,30 – 5,00)	0,13 (0,10 – 0,15)
50	Macho	0,28 (0,26 – 0,31)	0,57 (0,53 – 0,61)	0,38 (0,34 – 0,42)	0,52 (0,48 – 0,56)	3,90* (3,50 – 4,20)	0,10 (0,8 – 0,12)
500	Macho	0,28 (0,26 – 0,30)	0,57 (0,54 – 0,61)	0,39 (0,35 – 0,43)	0,54 (0,48 – 0,61)	4,30 (3,90 – 4,70)	0,12 (0,09 – 0,14)
5.000	Macho	0,31 (0,27 – 0,36)	0,55 (0,49 – 0,66)	0,40 (0,34 – 0,46)	0,49 (0,45 – 0,54)	3,60** (3,20 – 4,10)	0,09 (0,07 – 0,11)
0	Fêmea	0,47 (0,36 – 0,57)	0,50 (0,45 – 0,55)	0,40 (0,35 – 0,45)	0,62 (0,54 – 0,71)	4,30 (3,60 – 4,90)	0,13 (0,10 – 0,16)
50	Fêmea	0,38 (0,34 – 0,41)	0,47 (0,44 – 0,50)	0,38 (0,36 – 0,40)	0,66 (0,59 – 0,73)	4,50 (4,10 – 4,80)	0,15 (0,13 – 0,17)
500	Fêmea	0,41 (0,34 – 0,48)	0,47 (0,44 – 0,51)	0,38 (0,35 – 0,41)	0,63 (0,56 – 0,69)	4,70 (4,50 – 4,80)	0,15 (0,12 – 0,19)
5.000	Fêmea	0,45 (0,35 – 0,55)	0,53 (0,48 – 0,57)	0,42 (0,39 – 0,44)	0,65 (0,57 – 0,73)	5,90*** (5,20 – 6,70)	0,18 (0,14 – 0,22)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 17 - 20 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da relação (em porcentagem) do peso dos órgãos pela massa corpórea dos animais (através da seguinte fórmula: peso do órgão/peso do animal x 100).

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; teste SNK.

Tabela 18 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso relativo do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículo/ovário e glândula salivar de camundongos (conclusão)

Grupo ($\mu\text{g/kg}$, v.o.)	Sexo	Glândula adrenal (%)	Timo (%)	Estômago (%)	Encéfalo (%)	Testículo/ Ovário (%)	Glândula salivar (%)
0	Macho	0,0053 (0,003-0,007)	0,13 (0,09 – 0,16)	0,75 (0,69 – 0,81)	1,01 (0,96 – 1,06)	0,20 (0,18 – 0,22)	0,26 (0,22 – 0,31)
50	Macho	0,0050 (0,003 – 0,007)	0,16 (0,12 – 0,20)	4,5 (0,36 – 12,7)	0,92 (0,85 – 0,98)	0,20 (0,18 – 0,22)	0,24 (0,19 – 0,28)
500	Macho	0,0084 (0,005 – 0,011)	0,16 (0,13 – 0,18)	0,71 (0,65 – 0,77)	0,96 (0,88 – 1,03)	0,21 (0,18 – 0,25)	0,26 (0,20 – 0,33)
5.000	Macho	0,0066 (0,005 – 0,009)	0,17 (0,12 – 0,22)	0,63 (0,57 – 0,70)	0,98 (0,88 – 1,07)	0,18 (0,15 – 0,22)	0,19 (0,13 – 0,25)
0	Fêmea	0,015 (0,012 – 0,018)	0,20 (0,16 – 0,23)	0,91 (0,81 – 1,00)	1,22 (1,07 – 0,36)	0,03 (0,02- 0,04)	0,20 (0,16 – 0,24)
50	Fêmea	0,018 (0,013 – 0,022)	0,18 (0,14 – 0,22)	0,86 (0,80 – 0,92)	1,25 (1,19 – 1,31)	0,03 (0,02 - 0,04)	0,19 (0,15 – 0,24)
500	Fêmea	0,015 (0,013 – 0,018)	0,18 (0,14 – 0,22)	0,91 (0,84 – 0,98)	1,23 (1,14 – 1,32)	0,03 (0,02 – 0,04)	0,19 (0,14 – 0,24)
5.000	Fêmea	0,016 (0,012 – 0,019)	0,17 (0,14 – 0,21)	0,98 (0,91 – 1,07)	1,23 (1,15 – 1,32)	0,03 (0,02 – 0,04)	0,19 (0,15- 0,23)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 17 - 20 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da relação (em porcentagem) do peso dos órgãos pela massa corpórea dos animais (através da seguinte fórmula: peso do órgão/peso do animal x 100).

Difere significativamente do grupo controle (veículo, 0): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; teste SNK.

Tabela 19 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso absoluto do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículo/ovário e glândula salivar de camundongos

(continua)

Grupo ($\mu\text{g/kg}$, v.o.)	Sexo	Baço	Rins	Coração	Pulmão	Fígado	Linfonodo mesentérico
0	Macho	125,60 (116,40 - 134,80)	254,30 (234,80 - 273,90)	176,30 (162,10 - 190,40)	244,40 (214,70 - 274,20)	2013,1 (1851,1-2174,70)	54,00 (46,90 - 61,50)
50	Macho	135,20 (123,00 - 147,40)	269,50 (247,10 - 291,90)	185,80 (166,80 - 204,80)	248,90 (223,60 - 274,20)	1839,2 (1676,9-2003,5)	49,10 (40,20 - 57,80)
500	Macho	124,90 (116,40 - 133,50)	257,20 (243,70 - 270,70)	172,20 (160,60 - 183,90)	244,40 (216,10 - 272,70)	1913,2 (1761,1-2073,0)	58,00 (50,20 - 65,80)
5.000	Macho	139,10 (122,10 - 156,00)	239,20 (227,40 - 251,10)	175,50 (159,90 - 191,20)	222,10 (200,60 - 243,70)	1661,9** (1504,2-1818,2)	43,10 (34,90 - 51,20)
0	Fêmea	174,10 (137,60 - 210,50)	186,50 (179,70 - 193,30)	148,00 (140,70 - 155,30)	240,90 (208,50 - 273,30)	1678,2 (1550,3-1806,8)	51,00 (39,90 - 62,10)
50	Fêmea	133,70 (121,90 - 145,50)	166,80 (155,80 - 177,80)	144,70 (130,30 - 159,00)	234,70 (209,40 - 260,10)	1579,4 (1473,1-1685,7)	52,9 (44,30 - 61,60)
500	Fêmea	148,70 (120,30 - 177,10)	167,00 (152,10 - 182,00)	133,70 (122,40 - 145,00)	228,60 (196,90 - 260,20)	1672,4 (1524-1821)	56,70 (43,10 - 70,30)
5.000	Fêmea	159,70 (124,80 - 194,60)	184,40 (171,50 - 197,40)	144,80 (137,70 - 151,80)	223,60 (196,80 - 250,30)	2057,4*** (1869,7-2246,1)	58,20 (44,50 - 71,80)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 17 - 20 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. v.o. – via oral.

Os valores foram obtidos através da média dos pesos dos órgãos em mg. Teste SNK.

Tabela 19 - Efeito do tratamento prolongado durante 90 dias consecutivos realizado com o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, administrado pela via oral, sobre o peso absoluto do baço, rins, coração, pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, glândula adrenal, timo, estômago, encéfalo, testículo/ovário e glândula salivar de camundongos
(conclusão)

Grupo (µg/kg, v.o.)	Sexo	Glândula adrenal	Timo	Estômago	Encéfalo	Testículo/ Ovário	Glândula salivar
0	Macho	2,22 (1,43-3,01)	54,00 (41,30-66,80)	307,40 (286,50-328,20)	436,60 (423,70-449,50)	88,50 (79,50-96,50)	117,80 (101,20-134,50)
50	Macho	1,95 (1,21-2,70)	64,70 (55,80-73,70)	312,80 (289,20-336,40)	430,60 (403,90-457,70)	95,10 (84,60-105,60)	110,40 (90,00-130,70)
500	Macho	3,43 (2,24-4,16)	64,10 (52,80-75,30)	319,20 (295,50-343,00)	430,80 (403,90-457,70)	96,30 (84,40-108,20)	118,90 (90,90-146,90)
5.000	Macho	2,57 (1,86-3,28)	72,50 (57,90-87,20)	291,60 (272,10-311,20)	426,80 (410,20-443,30)	88,00 (79,40-96,60)	96,30 (71,70-121,00)
0	Fêmea	5,45 (4,54-6,36)	80,20 (63,90-96,50)	347,80 (319,70-375,90)	450,40 (440,70-460,20)	9,40 (6,60-12,20)	73,50 (61,60-85,30)
50	Fêmea	6,29 (4,66-7,92)	67,70 (53,70-81,70)	290,20 (267,50-312,90)	442,70 (429,10-456,30)	10,40 (7,20-13,50)	68,00 (53,40-82,70)
500	Fêmea	5,49 (4,56-6,42)	63,90 (46,90-81,10)	323,30 (297,20-353,80)	430,20 (413,60-446,80)	11,70 (8,10-15,20)	70,90 (53,70-82,20)
5.000	Fêmea	5,63 (4,61-6,64)	60,50 (40,20-71,80)	347,30 (316,30-378,40)	429,80 (412,50-447,20)	11,30 (6,70-15,80)	65,50 (52,00-79,10)

Os valores representam a média de peso dos órgãos de 17 - 20 animais juntamente com o intervalo de confiança a 95%. v.o.– via oral.

Os valores foram obtidos através da média dos pesos dos órgãos em mg. Teste SNK.

Em conjunto, as análises bioquímicas, hematológicas e anátomo-patológicas (macroscópica), realizadas nos animais tratados com veículo (controle) ou com as diversas doses do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 (50, 500 e 5.000µg/kg), por via oral, durante 90 dias consecutivos, detectaram alterações pontuais em alguns desses parâmetros, demonstrando que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, quando administrado por um período prolongado em camundongos de ambos os sexos, apresenta reduzidos sinais de toxicidade, principalmente para as maiores doses empregadas, em relação ao peso corporal e letalidade. A *non toxic adverse effect level* (NOAEL) para o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 situa-se entre as doses de 50 e 500µg/kg.

Ao dividirmos a NOAEL encontrada para o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 em camundongos pelo fator de segurança de 100, chegamos a uma IDA alocada entre 0,5 e 5µg/kg de peso corpóreo, ou seja, para uma pessoa de 70kg corresponderia a uma ingesta aproximada entre 35 e 350µg por dia do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, respectivamente.

Essa IDA alocada para o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 é menor que a IDA estabelecida para a nisina pura, tanto pela FAO/OMS, quanto pelo Comitê Científico em Alimentos da União Européia, que é de 821 e 130µg/kg de peso corpóreo, respectivamente. Logo, para uma pessoa de 70kg, corresponde a uma ingesta de aproximadamente 58 e 9mg de nisina pura por dia pela FAO/OMS e pelo Comitê Científico em Alimentos da União Européia, respectivamente.

Levando-se em consideração a IDA para a nisina pura estabelecida pelo Comitê Científico em Alimentos da União Européia, o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresenta uma IDA alocada aproximadamente 26 a 260 vezes menor.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresenta atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, porém não é ativo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não é genotóxico para células VERO na concentração de 60µg/ml, porém apresenta genotoxicidade nas concentrações de 80 e 100 µg/ml.

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, quando administrado agudamente por via oral em ratos e camundongos, demonstra boa tolerabilidade e poucos efeitos tóxicos importantes, apresentando DL₅₀ superior a 2.000µg/kg e 5.000µg/kg de peso corpóreo, respectivamente.

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, quando administrado repetidamente durante 90 dias por via oral em camundongos, demonstra reduzidos sinais de toxicidade, apresentando uma NOAEL entre as doses de 50 e 500µg/kg.

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresenta um grande potencial como conservador natural de alimentos, dada sua marcante atividade antilisterial e sua relativa segurança toxicológica.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apesar do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 ter apresentado apenas atividade antilisterial, as demais enzimas e bacteriocinas produzidas por *Bacillus* spp. utilizadas no processamento de alimentos, podem ser uma nova alternativa para indústria na conservação de alimentos, necessitando ser submetidas tanto a ensaios de atividade antibacteriana quanto antifúngica, haja vista seu grande potencial como agentes antibacterianos e antifúngicos.

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresentou reduzidos efeitos tóxicos e boa tolerabilidade nos ensaios de toxicidade oral aguda e de dose repetida em ratos e camundongos, porém, torna-se necessário verificar seu comportamento utilizando outra espécie de mamífero não roedor, conforme preconizado pela legislação (BRASIL, 2004).

Ensaio utilizando diferentes metodologias de cromatografia, eletroforese e seqüenciamento serão necessárias para verificar se a(s) substância(s) antimicrobiana(s) presente(s) no extrato bruto já são conhecidas ou não, bem como estudos adicionais de seu(s) mecanismo(s) de ação(ões).

Serão também necessários estudos preditivos, utilizando vários microrganismos indicadores e diferentes tipos de alimentos para testar o extrato bruto ou a(s) substância(s) antimicrobiana(s) presente(s) nesse, com o objetivo de utilizá-lo(as) na indústria de alimentos.

Além de ser utilizado diretamente nos alimentos, o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresenta um grande potencial para ser utilizado na elaboração de biofilmes comestíveis, porém pesquisas nessa direção precisam ainda ser desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

ABATE, C. M. et al. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 249-252, 1999.

AHERN, M.; VERSCHUEREN, S.; SINDEREN, D. V. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. **FEMS Microbiology Letters**, Cork, v. 220, p. 127-131, 2003.

ASGHARI, S. M. et al. Acid-induced conformational changes in *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase: appearance of a molten globule like state. **Enzyme and Microbial Technology**, Tehran, v. 35, p. 51-57, 2004.

BARLOW, S. M. et al. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, Leicester, v. 40, p. 145-191, 2002.

BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on anthagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens***. 1993. 157 f. Doctor Thesis, University of Strathclyde, Glasgow.

BENNETT, J. C.; GOLDMAN, L. **Cecil: tratado de medicina interna**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 2668 p. v. 1 e 2.

BENKERROUM, N.; SANDINE, W. E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 71, n. 12, p. 3237-3245, 1988.

BHATTI, M.; VEERAMACHANENI, A.; SHELEF, L. A. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Detroit, v. 97, p. 215-219, 2004.

BHUNIA, A. K. et al. Antigenic property of pediocin Ach produced by *Pediococcus acidilactici* H. **Journal Applied of Bacteriology**, [S.l.], v. 69, p. 211-215, 1990.

BILLINGTON, S. J.; JOST, B. H.; SONGER, J. G. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, Arizona, v. 182, p. 197-205, 2000.

BONELLI, R. R. **Extração e caracterização de uma substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens***. 2001. 54 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BOUCABELLE, C. et al. Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. **FEMS Microbiology Letters**, Orsay, v. 153, p. 295-301, 1997.

BOZIARIS, I. S.; NYCHAS, G. J. E. Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. **Food Microbiology**, Atenas, v. 23, p. 779-784, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Determina a publicação do regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, anexo. **Diário Oficial**. Brasília, 2 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, anexo. **Diário Oficial**. Brasília, 18 de março de 2004.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, 1993.

BUYONG, L.; KOK, J.; LUCHANSKY, J. B. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4842-4845, 1998.

CDC – National Center for Infectious Diseases. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. **Frequently Asked Questions (on line)**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g.htm#howmany_cases> Acesso em: 10 maio 2008.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme technology**. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 264p.

CHERIF, A. et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. **Journal of Applied Microbiology**, Tunis, v. 95, p. 990-1000, 2003.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, Porto Alegre, v. 21, p. 53-58, 2004.

CLAYPOOL, L. et al. Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 49, p. 314-316, 1966.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 71, p. 1-20, 2001.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Os princípios éticos da experimentação animal**. São Paulo, 1991. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>>. Acesso em: 20 fevereiro 2006.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, Alberdeen, v. 375, p. 183-193, 1997.

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

DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 164-167, 1989.

DA SILVA, A. G. Propriedades gerais dos herpesvírus. *In*: LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. **Herpes** - clínica, diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p. 1-14.

DAVIES, E. A. et al. Research note: the effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. **Letters in Applied Microbiology**, [S.l.], v. 27, n. 3, p. 186-187, 1998.

DAWSON, R. M. C. et al. **Data for Biochemical Research**. 2. ed. London: Oxford, p. 489. 1969.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Internacional Dairy Journal**, Cork, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. **Journal of Society of Dairy Technology**, [S.I.], v. 43, n. 3, p. 73-76, 1990a.

_____. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technology**, [S.I.], v. 44, n. 11, p. 100-117, 1990b.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, [S.I.], v. 18, n. 2 & 3, p. 191-208, 2002.

DIELBANDHOESING, S. K. et al. Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Vlaardingen, v. 64, n. 1, p. 4047-4052, 1998.

DRIDER, D. et al. The continuing story of class II bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nantes, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DRIESSEN, A. J. M et al. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. **Biochemistry**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1606-1614, 1995.

DUC, L. H. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and Environmental Microbiology**, Egham, v. 70, n. 4, p. 2161-2171, 2004.

EAPEN, K. C.; SANKARAN, R.; VIJAYARAGHAVAN, P. K. The present status on the use of nisin in processed foods. **Journal of Food Science and Technology**, [S.I.], v. 20, n. 5, p. 231-240, 1983.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. **FEMS Microbiology Letters**, Freising, v. 232, p. 189-195, 2004.

EIJSSINK, V. G. H. et al. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, New Jersey, v. 64, n. 9, p. 3275-3281, 1998.

ENO, A. E.; KONYA, R. S.; IBU, J. O. Biological properties of a venom extract from the sea anêmona, *Bunodosoma cavernata*. **Toxicon**, Calabar, v. 36, n. 12, p. 2013-2020, 1998.

FARBER, J. M. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of uncooked German, American and Italian-style fermented sausages. **Food Microbiology**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 123-132, 1993.

FARIAS, M. E.; HOLGADO, A. A. P. R.; SESMA, F. Bacteriocin production by lactic acid bacteria from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Milano, v. 57, n. 11, p. 1013-1015, 1994.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Generalidades e métodos de análise**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 360 p.

FDA - Food and Drug Administration. **Nisin preparation**: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. Federal Register, [S.l.], v. 53, 1988.

_____. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bad bug book (on line)**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap21.html>>. Acesso em: 12 mar. 2006.

_____. _____. _____. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap20.html>>. Acesso em: 12 de jan. 2007.

FERMANIAN, C. F.; WONG, A. C. L. Improved *in vitro* detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Madison, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2000.

FIELDS, F. O. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. **Journal of Food Protection**, Washington, p. 72-77, 1996.

FLEURY. **Manual de exames para médicos (on line)**. Disponível em: <http://www.FLEURY,1999.com.br/site/calandra.nsf/weHP/HPTsite_FLEURY,1999-0000>. Acesso em: 27 mar. 2006.

FOWLER, G. G. The potential of nisin. **Food Manufacture**, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 57-59, 1979.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182p.

FRANKL, V. L. **Em busca de sentido: um psicólogo no campo de concentração**. Petrópolis: Vozes, 1991. 136p.

FRAZER, A. C.; SHARRATT, M.; HICKMAN, J. R. The biological effects of food additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.l.], v. 13, p. 32-42, 1962.

FURMANEK, T. et al. Identification, characterization and purification of the lantibiotic staphylococcin T, a natural gallidermin variant. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 6, p. 856-866, 1999.

GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, Alberta, v. 84, p. 577-592, 2002.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, Sfax, v. 32, p. 513-518, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-listeria factors in dairy technology. **Food Microbiology**, Lodi, v. 12, p. 291-299, 1995.

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

GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. A. Multiplicação e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* sob condições ecológicas desfavoráveis. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 139, 2006.

HAGELIN, G. et al. Preparative high-performance liquid chromatographic separation and analysis of the Maltacine complex – a family of cyclic peptide antibiotics from *Bacillus subtilis*. **Journal of Chromatography B**, Oslo, v. 811, p. 243-251, 2004.

HARA, S. et al. An investigation of toxicity of nisin with a particular reference to experimental studies of its oral administration and influences by digestive enzymes. **Journal of Tokyo Medical Collection**, [S.l.], v. 20, p. 176-207, 1962.

HARBAK, L.; THYGESEN, H. V. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food and Chemical Toxicology**, Brabrand, v. 40, p. 1-8, 2002.

HARDY, S. P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. **FEMS Microbiology Letters**, Oslo, v. 197, p. 47-51, 2001.

HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Sensivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. **Journal of Food Protection**, [S.l.], v. 54, n. 11, p. 836-840, 1991.

_____. Developments in nisin research. **Food Research International**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 57-66, 1992.

HAZELWOOD, D.; McLEAN, A. C. **Manual de higiene para manipuladores de alimentos**. São Paulo: Varela, 1994. 140p.

HE, L.; CHEN, W.; LIU, Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological Research**, Hangzhou, v. 126, n. 4, p. 321-326, 2006.

HECK, J. X. et al. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process Biochemistry**, Porto Alegre, v. 40, p. 107-112, 2005.

HENNING, S.; METZ, R.; HAMMES, W. P. New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 135-141, 1986a.

_____. Studies on the mode of action of nisin. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 121-134, 1986b.

HELMERHORST, E. J. et al. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 449, p. 105-110, 1999.

HEWITT, C. J.; SOLOMONS, G. L. The production of α -amylase (E.C.3.2.1.1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally defined synthetic culture medium. **Journal of Industrial Microbiology**, Basingstoke, v. 17, n. 2, p. 96-99, 1996.

HIRSCH, A. et al. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. **Journal of Dairy Research**, [S.I.], v. 18, p. 205, 1951.

HOFFMANN, A. et al. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. **IL Farmaco**, Bonn, v. 57, n.8, p. 685-691 2002.

HOLLEY, R. A. Review of the potential hazard from botulism in cured meats. **Canadian Institute of Food Science Technology Journal**, [S.I.], v. 14, n. 3, p. 183-195, 1981.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, [S.I.], v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. New York: Springer-Verlag, 2005. 790p.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5. ed. London: Chapman & Hall, 1996. 661p.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R. et al. Purification and partial aminoacid sequence of Plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. **Applied and Environmental Microbiology**, Norway, v. 61, n. 12, p. 4459-4463, 1995.

KAISER, A. L.; MONTVILLE, T. J. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4529-4535, 1996.

KALMOKOFF, M. L.; TEATHER, R. M. Isolation and characterization of a bacteriocin (Butyrivibriocin AR10) from the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Nebraska, v. 63, n. 2, p. 394-402, 1997.

KEROUANTON, A. et al. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1-2, p. 61-71, 1998.

KIM, W. J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. **Food Reviews International**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 299-313, 1993.

KIM, P. I.; CHUNG, K-C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters**, Kwangiu, v. 234, p. 177-183, 2004.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, [S.l.], v. 70, p. 337-349, 1988.

_____. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-86, 1993.

KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, Stockholm, v. 363, p. 89-96, 1996.

KLEIN, C.; ENTIAN, K. D. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 2793-2891, 1994.

KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Community**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 103-115, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152p.

LINDSAY, D. et al. Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus* spp. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 364-369, 2000.

LISBOA, M. P. et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 111-118, 2006.

LIU, W.; HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 56, n. 8, p. 2551-2558, 1990.

LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M. L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 245-250, 1995.

MAES, P. R. **Colonização Flamengo em Santa Catarina**: Ilhota. Itajaí: Ed. do autor, 2005. 96p.

MAGNUSSON, J. et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Uppsala, v. 219, n. 1, p. 129-135, 2003.

MAMO, G.; GESSESSE, A. Effect of cultivation conditions on growth and α -amylase production by a thermophilic *Bacillus* sp. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 61-65, 1999.

MARTH, E. H. Extending shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 2, p. 57-62, 1998.

MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. **FEMS Microbiology Letters**, Asturias, v. 252, p. 67-72, 2005.

MARTIRANI, L. et al. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, Isernia, v. 1, p. 1-5, 2002.

MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. **Food Biotechnology**, New York, v. 5, n. 3, p. 305-312, 1991.

McLAUHLIN, L. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. A review. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 1-11, 1987.

McMULLEN, L. M.; STILLES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal of Food Protection**, Washington, p. 64-71, 1996.

MIYAMAE, Y. et al. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Research**, Osaka, v. 418, p. 131-140, 1998.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 76, n. 1, p. 185-198, 1999.

MONTVILLE, T. J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unsolved questions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 50, n. 5, p. 511-519, 1998.

MORCEL C.; BIEDERMANN, K. Coupling of fermentation and microfiltration for α -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 57-62, 1994.

MORENO, I. et al. Efeito e modo de ação das bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F.F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 130-136, 1999.

MOTTA, A. S.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 307-310, 2004.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, Washington, v. 59, p. 54-86, 1996.

NACLERIO, G. et al. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4313-4316, 1993.

NAVARATNA, M. A. D. B.; SAHL, H G.; TAGG, J. R. Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4803-4808, 1998.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. **Guideline for testing of chemicals**. Acute Oral Toxicity – 401, 7p., 1987.

_____. _____. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents - 408, adopted Sept., 1998a.

_____. _____. Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Principles on Good Laboratory Practice - 1, p. 1-41, 1998b.

_____. _____. Acute oral toxicity. Fixed Dose Procedure - 420, p. 1-14, 2001a.

_____. _____. _____. Acute toxic class method - 423, p. 1-14, 2001b.

OH, J. S.; KIM, B-G.; PARK, T. H. Importance of specific growth rate for subtilisin expression in fed-batch cultivation of *Bacillus subtilis spollG* mutant. **Enzyme and Microbiological Technology**, Seoul, v. 30, p. 747-751, 2002.

OJCIUS D. M.; YOUNG, J. D. E. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif. **Trends in Biochemical Sciences**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 225-229, 1991.

OLIVEIRA, A. N. et al. Ocorrência de bactérias do gênero *Listeria* em leite cru e pasteurizado em Goiânia, Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 55-58, 1998.

OSCÁRIZ, J. C.; LASA, I.; PISABARRO, A. G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 178, n. 2, p. 337-341, 1999.

PABLO, M. A. et al. Evaluation of immunomodulatory effects of nisin-containing diets on mice. **FEMS Microbiology Letters**, Jaén, v. 24, p. 35-42, 1999.

PALMER, M. Cholesterol and activity of bacterial toxins. **FEMS Microbiology Letters**, Waterloo, v. 238, p. 281-289, 2004.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: byosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, Thessaloniki, v. 21, n. 1, p. 465-499, 2003.

PARIZA, M. W.; FOSTER, E. M. Determining the safety of enzymes used in food processing. **Journal of Food Protection**, [S.l.], v. 46, p. 453-463, 1983.

PASTER, N. et al. Possible synergistic effect of nisin and propionic acid on the growth of the mycotoxigenic fungi *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium moniliforme*. **Journal of Food Protection**, Bet Dagan, v. 62, n. 10, p. 1223-1227, 1999.

PATTNAIK, P.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. **Microbiology Research**, Haryana, v. 160, p. 213-218, 2005.

PEDERSEN, P. B. et al. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Bagsvaerd, v. 36, p. 155-161, 2002.

PERO, J.; SLOMA, A. Proteases. In: ***Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria**. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch e R. Losick (eds.). Washington: D.C., p. 939-952, 1993.

PHELPS, R. J.; MCKILLIP, J. L. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, Louisiana, v. 68, n. 6, p. 3147-3151, 2002.

PIARD, J. C. et al. Purification and parcial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNR 481. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 279-284, 1992.

PIARS, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substance. **Lait**, [S.l.], v. 72, p. 113-142, 1992.

POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Vila Real, v. 58, n. 3, p. 412-414, 2005.

PORTNOY, D. A. et al. Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. **Infection and Immunity**, [S.l.], v. 60, p. 2710-2717, 1992.

PRIEST, F. G. Systematics and Ecology of *Bacillus*. In: ***Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria***. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, R. Losick (eds.). Washington: D.C., p. 3-16, 1993.

RICHARD, C. et al. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. **Food Microbiology**, Nantes, v. 23, p. 175-183, 2006.

ROBERTS, R. F.; ZOTTOLA, E. A.; MICKAY, L. L. Use of nisin-producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. **Journal of Dairy Science**, [S.I.], v. 75, n. 9, p. 2353-2363, 1992.

ROGERS, L. A. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, [S.I.], v. 16, n. 2, p. 321-325, 1928.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Review: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, [S.I.], v. 722, p. 225-254, 1999.

SAHL, H. G. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. In: JUNG, J.; SAHL, H. G. (Ed.) **Nisin and novel lantibiotics**. Leiden: Escom, p. 347-358, 1991.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. 3 ed. New York: CSHL Press, 2001. 2100p.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food Microbiology**, London, v. 16, n. 5, p. 465-477, 1999.

SANT-LANG, W. et al. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Taiwan, v. 31, p. 321-328, 2002.

SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, Hachinohe, v. 519, p. 103-119, 2002.

SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidante de compostos fenólicos**. 2004. 70 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHULZ, D. **Isolamento e caracterização da substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens***. 2000. 20 f. Relatório Final de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/BIP, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHULZ, D. **Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade**. 2003. 68 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.

SHEPARD, L. A. et al. Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. **Biochemistry**, [S.I.], v. 37, p. 14563-14574, 1998.

SILVA, J. et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, León, v.40 p.941-947, 2002.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, [S.I.], v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SIMONEN, M.; PALVA, I. Protein secretion in *Bacillus* species. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, n. 1, p. 109-137, 1993.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Baltimore, v. 175, p. 184-191, 1988.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. M. **Yeast: their lives in natural and artificial habitats**. New York: Springer-Verlag, 1997. 381p.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacterocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, [S.I.], v. 40, p. 722-756, 1976.

TICE, R. R. et al. Single Cell Gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, North Carolina, v.35, p. 206-221, 2000.

TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. **Enzymes in food processing**. 2nd ed. London: Aspen Publ., 1995. 319p.

WAITE, B. L.; SIRAGUSA, G. R.; HUTKINS, R. W. Bacteriocin inhibition of two glucose transport system in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, Nebraska, v. 84, n. 5, p. 715-721, 1998.

WELKER, N. E.; CAMPBELL, L. L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 94, n. 4, p. 1124-1130, 1967a.

_____. Comparison of the α -amilase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 94, n. 4, p. 1131-1135, 1967b.

WESSELS, S.; JELLE, B.; NES, I. **Bacteriocins of the lactic acid bacteria: an overlooked benefit for food**. 1. ed. Horsholm: CHR Hansen, 1998. 85p.

WINER, B. J. **Statistical principles in experimental design**, 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1971.

YU, G. Y. et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology & Biochemistry**, Urbana, v. 34, p. 955-963, 2002.

ZAMFIR, M. et al. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 6, p. 923-931, 1999.

ZHENG, G.; SLAVIK, M. F. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **The Society for Applied Microbiology**, Arkansas, n. 28, p. 363-367, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Atividade antimicrobiana e hemolítica do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 115-117, 2004.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO PRODUZIDO POR *Bacillus amyloliquefaciens**

Denys SCHULZ*
Murilo Anderson PEREIRA**
Márcia Menezes NUNES**
Cleide Rosana Vieira BATISTA**

- **RESUMO:** Avaliou-se a atividade antimicrobiana e hemolítica do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, a ser utilizado como bioconservador em alimentos, previamente padronizado pela dosagem de proteínas; a qual foi quantificada pelo halo de hemólise e inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* NCTC 098630. As concentrações de proteína responsáveis por 50% da atividade antimicrobiana e hemolítica máxima foram de 22,54 e 20,88 mg (de proteína), respectivamente, sugerindo que a substância antimicrobiana presente no extrato bruto seja relacionada, também com a atividade hemolítica.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Atividade antimicrobiana; atividade hemolítica; *Bacillus amyloliquefaciens*.

Introdução

A contaminação de alimentos é um problema sério que causa grandes índices de morbidade. Já existem muitas tecnologias de conservação disponíveis, mas nenhuma delas assegura completamente a qualidade microbiológica dos alimentos. Com isso, fica evidente a necessidade de se desenvolver um número cada vez maior de alternativas de conservação para que, aliadas às tecnologias já existentes, seja possível disponibilizar para a população alimentos de qualidade, cada vez melhor e mais seguros, do ponto de vista microbiológico e toxicológico.⁶

O uso de bioconservadores em alimentos tem sido amplamente difundido e, desde os anos 50 é relatada a habilidade de várias espécies bacterianas, inclusive *Bacillus*, produzir substâncias com atividade antimicrobiana, como: subtilisinas, proteases, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas, dentre outras.^{3,5,11}

Os bioconservadores podem significar segurança para o consumidor, economia e uma alternativa na conservação de alimentos para as indústrias.⁸

Batista¹ verificou que a célula de *Bacillus amyloliquefaciens* produz uma substância capaz de inibir o

desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. De acordo com os resultados obtidos, a inibição não parece ser devida à produção de ácidos ou peróxido de hidrogênio, tampouco à exaustão de nutrientes. Em continuidade a esses estudos, o presente trabalho teve como objetivo quantificar a atividade antimicrobiana e hemolítica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*, baseado em seu perfil protéico, com intuito de utilizá-lo como um conservador natural de alimentos.

Material e métodos

Dosagem de proteínas do extrato bruto

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foi obtido por técnicas de precipitação, centrifugação, diálise e esterilização por filtração.^{2,14,15}

A padronização da atividade antimicrobiana do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* foi realizada pela determinação da concentração de proteínas utilizando o Kit de Ensaio para Dosagem de Proteínas Totais (Análise Diagnóstica - Método de Biureto) por comparação com padrão de albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Micronal B382) a 545 nm.

Quantificação da atividade antimicrobiana e hemolítica do extrato bruto

A quantificação da atividade antimicrobiana e hemolítica do extrato bruto foi realizada utilizando placas de Ágar Sangue (AS), previamente semeadas com 0,1 mL de *Listeria monocytogenes* na concentração de 10⁵ UFC/mL, com auxílio de uma alça de Drigalski.^{14,15}

Para quantificação da atividade antimicrobiana e hemolítica em profundidade foram utilizados 0,8; 3,3; 6,5; 9,8 e 13,0 µL do extrato bruto em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 contendo 5; 20; 40; 60 e 80 µg de proteína, respectivamente. O volume final aplicado em cada poço teste das placas foi padronizado em 80 µL, logo todos os volumes pipetados do extrato bruto e nisina (exceto na

* Trabalho elaborado com auxílio financeiro do Núcleo de Microbiologia de Alimentos do CAL (NUMICAL).

** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CAL - Centro de Ciências Agrárias - CCA - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC - Itacorubi - 88034-001 - Florianópolis - SC - Brasil.

concentração de 80 µg) foram completados com tampão fosfato para 80 µL. Como controle positivo foi utilizado uma solução de nisina comercial (Nisaplin) em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2, contendo 1 mg de nisina/mL. Dessa solução estoque utilizou-se 5; 20; 40; 60 e 80 µL contendo 5; 20; 40; 60 e 80 µL de nisina, respectivamente. As placas semeadas foram incubadas a 35°C por 24 h. A atividade antimicrobiana e hemolítica foi quantificada pela medida do raio do halo de inibição, haja vista a necessidade da utilização de poços no ágar para inoculação em profundidade.^{1, 2, 14, 15}

Análise estatística

Os resultados obtidos foram ajustados por análise de regressão não linear, pelos programas SAS® versão 6.12 e Microsoft® Excel 2000, versão 9.0.2812. O teste de separação de médias utilizado foi o teste F ao nível de significância de 5%. Os resultados apresentados correspondem à média de três ensaios independentes, cada um em triplicata.

Resultados e discussão

Quantificação da atividade antimicrobiana e hemolítica do extrato bruto

Para comparação dos resultados da atividade antimicrobiana com os da atividade hemolítica, utilizou-se como referência a concentração de proteína do extrato bruto responsável por 50% (X_{50}) da atividade antimicrobiana e hemolítica máxima, respectivamente. O (X_{50}) foi calculado utilizando-se a melhor equação da reta para o fenômeno observado. Os resultados observados para o extrato bruto (nomeado substância na legenda dos gráficos) e nisina são os dados constatados no laboratório e os estimados são os calculados com a equação da reta.

Frente a essas observações constatou-se que com uma concentração de $X_{50}=22,54$ µg do extrato bruto obteve-se uma atividade antimicrobiana de 50% com um halo de inibição de aproximadamente 2 mm. Em contrapartida, a nisina não apresentou halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas conforme Figura 1.

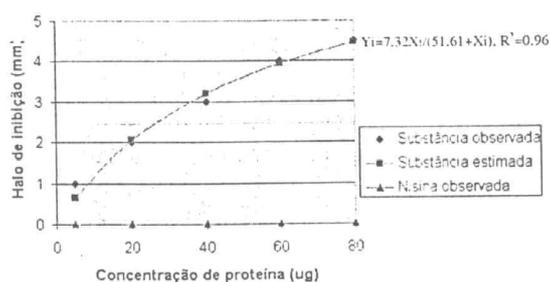


FIGURA 1 – Atividade antimicrobiana do extrato bruto e nisina comercial (Nisaplin) em placas de AS incubadas a 35°C por 24 h, utilizando *Listeria monocytogenes* como microrganismo indicador.

Com uma concentração de $X_{50}=20,88$ µg do extrato bruto obtemos uma hemólise de 50% com um halo de aproximadamente 3 mm. Em contrapartida, a nisina apresentou um halo de hemólise de 0,7 mm em todas as concentrações testadas conforme Figura 2.

Segundo Fermanian & Wong⁴, *Bacillus cereus* produz a hemolisina BL, que é composta de três proteínas distintas B, L1 e L2; as quais quando combinadas são hemolíticas, enterotoxigênicas, dermonecroticas e citotóxicas para vários tipos de células e tecidos.

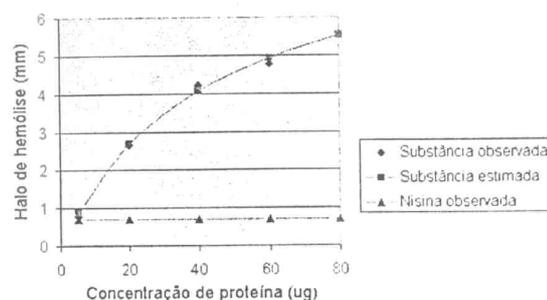


FIGURA 2 – Atividade hemolítica do extrato bruto e nisina comercial (Nisaplin) em placas de AS incubadas a 35°C por 24 h.

Um estudo realizado por Peðersen et al.¹⁰, que investigaram o potencial citotóxico de cepas industriais de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, concluiu que essas cepas são seguras para uso, não existindo uma correlação clara entre as toxinas produzidas por *Bacillus cereus* e as outras espécies de *Bacillus* estudadas.

Segundo Jack et al.⁵, as bacteriocinas termolábeis de alto peso molecular (classe III de Klaenhammer - >30 kDa) incluem muitas enzimas extra-celulares bacteriolíticas (hemolisinas e muramidases) que podem mimetizar as atividades fisiológicas das bacteriocinas.

Com a emergência de microrganismos psicrófilos em alimentos, o desenvolvimento de novas tecnologias e a procura dos consumidores por alimentos naturais, tem-se visto os bioconservadores como uma potencial fonte para tal finalidade.⁹

Frente a essa realidade, os resultados indicam que o uso do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* como um bioconservador é muito promissor, principalmente porque *Listeria monocytogenes* é capaz de causar doenças invasivas sérias, especialmente em hospedeiros imunodeprimidos, recém-nascidos e fetos, sendo determinado tolerância zero para esse patógeno em alimentos de vários países, incluindo os Estados Unidos.^{3, 7, 13}

Serão necessários estudos futuros da toxicidade aguda, sub-crônica e crônica *in vivo* do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, haja vista que a natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas faz com que essas substâncias sejam facilmente degradadas no

trato gastrointestinal do homem e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade.¹²

Conclusão

O extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou concentração protéica frente ao comportamento dose-resposta nos ensaios de atividades antimicrobiana e hemolítica, haja vista que com o aumento na concentração de proteínas do extrato bruto, observou-se também um acréscimo nas atividades antimicrobiana e hemolítica. As concentrações de proteína responsáveis por 50% da atividade antimicrobiana e hemolítica máxima foram de 22,54 e 20,88 µg (de proteína), respectivamente, sugerindo que a substância antimicrobiana presente no extrato bruto seja relacionada, também com a atividade hemolítica.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Antimicrobial and hemolytic activity of crude extract produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 115-117, 2004.

■ **ABSTRACT:** The antimicrobial and hemolytic activity of the crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* was evaluated to be used as food preservative. This activity was standardized by the measure of proteins; which was quantified by the hemolysis and inhibition zone of the growth of *Listeria monocytogenes* NC^TC 098630. Results of this study showed that the concentration responsible for 50% of the antimicrobial and hemolytic activity was relatively close: 22.54 and 20.88 µg of protein, suggesting that antimicrobial substance present in the crude extract is also connected with the hemolytic activity.

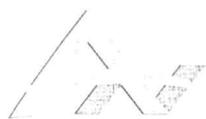
■ **KEYWORDS:** Antimicrobial activity; hemolytic activity; *Bacillus amyloliquefaciens*.

Referências bibliográficas

- BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on antagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens***. 1993. 157 f. Tese (Doutorado), University of Strathclyde, Glasgow, 1993.
- BONELLI, R. R. **Extração e caracterização de uma substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens***. 2001. 54 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, p. 1-20, 2001.
- FERMANIAN, C. F.; WONG, A. C. L. Improved *in vitro* detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2000.
- JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.
- JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th ed. London: Aspen Publ., 2000. 620p.
- KEROUANTON, A. et al. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 43, n. 1-2, p. 61-71, 1998.
- MORENO, I. et al. Efeito e modo de ação das bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.
- MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F.F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Rev. Microbiol.*, v. 30, n. 2, p. 130-136, 1999.
- PEDERSEN, P. B. et al. Cytotoxic potencial of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 36, p. 155-161, 2002.
- PERO J.; SLOMA, A. Proteases. In: SONENSHIEIN, A. L.; HOCHIE, J. A.; LOSICK, R. (Ed.). ***Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria**. Washington, D.C., American Society, 1993. p. 939-952.
- PIARD, J. C. et al. Purification and parcial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNR 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, p. 279-284, 1992.
- SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiol.*, v. 16, n. 5, p. 465-477, 1999.
- SCHULZ, D. **Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- SCHULZ, D. Isolamento e caracterização da substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSC, 10., 2000, Florianópolis. **Anais...** Canoas: Salle, 2000. p. 406.

APÊNDICE B

SCHULZ, D.; SIMÕES, C. M. O.; FRÖHNER, C. R. A.; GABILAN, N. H.; BATISTA, C. R. V. Citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a hemácias de carneiro e células VERO. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 145-151, 2005.



CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE *Bacillus amyloliquefaciens* FRENTE A HEMÁCIAS DE CARNEIRO E CÉLULAS VERO*

Denys SCHULZ **

Cláudia Maria Oliveira SIMÕES*****

Carla Regina Andrighetti FRÖHNER****

Nelson Horacio GABILAN*****

Cleide Rosana Vieira BATISTA**

■ **RESUMO:** Avaliou-se a citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra hemácias de carneiro e células Vero. O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foi obtido por técnicas de precipitação, centrifugação, diálise e esterilização por filtração. O extrato bruto apresentou uma concentração hemolítica 50% em tubos na concentração de 11,43 µg de proteína numa suspensão de eritrócitos de carneiro e uma concentração citotóxica 50% na concentração de 32,14 µg de proteína em células Vero. Os resultados obtidos indicam que o extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou efeito citotóxico tanto contra hemácias de carneiro como em células Vero.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** *Bacillus amyloliquefaciens*; antimicrobianos; citotoxicidade.

Introdução

O uso de bioconservadores em alimentos tem sido amplamente difundido e, desde os anos 50 é relatada a capacidade de várias espécies bacterianas, inclusive *Bacillus*, produzirem substâncias com atividade antimicrobiana, como: subtilisinas, proteases, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas, dentre outras.^{6, 10, 11, 17}

Os bioconservadores podem significar segurança para o consumidor, economia e uma alternativa na conservação de alimentos para as indústrias.¹⁴

Um dos métodos para o controle de microrganismos patogênicos em alimentos consiste na adição de bacteriocinas. As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos de origem bacteriana capazes de inibir cepas ou espécies que são, geralmente, taxonomicamente relacionadas à bactéria produtora. O mecanismo de ação das bacteriocinas

sobre células vegetativas não está totalmente esclarecido, mas envolve ação sobre a membrana celular, pela formação de poros. Atualmente, muitas bacteriocinas têm sido isoladas de bactérias do gênero *Bacillus*. Algumas bacteriocinas de alto peso molecular incluem enzimas extra-celulares bacteriolíticas (hemolisinas) que podem mimetizar as atividades fisiológicas das bacteriocinas. Muitas dessas hemolisinas pertencem à família das citolisinas tiol-ativas, que é um grupo proeminente de toxinas microbianas. Várias espécies do gênero *Bacillus* são produtoras dessas hemolisinas as quais são citotóxicas e provocam a lise tanto de células eucariontes quanto de procariontes pela formação de poros na membrana.^{6, 15, 19}

Batista¹ verificou que *Bacillus amyloliquefaciens* produz uma substância capaz de inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. Assim podemos afirmar que *Bacillus amyloliquefaciens* tem atividade antimicrobiana. De acordo com os resultados obtidos, a inibição não parece ser devida à produção de ácidos ou peróxido de hidrogênio, tampouco à exaustão de nutrientes. Em continuidade a esses estudos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra hemácias de carneiro e células Vero, baseado em seu perfil protéico, com intuito de utilizá-lo como um conservador natural de alimentos.

Material e métodos

Dosagem de proteínas do extrato bruto

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foi obtido por técnicas de precipitação de proteínas, centrifugação, diálise e esterilização por filtração conforme Figura 1.²⁰

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor, em 2003, no curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC - Brasil. Trabalho elaborado com auxílio financeiro da CAPES, sob a forma de Bolsa de Mestrado e dos departamentos MIP, CAL e BQA da Universidade Federal de Santa Catarina.

** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina - 88034-001 - Florianópolis - SC - Brasil.

*** Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 - Florianópolis - SC - Brasil.

**** Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 - Florianópolis - SC - Brasil.

***** Departamento de Bioquímica - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 - Florianópolis - SC - Brasil.

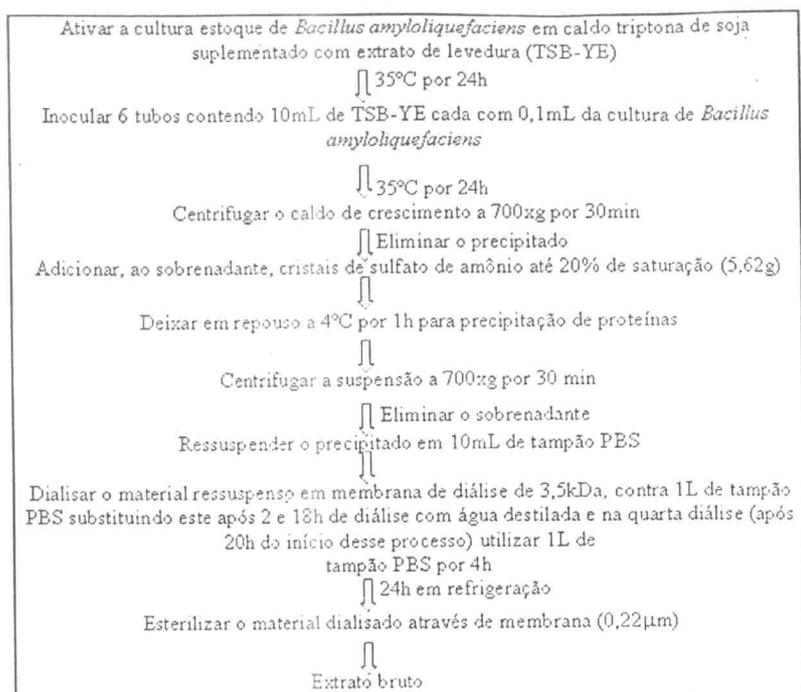


FIGURA 1 - Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Para os testes em hemácias de carneiro o extrato bruto foi extraído em tampão PBS e para os testes em células Vero o extrato bruto foi extraído em água. Foram feitas várias extrações e a mistura delas deu origem a pools que foram concentrados por liofilização.

A padronização do teste de atividade citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foi realizada pela determinação da concentração de proteínas utilizando o Kit de Ensaio para Dosagem de Proteínas Totais (Análise Diagnóstica - Método de Biureto) por comparação com padrão de albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Micronal B382) a 545 nm.

Ação citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra hemácias de carneiro

A ação citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra hemácias de carneiro foi realizada pela técnica de hemólise em tubos contendo sangue de carneiro desfibrinado (Newprov) ao qual foi adicionado extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* em diferentes concentrações de proteína. Inicialmente, os eritrócitos foram separados do plasma, lavando o sangue 3 ou 4 vezes, até a ausência de hemólise com tampão PBS. A cada lavagem, o sangue foi centrifugado a 420 x g por 10 min. Uma suspensão de eritrócitos (3%) foi preparada e padronizada para quando em hemólise total, apresentar uma absorbância aproximada de 0,600 em 540 nm. Cem microlitros (100 µL) da suspensão de eritrócitos foram incubados com

diferentes concentrações do extrato bruto e nisina comercial (Nisaplin) em Banho-Maria a 37°C por 30 min. Para o estudo foram utilizados 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 15; 18; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 µL do extrato bruto em tampão PBS contendo 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 15; 18; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 µg de proteínas, respectivamente. A atividade hemolítica do extrato bruto foi comparada com a nisina comercial (Nisaplin), por ser essa a única bacteriocina utilizada comercialmente na conservação de alimentos. A partir de uma solução estoque de Nisaplin contendo 1000 µg de nisina/mL em tampão PBS foram utilizados 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 15; 18; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 µL contendo 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 15; 18; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 µg de nisina, respectivamente. Ao final do tempo de incubação, 800 µL de tampão PBS foram adicionados e as amostras foram centrifugadas a 420 x g por 10 min. As absorbâncias dos sobrenadantes que indicam a quantidade de hemoglobina liberada foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm.²

Determinação de unidade hemolítica (UH)

Diferentes concentrações de proteínas do extrato bruto (1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 15; 18; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 µg de proteínas) foram testadas sobre uma suspensão de eritrócitos de carneiro a 3% e a atividade hemolítica determinada em porcentagem de hemólise. Curva de concentração (µg de proteína e nisina) versus porcentagem de hemólise foi construída e a concentração das amostras

(extrato bruto e nisina) necessária para produzir 50% de hemólise, conhecida como concentração hemolítica 50% ou concentração efetiva 50% (EC_{50}), correspondeu a uma unidade hemolítica (1 UH). Foram utilizados 25 μ L de SDS 0,1% v/v para obter 100% de hemólise.⁸

Ação citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra células Vero

A ação citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foi investigada através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium]). Esse ensaio visa quantificar as células renais viáveis que são capazes de metabolizar o MTT a um composto denominado formazan e, assim, obter informações sobre a citotoxicidade. A atividade citotóxica do extrato bruto contra células Vero foi comparada com a nisina comercial (Nisaplin), por ser essa a única bacteriocina utilizada comercialmente na conservação de alimentos. O ensaio colorimétrico com MTT foi realizado segundo Takeuchi; Baba e Shigeta²², com algumas modificações propostas por Sieuwerts et al.²¹, onde as células renais de macaco verde africano (linhagem de células Vero, ATCC-CCL 81, que são culturas contínuas de fibroblastos de *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas no meio 199 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco BRL) e 100 unidades por mililitro (U/mL) de estreptomicina/penicilina/fungizona (Gibco BRL), sendo incubadas a 37°C por 24 h, 5% de CO_2 e 95% de O_2 . Para manutenção das células foi utilizado somente 1,5% de SFB.

As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades (2×10^4 células/100 μ L/cavidade). Após 24 h de incubação em estufa a 37°C, 5% de CO_2 e 95% de O_2 , os tapetes celulares estavam confluentes. O meio de cultura da placa foi descartado por aspiração. Em seguida adicionou-se a essa 200 μ L do meio 199 sem SFB, contendo o extrato bruto ou a nisina comercial (Nisaplin). Para o estudo foram utilizados 1; 3; 10; 30; 60; 80 e 100 μ L do extrato bruto (liofilizado) em meio 199 sem SFB contendo 1; 3; 10; 30; 60; 80 e 100 μ g de proteínas, respectivamente. A partir de uma solução estoque de Nisaplin contendo 1000 μ g de nisina/mL em meio 199 sem SFB foram utilizados 1; 3; 10; 30; 60; 80 e 100 μ L contendo 1; 3; 10; 30; 60; 80 e 100 μ g de nisina, respectivamente. Em seguida, as placas foram incubadas durante 4 dias, em estufa a 37°C, 5% de CO_2 e 95% de O_2 , e no quarto dia, o meio de cultura da placa foi descartado por aspiração. Em seguida, foram adicionados 50 μ L da solução do MTT (1,0 mg/mL em meio 199). em todas as cavidades das placas, e essas foram incubadas a 37°C por 4 h. Após incubação, o meio mais MTT foi removido de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células e 100 μ L de DMSO (Dimetilsulfóxido - Merck) foram adicionados, em todas as cavidades, para solubilizar o formazan. Em seguida, as placas foram agitadas, levemente, a temperatura ambiente, por 7 min, para que todo o formazan fosse solubilizado, sendo posteriormente

lidas a 540 nm em leitor tipo Elisa (Bio-Tek, EL₈₀₀).

As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares. Os valores da concentração citotóxica 50% em células Vero (CC_{50}) foram calculados a partir das porcentagens de células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão.

A disposição da placa de 96 cavidades utilizada para a determinação da citotoxicidade do extrato bruto e da nisina comercial é mostrada na Figura 2.

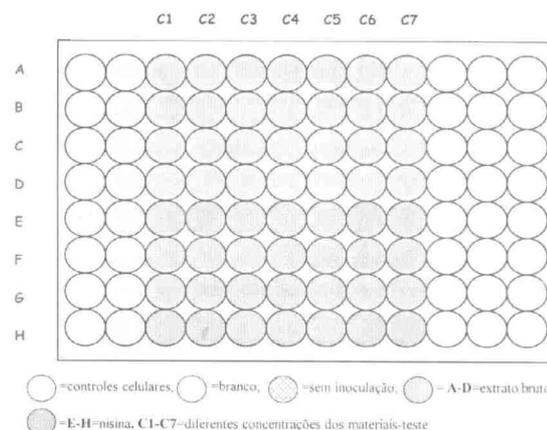


FIGURA 2 – Disposição da placa de microtitulação utilizada para determinação da citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e nisina comercial (Nisaplin), em células Vero. As concentrações variaram de 100 μ g (C1) a 1 μ g (C7).

Análise estatística

Os valores obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de regressão linear e não linear e função exponencial, utilizando o programa SAS®, versão 6.12 (Copyright© 1989-1996, SAS Institute Inc, Cary, NC 27513, USA). Os gráficos foram plotados utilizando o programa Microsoft® Excel 2000, versão 9.0.2812. O teste de separação de médias utilizado foi o teste F ao nível de significância de 5%. As equações ajustadas foram utilizadas para calcular a concentração responsável por 50% da atividade máxima obtida nos ensaios.

Os resultados do ensaio de atividade hemolítica em tubos para o extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foram ajustados utilizando regressão não linear, através da seguinte equação: $Y_i = aX_i/(b+X_i)$. Os resultados para a nisina comercial (Nisaplin) não foram ajustados, em função da baixa atividade hemolítica apresentada, não atingindo uma resposta de 50% de hemólise em nenhuma das concentrações testadas.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade em células Vero para o extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foram ajustados utilizando regressão linear, através da seguinte equação: $Y_i = a+bX_i$. Os resultados para a nisina

comercial (Nisaplin) foram ajustados utilizando uma função exponencial, através da seguinte equação: $Y = a \cdot b^x$. Em função da sensibilidade do leitor Elisa não ter sido capaz de detectar pequenas diferenças entre as absorbâncias obtidas nas menores concentrações testadas da nisina (1, 3 e 10 μg) e do controle celular (poder discriminatório) ou outra causa desconhecida, foi realizada a média de todas as absorbâncias, considerando essa a média das absorbâncias do controle celular. Já para o extrato bruto, foi realizada a média das absorbâncias nas menores concentrações testadas (1, 3 e 10 μg) e considerou-se essa como sendo a média das absorbâncias na concentração de 1 μg de proteína. Em contrapartida, foi realizada a média para as absorbâncias obtidas nas maiores concentrações (60, 80 μg 100 μg) e considerou-se essa média como sendo a média das absorbâncias na concentração de 60 μg de proteínas.

Resultados e discussão

Dosagem de proteínas do extrato bruto

Os dois *pools* de extratos brutos, um proveniente da mistura de extratos brutos obtidos em tampão e o outro proveniente da mistura de extratos brutos obtidos em água, apresentaram 611,52 e 491,23 μg de proteínas por mL, respectivamente. Os dois "pools" foram liofilizados e ressuspensos para uma concentração final de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A concentração de proteína dosada pelo método do Biureto foi utilizada na padronização da atividade antimicrobiana do extrato bruto devido à sua praticidade e sensibilidade. Para a nisina, não foi realizada a dosagem de proteínas, em função de ser a nisina comercial (Nisaplin); composta de rico material protéico. A concentração da nisina utilizada nos ensaios foi baseada nas informações fornecidas pelo fabricante.

Ação citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra hemácias de carneiro

Para calcular a concentração efetiva 50% (EC_{50}) capaz de hemolisar 50% de uma suspensão a 3% de eritrócitos de carneiro utilizou-se como referência a concentração de proteína do extrato bruto responsável por 50% (X_{50}) da atividade hemolítica máxima. A EC_{50} foi calculada utilizando-se a melhor equação da reta para o fenômeno observado. Os resultados observados para o extrato bruto (nomeado substância na legenda dos gráficos) e nisina são os dados constatados no laboratório e os estimados (substância estimada) são os calculados com a equação da reta.

Frente a essas observações o extrato bruto mostrou uma EC_{50} de 11,43 μg de proteína em eritrócitos de carneiro, o que corresponde a 1 UH. O extrato bruto apresentou uma atividade hemolítica de 1,87% e 99,94% numa concentração de 1 e 100 μg de proteína, respectivamente. Em contrapartida, a nisina apresentou uma atividade hemolítica

de 3,16% e 8,85% numa concentração de 1 e 100 μg nisina, respectivamente.

Os resultados para o extrato bruto foram ajustados pela seguinte equação: $Y_i = (107,93X_i) / (13,24 + X_i)$, com um $R^2 = 0,93$. Portanto, com uma concentração de $X_{50} = 11,43$ μg do extrato bruto obtemos uma hemólise de 50%. Todos os resultados de atividade hemolítica em tubos para o extrato bruto e nisina podem ser observados na Figura 3.

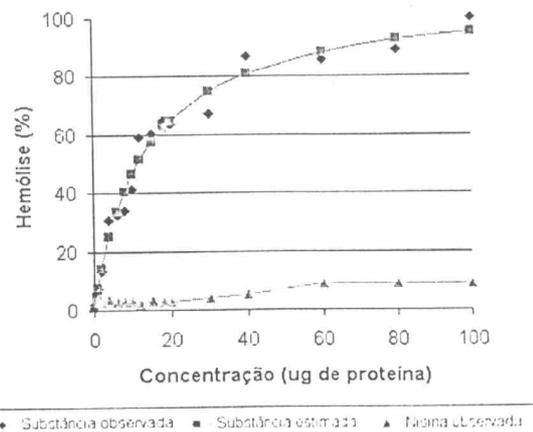


FIGURA 3 - Atividade hemolítica em tubos do extrato bruto (substância observada e substância estimada) e nisina comercial - Nisaplin (nisina observada) numa suspensão a 3% de eritrócitos de carneiro incubada a 37°C por 30 min. Os resultados apresentados correspondem a média de três ensaios independentes, cada um em triplicata.

Analisando os resultados de atividade hemolítica, podemos constatar que o extrato bruto na concentração de 100 μg de proteínas apresentou uma atividade hemolítica máxima (99,94%) em tubos maior (aproximadamente onze vezes) do que a nisina (8,85%) na concentração de 100 μg .

A atividade hemolítica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a hemácias de carneiro sugere que a substância antimicrobiana presente no mesmo seja relacionada, também com a atividade hemolítica e que essa tenha como alvo primário à membrana citoplasmática tanto em células procariontes quanto em células eucariontes. Tal resultado está de acordo com o observado pela substância antimicrobiana e hemolítica linenscina produzida pelo *Brevibacterium linens* OC2.⁵

Ação citotóxica do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra células Yero

Para calcular a CC_{50} , utilizou-se como referência a concentração de proteína do extrato bruto responsável por 50% (X_{50}) da atividade citotóxica máxima. A CC_{50} foi calculada utilizando-se a melhor equação da reta para o fenômeno observado. Os resultados observados para o

extrato bruto (nomeado substância na legenda dos gráficos) e nisina são os dados constatados no laboratório e os estimados são os calculados com a equação da reta.

O extrato bruto e a nisina comercial mostraram valores de CC_{50} de 32,14 μ g de proteína e 89,73 μ g de nisina, respectivamente. O extrato bruto apresentou viabilidade celular de 55,58 e 4,54%, nas concentrações de 30 e 60 μ g de proteína, respectivamente. Concentrações do extrato bruto superiores a 60 μ g de proteínas não mostraram diminuição da viabilidade das células Vero. Em contrapartida, a nisina comercial apresentou viabilidade celular de 94,73 e 16,36%, nas concentrações de 30 e 100 μ g de nisina, respectivamente.

Os resultados de citotoxicidade para o extrato bruto foram ajustados pela seguinte equação: $Y_i = 101,10 - 1,59X_i$, com um $R^2 = 0,99$. Portanto, com uma concentração de $X_{50} = 32,14$ μ g do extrato bruto obteve-se uma diminuição de 50% na viabilidade celular. A citotoxicidade para a nisina foi calculada pela variável $Y = 100 - (\text{Abs. } 100 / 0,56765)$ e ajustada pela seguinte equação: $Y = 0,564718 \cdot 1,0511599^X$, com um $R^2 = 0,96$ (Figura 4). Portanto, com uma concentração de $X_{50} = 89,73$ μ g da nisina obteve-se uma diminuição de 50% na viabilidade celular.

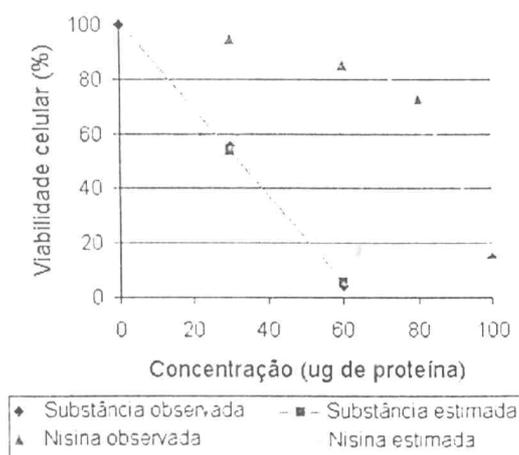


FIGURA 4 - Citotoxicidade do extrato bruto (substância observada e substância estimada) e da nisina comercial – Nisaplin (nisina observada e nisina estimada) em células Vero. Os resultados apresentados correspondem a média de três ensaios independentes, cada um em quadruplicata.

Analisando-se a Figura 4, pode-se constatar, que as concentrações do extrato bruto e da nisina comercial necessárias para produzir uma diminuição em 50% na viabilidade celular, foram de 32,14 μ g de proteína para o extrato bruto e 89,73 μ g de nisina para a nisina comercial, indicando que o extrato bruto é aproximadamente três vezes mais citotóxico para as células Vero do que a nisina, nas condições testadas.

A atividade citotóxica máxima nas concentrações

de 60 μ g de proteína para o extrato bruto e 100 μ g de nisina para a nisina comercial (Nisaplin) foram de 95,46 e 83,64%, respectivamente, ou seja, o extrato bruto apresentou uma citotoxicidade um pouco maior do que a nisina na maior concentração testada.

É importante salientar que a citotoxicidade apresentada pelo extrato bruto usado contra hemácias de carneiro e células Vero não foi decorrente do sulfato de amônio utilizado no processo de extração, haja vista a não detecção desse sal pelo reagente de Nessler ou pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na forma de amônia, assegurando que o processo de diálise da extração foi eficaz para sua remoção (dados não mostrados).

O sulfato de amônio utilizado no processo de obtenção do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* apresenta vários mecanismos de toxicidade em células animais, causando distúrbios no gradiente eletroquímico, inibindo reações enzimáticas (mudanças no pH intracelular) e aumentando a demanda de energia, sendo que essas alterações variam de acordo com as linhagens celulares. Células epiteliais de túbulos renais de suínos (JURKAT-L.L.C-PK₁), tratadas com concentrações milimolares de sulfato de amônio, apresentaram mudanças significativas na morfologia e no número, porém, não houve interrupção no seu crescimento, permitindo um certo grau de diferenciação.¹¹

Os resultados sugerem que a citotoxicidade do extrato bruto também não foi decorrente do seu pH, pois após sua ressuspensão em meio 199, o mesmo apresentou em papel indicador pH 7. Segundo Fermanian & Wong¹ e Andreeva et al.¹, a hemolisina BI, produzida por *Bacillus cereus* é composta de três proteínas distintas B, L1 e L2; as quais não são tóxicas individualmente, mas quando combinadas são hemolíticas, enterotoxigênicas, dermonecróticas e citotóxicas para vários tipos de células e tecidos. Os resultados sugerem que a citotoxicidade apresentada pelo extrato bruto não necessariamente é causada somente por uma, mas pela associação de várias substâncias presentes no extrato, não sendo necessariamente a substância antimicrobiana.

A bacteriocina com maior uso comercial é a nisina, porém a segurança de outras bacteriocinas com potencial aplicação na indústria de alimentos tem também sido avaliada. A pediocina PA-1 foi injetada, tanto em ratos como em camundongos, e o teste imunológico mostrou que a mesma não é imunogênica para ambos. Esse peptídeo é também susceptível à proteólise por tripsina e quimiotripsina.⁴

A citotoxicidade da toxina CytK, produzida por *Bacillus cereus*, foi avaliada utilizando uma linhagem de células epiteliais intestinais denominada CACO-2. Nesse estudo foi constatado que a quantidade de proteína necessária para inibir em 50% a síntese de proteínas foi de 16 ng, sendo aproximadamente 10.000 vezes mais potente que a β -toxina produzida por *Clostridium perfringens*, que é considerada citotóxica e não citolítica. A atividade da CytK está diretamente relacionada com a formação de poros na

membrana das células CACO-2. Os valores obtidos no estudo foram cinco vezes menores do que os encontrados utilizando a linhagem de células epiteliais renais Vero.⁹

Para se obter um resultado mais conclusivo da toxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*, bem como para comparar com os resultados obtidos *in vitro*, faz-se necessário um estudo da toxicidade aguda, subcrônica e crônica *in vivo*, haja vista que a natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas faz com que essas substâncias sejam facilmente degradadas no trato gastrointestinal do homem e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade.¹⁸

Segundo Marugg¹², estudos realizados com várias bacteriocinas indicaram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos.

Um estudo realizado por Pedersen et al.¹⁶, que investigaram o potencial citotóxico de cepas industriais de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, concluiu que essas cepas são seguras para uso, não existindo uma correlação clara entre as toxinas produzidas por *Bacillus cereus* e as outras espécies de *Bacillus* estudadas. Segundo esses mesmos autores, a atividade proteolítica das proteases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* pode interferir com o ensaio de citotoxicidade de células de mamíferos pela tripsinização das células em monocamada, produzindo dessa forma um efeito citotóxico aparente.

Conclusão

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* apresenta efeito citotóxico tanto contra hemácias de carneiro como em células Vero e, concentrações de 11,43 e 32,14 µg de proteína são suficientes para destruir 50% das células, respectivamente.

Estudos do mecanismo de ação da(s) substância(s) antimicrobiana(s) presente(s) no extrato bruto serão de vital importância, bem como estudos *in vivo* de toxicidade aguda, subcrônica e crônica.

SCHULZ, D.; SIMÕES, C.M.O.; FRÖHNER, C.R.A.; GABILAN, N.H.; BATISTA, C.R.V. Citotoxicity of the crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens* front of erythrocytes and Vero cells. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 145-151, abr./jun. 2005.

- **ABSTRACT:** The citotoxicity of the crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens* against sheep erythrocytes and Vero cells was evaluated. The crude extract was obtained from a culture of *Bacillus amyloliquefaciens* by technics of precipitation, centrifugation, dialysis and sterilization through filtration. The crude extract showed a 50% hemolytic concentration in tubes of 11,43 µg of protein in sheep erythrocytes suspension and a 50%

citotoxic concentration of 32,14 µg of protein in Vero cells. The results suggest that the crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens* is cytotoxic as much toward sheep erythrocytes as in Vero cells.

- **KEYWORDS:** *Bacillus amyloliquefaciens*; antimicrobials; citotoxicity.

Referências bibliográficas

1. ANDREEVA, Z. I. et al. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expr. Purif.*, v. 45, p. xxx-xxx, 2005.
2. AZILA, N.; OTHMAN, I. Haemolytic and phospholipase A activities of the tentacle extract of *Catostylus mosaiicus*. *Biochem. Int.*, v. 20, p. 291-299, 1990.
3. BATISTA, C. R. V. Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on anthagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*. 1993. 157 f. Tese (Doutorado), University of Strathclyde, Glasgow, 1993.
4. BHUNIA, A. K. et al. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 69, p. 211-215, 1990.
5. BOUCABEILLE, C. et al. Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linxs* OC2. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 153, p. 295-301, 1997.
6. CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, p. 1-20, 2001.
7. FERMANIAN, C. F.; WONG, A. C. L. Improved *in vitro* detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2000.
8. GABILAN, N. H. Purificação parcial de toxinas da Anêmona do Mar *Bunodosoma caissarum* Correa 1964 – Estudo das propriedades da atividade hemolítica. 1992. 40 f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1992.
9. HARDY, S. P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol. Lett.*, Oslo, v. 197, p. 47-51, Feb. 2001.
10. JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.
11. JAY, J. M. *Modern food microbiology*. 6th ed. London: Aspen Publ., 2000. 620p.
12. MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biotechnol.*, v. 5, n. 3, p. 305-312, 1991.
13. MIRABET, M. et al. Ammonium toxicity in different cell lines. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 56, n. 5, p. 530-537, 1997.
14. MORENO, I. et al. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra

- Listeria innocua* LIN 11. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.
15. PALMER, M. Cholesterol and activity of bacterial toxins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 238, p. 281-289, 2004.
 16. PEDERSEN, P. B. et al. Cytotoxic potencial of industrial strains of *Bacillus* sp. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 36, p. 155-161, 2002.
 17. PERO J.; SLOMA, A. Proteases. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. (Ed.). *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*. Washington, D.C.: ASM Press, 1993. p. 939-952.
 18. PIARD, J. C. et al. Purification and parcial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNR 481. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 279-284, 1992.
 19. PROVODA, C. J.; LEE, K-D. Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecues. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 41, p. 209-221, 2000.
 20. SCHULZ, D. **Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
 21. SIEUWERTS, A. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ - values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, p. 813-823, 1995.
 22. TAKEUCHI, H.; BABA M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **J. Virol. Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.

APÊNDICE C

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2005.



BACTERIOCINAS E ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Bacillus* spp. PARA CONSERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS*

Denys SCHULZ*
Raquel Regina BONELLI**
Cleide Rosana Vieira BATISTA**

■ **RESUMO:** Alguns microrganismos possuem a capacidade de produzir substâncias que podem influenciar no desenvolvimento de outros microrganismos. Desde os anos 50 é relatada a capacidade de várias espécies de bactérias do gênero *Bacillus* de produzir substâncias com atividade antimicrobiana como peptídeos, também denominados de bacteriocinas e enzimas como a subtilisina, subtilina, as proteases e as termolisinas. Muitos desses peptídeos e enzimas têm sido caracterizados bioquimicamente e geneticamente. Embora sejam conhecidas, a função estrutural, a biossíntese e modo de ação de alguns peptídeos antimicrobianos e enzimas, muitos aspectos desses compostos ainda permanecem desconhecidos. Esse artigo descreve uma revisão sobre as principais bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp., bem como suas aplicações em alimentos. Alguns dados de segurança de bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. também são relatados.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** Bacteriocinas; enzimas; *Bacillus* spp.; alimentos.

Introdução

A contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos é um problema sério uma vez que, causa grandes índices de morbidade. Abre-se então, a necessidade de se desenvolver alternativas de conservação para que aliadas às tecnologias existentes, seja possível disponibilizar para população alimentos de qualidade cada vez melhor e mais seguros sob o ponto de vista microbiológico e toxicológico.³⁴

Segundo Jack et al.³², a maioria, senão todas as bactérias, são capazes de produzir várias substâncias no curso de seu crescimento *in vitro*, que podem ser inibitórias tanto para si quanto para outras bactérias. Essas substâncias poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático. Tais substâncias incluem:

- toxinas;
- enzimas bacteriolíticas como lisostafina, fosfolipase A e hemolisinas;

- subprodutos das vias metabólicas primárias como ácidos orgânicos, amônia e peróxido de hidrogênio e vários outros metabólitos secundários;
- substâncias antibióticas como garamicina, valinomicina e bacitracina, que são sintetizadas por complexos multienzimáticos (sua biossíntese, ao contrário dos agentes tidos como bacteriocinas, não é diretamente bloqueada por inibidores ribossomais da síntese de proteínas);
- bacteriocinas (são proteínas antimicrobianas ou complexos protéicos, usualmente um peptídeo, ativos contra espécies bacterianas).

Do ponto de vista industrial, as bacteriocinas podem ser uma alternativa muito interessante de agente antimicrobiano natural para conservação de alimentos. Diante disso, tudo indica que conservadores naturais, particularmente em adição ou combinação sinérgica com outros fatores e técnicas; que já estão em uso, terão um papel importante em um futuro próximo, principalmente se estes agentes tenham nos alimentos a mesma ação efetiva verificada em ensaios laboratoriais.²⁵

Conforme demonstrado em estudos sobre nisina (*Lactococcus lactis*), pediocina (*Pediococcus acidilactici*), subtilina (*Bacillus subtilis*) e outras, as bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são formadas, primeiramente, como precursores com pequena atividade biológica.^{13, 15, 49, 53}

Tradicionalmente, as bacteriocinas são descritas como sendo peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas, porém recentemente vários estudos estão direcionados a produção de bacteriocinas por bactérias do gênero *Bacillus*. Frente a essa realidade, essa revisão descreve as principais bacteriocinas e enzimas produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, bem como suas potenciais aplicações no processamento e bioconservação de alimentos.

Bacteriocinas produzidas por *Bacillus* spp.

Sob a designação de bacteriocinas, são muitas as substâncias extraídas e caracterizadas. Como exemplos de espécies produtoras tem-se *Bacillus subtilis*³³, *Bacillus thuringiensis*³⁰, *Bacillus stearothermophilus*⁶⁴, *Bacillus*

* Trabalho elaborado com auxílio financeiro da CAPES, sob a forma de Bolsa de Doutorado do primeiro autor.

** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - UFSC - 88034-001 - Florianópolis - SC - Brasil.

*licheniformis*⁷ e *Bacillus megaterium*³¹. A subtilina, produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 é a bacteriocina mais amplamente estudada entre as produzidas por *Bacillus*.⁵² Classificada como lantibiótica, sua estrutura e mecanismo de ação são semelhantes aos da nisina, produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis*.³⁷

Dentre os primeiros estudos de bacteriocinas produzidas por *Bacillus* spp. destacam-se os seguintes:

. Zheng & Slavik⁷¹ caracterizaram parcialmente uma bacteriocina produzida por *Bacillus subtilis* denominada bacilocina 22. É uma proteína de peso molecular de 3,4 kilodaltons (kDa) e perdeu parte de sua capacidade inibitória após eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE). Trabalhos de Zheng et al.⁷² e Klein & Entian³⁷ descrevem determinantes genéticos para síntese e imunidade de duas outras bacteriocinas de *Bacillus subtilis*.

. Oscáriz et al.⁵² detectaram e caracterizaram, também parcialmente, uma bacteriocina denominada de cerefina 7 de 3,9 kDa de peso molecular produzida por *Bacillus cereus* com amplo espectro de atividade. Outra bacteriocina de 9,0 kDa de *Bacillus cereus* foi identificada por Naclerio et al.⁴⁸. Essa, por sua vez, possui um espectro limitado de atividade.

. Hyronimus et al.³⁰ extraíram de *Bacillus coagulans* uma substância semelhante a bacteriocina. Segundo esses autores, a coagulina exibiu as características clássicas de uma bacteriocina (sensibilidade a enzimas proteolíticas, estabilidade diante de diferentes valores de pH, peso molecular baixo), mas também apresentou amplo espectro, sendo ativa contra vários microrganismos patogênicos e deteriorantes.

Recentemente têm sido realizados vários estudos de isolamento e caracterização de bacteriocinas produzidas por *Bacillus*. Dentre esses destacam-se:

. Ahern et al.² caracterizaram a thuricina 439, uma bacteriocina produzida por *Bacillus thuringiensis* B439. Os resultados obtidos nesse estudo confirmam que essa bacteriocina permanece ativa numa ampla faixa de pH e não perde a atividade antimicrobiana quando submetida a temperaturas superiores a 80°C. Para sua purificação foram utilizadas várias técnicas cromatográficas, resultando em dois peptídeos com a mesma seqüência N-terminal, mas com massas moleculares diferentes. Adicionalmente, Cherif et al.¹⁰ constataram que *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9 produz uma bacteriocina denominada de entomocina 9 ativa contra *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e vários fungos. Essa bacteriocina manteve 72% de sua atividade antimicrobiana quando incubada a 121°C por 20min. É estável na faixa de pH de 3 a 9, perde sua atividade quando tratada com proteinase K, apresenta um peso molecular aparente de 12,4 kDa e não é tóxica para células Vero. Na pesquisa não se verificou a presença de genes de virulência, incluindo hemolisina BL, enterotoxina não hemolítica e citotoxina K.

. Martirani et al.⁴³ detectaram e caracterizaram a bacilocina 490 produzida por *Bacillus licheniformis*. Essa bacteriocina é inativada quando tratada com pronase E e proteinase K. Apresentou um peso molecular de 2 kDa e foi ativa contra

Bacillus smithii.

. García et al.²² constataram que a enterocina EJ97 produzida por *Enterococcus faecalis* S-47 é fortemente ativa contra *Bacillus coagulans* CECT 12 em pH 7. Segundo esses autores, essa bacteriocina diminui a atividade em pH 5 e apresenta baixa atividade em pH 9. Sua atividade foi fortemente potencializada por nitrato de sódio em concentrações superiores a 50µg/mL.

. Pattnaik et al.⁵⁵ estudaram o efeito de fatores ambientais na produção da lichenina, um composto codificado cromossomicamente como uma bacteriocina, produzido por *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA, isolado do rúmen de búfalo. Segundo esse estudo, a lichenina representa o primeiro composto antibacteriano de amplo espectro expresso em anaerobiose e efetivo somente em condições de anaerobiose, sendo codificada pelo DNA cromossômico. Resultados obtidos pelos autores podem ser utilizados para a produção da lichenina em larga escala, com potencial aplicação na manipulação da função do rúmen com o propósito de melhorar a produtividade dos ruminantes.

. Cladera-Oliveira et al.¹¹ constataram que a metodologia estatística de superfície de resposta pode ser empregada para otimizar a produção de bacteriocinas por *Bacillus licheniformis* P40. O soro de leite proveniente do queijo foi utilizado como meio para testar por superfície de resposta as variáveis temperatura, pH inicial e concentração de leite. A análise estatística dos resultados demonstrou que todas as variáveis estudadas tiveram um efeito significativo na produção da bacteriocina. Dados da superfície de resposta demonstraram produção máxima de bacteriocina nos pHs iniciais de 6,5 e 7,5 e temperatura entre 26 e 27°C quando a concentração do soro de leite do queijo foi 70 g.L⁻¹.

. A utilização de bactérias do gênero *Bacillus* como biocontroladores de fitopatógenos e patógenos humanos têm sido bastante pesquisada recentemente, haja vista que várias espécies desse gênero são responsáveis pela produção não só de bacteriocinas, mas também de antibióticos peptídicos antifúngicos e antibacterianos. Um exemplo desses compostos é a iturina A, produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* B94 utilizada no controle do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, responsável pela redução no rendimento da produção de soja. Outro exemplo desses compostos são as maltacinas, também pertencentes ao grupo de antibióticos peptídicos cíclicos de *Bacillus subtilis*, sendo ativos contra determinados patógenos humanos como *Candida albicans*, *Thricophyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus*.^{26, 70}

. Kim & Chung³⁶ caracterizaram uma potente proteína antifúngica isolada de uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908, proveniente do solo. A proteína isolada por cromatografia de filtração em gel apresentou na eletroforese em poliacrilamida (SDS PAGE) um peso molecular aparente de 40 kDa. A proteína isolada é estável a 80°C por 20 min e apresentou um amplo espectro de atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos. Análises por microscopia mostraram que a proteína atua na parede celular do fungo *Colletotrichum lagenarium*, responsável pela doença antracnose que afeta melancias. A

seqüência aminoacídica N-terminal da proteína purificada também foi determinada, sendo Ser-Lys-Ile-x-Ile-Asn-Ile-Asn-Ile-x-Gln-Ala-Pro-Ala-Pro-x-Ala. A pesquisa da seqüência no programa NCBI BLAST demonstrou que a proteína purificada ainda não havia sido identificada.

Enzimas produzidas por *Bacillus* spp.

De acordo com Abate et al.¹, o gênero *Bacillus* é a maior fonte industrial de enzimas e *Bacillus amyloliquefaciens* é uma das espécies mais amplamente utilizadas para a produção de α -amilase e proteases.

Bactérias utilizadas para produção comercial de α -amilase foram originalmente isoladas e nomeadas *Bacillus amyloliquefaciens*.⁶⁰ Esse mesmo autor comenta que apesar de ser eventualmente confundido com *Bacillus subtilis*, são baixos os níveis de homologia entre as seqüências de DNA dessas duas espécies e também as amilases que produzem possuem diferentes propriedades.^{68, 69} Essa homologia (ou falta dela) nas seqüências de DNA foram confirmadas por outros autores.⁶³ *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* possuem, em média, de 17 a 36% de homologia; *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis*, 9 a 17%. Assim, *Bacillus amyloliquefaciens* foi estabelecida como espécie genômica. Estudos subseqüentes revelaram que várias características fenotípicas como fermentação de lactose, utilização de gliconato e secreção de DNase e carboximetilcelulase são capazes de prontamente distingui-lo de *Bacillus subtilis*.⁶⁰

A α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* possui peso molecular aparente de 50 kDa, e é estável em pH de 5,5 a 9,0 e em temperaturas de até 80-90°C. Sua biossíntese é controlada tanto pela indução por substratos quanto pela repressão de catabólitos. É produzida no final da fase de crescimento exponencial e no começo da fase estacionária. Apresenta-se como enzima extracelular e somente pequenas quantidades dela permanecem ligadas à célula.⁴⁶

Abate et al.¹ relataram características interessantes do *Bacillus amyloliquefaciens* com relação à sua curva de crescimento e produção de enzimas. Segundo eles, a presença de extrato de levedura aumentou significativamente o crescimento desse microrganismo no meio de cultura utilizado. Em co-cultura com *Zimomonas mobilis*, observaram uma diminuição nos valores detectados de etanol, o qual estaria, provavelmente, sendo utilizado pelo *Bacillus amyloliquefaciens*, uma vez que essa bactéria pode crescer em meio contendo etanol como única fonte de carbono. Quanto à produção de α -amilase, foi possível detectá-la no início da fase de crescimento exponencial e a adição de extrato de levedura aumentou muito a quantidade produzida e a atividade específica dessa enzima (unidades de enzima/grama de biomassa). Contudo, a produção de proteases também foi aumentada, levando à inativação da α -amilase depois de 24 horas; no final da fase exponencial. Mamo & Gessesse⁴² destacaram ainda a influência que a disponibilidade de oxigênio, pH e a fonte de nitrogênio

podem exercer sobre a produção desta enzima.

De maneira geral, as bactérias possuem vários sistemas que as permitem controlar a secreção de enzimas. Simonen & Palva⁶⁶ publicaram uma revisão bibliográfica sobre secreção de proteínas por espécies de *Bacillus*, onde discorrem sobre estruturas e mecanismos envolvidos na liberação (por exemplo, peptídeos sinalizadores e Complexo-S) e que influenciam na produção e no próprio processo secretório dessas substâncias (como proteólise, estrutura de parede celular e mecanismo *feedback*, entre outros).

Segundo Jack et al.³², as bacteriocinas termolábeis de alto peso molecular (classe III de Klaenhammer - >30 kDa) incluem muitas enzimas extracelulares bacteriolíticas (hemolisinas e muramidases) que podem mimetizar as atividades fisiológicas das bacteriocinas. Algumas hemolisinas são um grupo de proteínas também pertencentes à família das citolisinas tiol-ativas, que é um grupo proeminente de toxinas microbianas, na qual a estreptolisina O (SLO) é o protótipo. Os membros deste grupo envolvem mais de 20 espécies de bactérias Gram-positivas, incluindo espécies do gênero *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium* e *Streptococcus*. Essas toxinas são sintetizadas como polipeptídeos hidrossolúveis de cadeia simples, com peso molecular de 47 a 60 kDa e provocam a lise de células eucariotes pela formação de poros na membrana. Muitas dessas citolisinas possuem também efeito antimicrobiano.^{6, 65}

Batista³ verificou que *Bacillus amyloliquefaciens* produz uma substância capaz de inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. Segundo conclusões desse estudo, a inibição não parece ser devida à produção de ácidos ou peróxido de hidrogênio, tampouco à exaustão de nutrientes, havendo a possibilidade de que a substância antimicrobiana seja uma bacteriocina.

Em continuidade aos estudos realizados, Schulz⁶² descreve que o extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* ativo contra *Listeria monocytogenes* NCTC 098630 mostrou em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, gradiente 7,5 a 20%) seis bandas com pesos moleculares aparentes de 14,8, 20, 29, 30, 34 e 56,2 kDa, sugerindo em conjunto com ensaios adicionais realizados que o extrato apresenta natureza protéica sendo provavelmente composto de algumas proteases e enzimas bacteriolíticas.

Schulz⁶² constatou que: (i) é possível extrair a substância antimicrobiana, presente no extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, tanto em água destilada quanto em tampão fosfato; (ii) nos ensaios de atividade antimicrobiana em ágar tripton de soja suplementado com extrato de levedura, utilizando *Listeria monocytogenes* a 10^5 UFC/mL como microrganismo indicador, o extrato bruto apresentou um halo de inibição máximo (raio) de 8,3 mm (profundidade) e 7,5 mm (superfície) numa concentração de 80 μ g e 10 μ g de proteína, respectivamente; (iii) em ágar sangue (AS), utilizando *Listeria monocytogenes* a 10^5 UFC/mL como microrganismo indicador, observou-se que o extrato bruto apresentou um halo de inibição máximo (raio) de 4,5 mm (profundidade)

e 6,6 mm (superfície) numa concentração de 80 µg e 10 µg de proteína, respectivamente; (iv) na determinação da composição global de aminoácidos do extrato bruto constatou-se que esse é composto principalmente de aminoácidos hidrofóbicos (não polares), incluindo a prolina (446,77 ppm), leucina (11,03 ppm), valina (6,27 ppm), isoleucina (4,59 ppm), alanina (2,91 ppm) e glicina (1,87 ppm). A quantidade de aminoácidos totais presentes no extrato bruto foi de 526,59 ppm; (v) em ensaios de citotoxicidade, o extrato bruto apresentou uma concentração hemolítica 50% em tubos na concentração de 11,43 µg de proteína numa suspensão de eritrócitos de carneiro e uma concentração citotóxica 50% na concentração de 32,14 µg de proteína em células Vero; o halo de hemólise máximo (raio) em AS foi de 5,6 mm (profundidade) e 5,7 mm (superfície) numa concentração de 80 µg e 10 µg de proteína, respectivamente. O autor sugere estudos adicionais para se obter um resultado mais conclusivo da toxicidade do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, bem como para comparar com os resultados obtidos *in vitro*, faz-se necessário um estudo da toxicidade aguda, sub-crônica e crônica *in vivo*.

Cepas geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* produziram subtilisina com peso molecular de 28,5 kDa. Essa subtilisina (Carlsberg) foi primeiramente isolada nos anos 50 de uma cepa classificada como *Bacillus subtilis*, e posteriormente reclassificada como *Bacillus licheniformis*. A banda aparente de 29 kDa presente no perfil eletroforético do extrato bruto observada por Schulz⁶² sugere a presença de subtilisina, uma vez que *Bacillus amyloliquefaciens* é taxonomicamente muito semelhante ao *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. A segunda maior protease extracelular de *Bacillus subtilis* é a protease neutra (30 kDa) ou metaloprotease (40 kDa). A termolisina produzida por *Bacillus thermoproteolyticus* possui um peso molecular de 35 kDa. A banda aparente de 34 kDa presente no perfil eletroforético sugere a presença dessa termolisina no extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*. Além de proteases extracelulares presentes na cultura de *Bacillus subtilis*, vários pesquisadores têm verificado a presença de outras serina proteases. Dentre essas, a Bacilopeptidase F (50 kDa) que possui forte atividade proteolítica. Protease neutra, subtilisina e Bacilopeptidase F foram às únicas proteases extracelulares originalmente detectadas em culturas de *Bacillus subtilis*. Uma das menores proteases isoladas de cepas de *Bacillus subtilis* modificados foi a metaloprotease Mpr com peso molecular de 28 kDa. Tanto o mercaptoetanol, como o EDTA inibem aproximadamente 50% de sua atividade e os dois inibidores juntos inativam a enzima. Duas das menores proteases extracelulares de *Bacillus subtilis* (Epr e NprB) foram primeiramente descobertas por clonagem dos seus respectivos genes em plasmídios. O gene *epr* codifica uma pré-proteína que dá origem a uma proteína com peso molecular de 58 kDa. Duas proteases intracelulares têm sido isoladas da esporulação ou fase estacionária de células de *Bacillus subtilis*. A primeira caracterizada foi a intracelular serina

protease (ISP) com peso molecular de 31 kDa. Estudos recentes têm indicado que essa enzima é sujeita à proteólise durante a purificação e que possui *in vivo* um peso molecular de 34 kDa. A banda aparente de 34 kDa presente no perfil eletroforético sugere a presença dessa enzima no extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*.^{51, 57}

Segundo Sampathkumar et al.⁶¹ todas as cepas patogênicas de *Listeria* produzem zona de β-hemólise em AS, sendo a Listeriolisina O (peso molecular de 58 kDa) uma hemolisina, solúvel em água, produzida por *Listeria monocytogenes*. A Listeriolisina O pertence à família das citolisinas tiol ativas que é formada de polipeptídeos com pesos moleculares de 47 a 60 kDa e são líticas para células eucarióticas pela formação de poros na membrana celular.⁶ Analisando o perfil de proteínas presentes no extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* Schulz⁶² constatou uma banda com peso molecular aparente de 56,2 kDa, sugerindo a presença dessa substância nesse extrato, uma vez que esse também apresentou, em testes preliminares, uma forte atividade hemolítica em tubos e em AS. Além desses indicativos, os gêneros *Bacillus* e *Listeria* são considerados taxonomicamente próximos.¹⁶

A perda da capacidade inibitória do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, após eletroforese, constatada por Schulz⁶², pode ser devida a modificações na estrutura da molécula causada pelo tratamento a que foi submetido o extrato bruto antes, ou até mesmo durante a eletroforese, uma vez que a mesma foi realizada em condições desnaturantes.

A maioria dos peptídeos de *Bacillus* contém altas concentrações de prolina e glicina, o que confere dobras β no final do centro hidrofóbico na posição -5 a -7 do C-terminal (+1 refere ao aminoácido N-terminal da proteína madura), sendo suas cadeias peptídicas estabilizadas por pontes de hidrogênio. O grupo amino secundário (imino) da prolina é mantido numa conformação rígida que reduz a flexibilidade estrutural nesse ponto da cadeia polipeptídica. As altas concentrações de prolina e a presença de glicina detectada no extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* são um indicativo que as cadeias dos peptídeos que o constituem apresentam conformação em folha β. Porém, estudos mais refinados de purificação do extrato bruto, bem como o estudo de difração por raio-X de cristais desses peptídeos isolados e seqüenciados serão necessários para a obtenção de dados mais conclusivos a respeito da estrutura conformacional desses peptídeos, bem como para explicar a relação entre estrutura e atividade.^{39, 57}

Aplicação de enzimas e bacteriocinas na conservação e processamento de alimentos

Com a emergência de microrganismos psicrófilos em alimentos, o desenvolvimento de novas tecnologias e a procura dos consumidores por alimentos naturais, as bacteriocinas e/ou seus microrganismos produtores têm sido reconhecidos como uma fonte potencial de bioconservadores para alimentos.⁴⁷

A atividade das bacteriocinas no alimento pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo:

- mudança na solubilidade e na carga eletrostática;
- ligação aos componentes do alimento;
- inativação por proteases;
- mudanças na parede ou na membrana celular dos microrganismos-alvo como resposta a fatores ambientais.²¹

Apesar do grande número de trabalhos de pesquisa sobre a aplicação de bacteriocinas em bioconservação, o uso efetivo desses compostos em alimentos ainda é bastante limitado, particularmente às produzidas por *Bacillus* spp.. A nisina é a única bacteriocina disponível comercialmente para conservação de alimentos. Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg e nosso país é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida a sua aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico grau alimentício.¹⁴

De modo geral, a nisina é ativa apenas frente a bactérias Gram positivas e seus esporos, não afetando as Gram negativas, bolores e leveduras. Postula-se que a parede das bactérias Gram negativas, composta por lipopolissacarídeos e proteínas, atua como uma barreira de permeabilidade celular, impedindo que a nisina atinja a membrana citoplasmática. Contudo, a presença de agentes quelantes, pressão hidrostática ou injúria celular podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina.¹⁴

Benkerroum & Sandine⁴ investigaram a utilização de nisina no controle de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 realizando dois experimentos. O primeiro deles, envolveu duas séries de 3 amostras cada, contendo uma mistura estéril de 250g de queijo e 50mL de creme pasteurizado (leite com 12% de gordura) cada uma. A primeira amostra de cada série foi destinada à adição de nisina e *Listeria monocytogenes*, perfazendo uma concentração final de $2,55 \times 10^3$ UI/g e $3,5 \times 10^5$ células/g de queijo, respectivamente. A outra amostra designada de controle positivo teve somente adição da bactéria estudada, enquanto que a terceira delas serviu como controle negativo. Dessas amostras, uma das séries foi incubada a 4°C e a outra a 37°C. O segundo experimento realizado foi diferente do anterior pela não esterilização da mistura e pela temperatura de incubação, que só ocorreu a 4°C. Os resultados revelaram que em ambos os casos, com ou sem esterilização, a presença de *Listeria monocytogenes* não foi detectada depois de 24h nas condições estudadas, permitindo aos autores concluir que a adição da nisina não somente inibiu o crescimento, mas também eliminou esse microrganismo.

Além da nisina, outras bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas já foram testadas em alimentos,

principalmente produtos cárneos^{45, 50} e laticínios^{8, 24}, com relativo sucesso.

No entanto, a autorização para que uma dada bacteriocina seja regulamentada para uso em alimentos depende dos alimentos nos quais ela será usada e seu propósito nos mesmos. O uso de bacteriocinas purificadas, microrganismos produtores de bacteriocinas, ou expressão genética de bacteriocinas em microrganismos produtores de alimentos, nos Estados Unidos está sob jurisdição da *Food and Drug Administration* (FDA) e são regulamentados como ingredientes alimentares sob o *Federal Food, Drug and Cosmetic Act* (FFDCA). No FFDCA, as substâncias são reconhecidas como seguras (*substances generally recognized as safe* - GRAS) por especialistas qualificados. A decisão é baseada em pesquisas científicas ou no fato de tais agentes já estarem presentes historicamente sem problemas em alimentos.¹⁸

Nos últimos 20 anos, a redução no custo e a maior disponibilidade no mercado de enzimas tem estimulado o interesse da indústria na aplicação desses catalisadores biológicos no processamento de alimentos.⁶⁷

Proteases de *Bacillus amyloliquefaciens* são muito utilizadas na produção de queijos, com intuito de melhorar o sabor. Essas enzimas também são usadas para remover proteínas aderidas à espinha de peixes, que são difíceis de serem removidas mecanicamente, sendo posteriormente usadas na fabricação de enlatados e sopas. Na indústria de panificação, as proteases são usadas na hidrólise parcial do glútem de farinhas para massas de pães, bolos e biscoitos.⁹

A subtilisina de *Bacillus subtilis* vem sendo utilizada para proteólise de proteínas de soja na produção de molho de soja. Além de melhorar a capacidade emulsificante na produção de salsichas e mortadelas, as proteínas hidrolisadas de soja melhoram o sabor de carnes curadas.⁹

Além das proteases e subtilisina, produzidas por *Bacillus* spp., Hewitt & Solomons²⁹ apresentam a α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* como uma enzima de grande importância comercial para hidrólise tanto de dextrinas de alto peso molecular quanto de polímeros de glicose de baixo peso molecular, utilizada pela indústria alimentícia.

Esses são apenas alguns exemplos do potencial de aplicação das bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. na conservação e processamento de alimentos. Muitas dessas substâncias precisam ainda ser descobertas e melhor caracterizadas para utilização pela indústria alimentícia.

Segurança de bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp.

Os principais estudos toxicológicos envolvendo bacteriocinas relatados até o momento se referem aos testes realizados para a aprovação do uso da nisina como bioconservador em alimentos. Estudos de toxicidade aguda, sub-crônica, crônica, de resistência cruzada e sensibilidade alérgica indicaram que a nisina é segura para o consumo humano com uma dose diária aceitável (IDA) de 2,9 mg/

pessoa/dia.¹⁹

Sabendo-se que a nisina é consumida de forma oral, Claypool et al.¹², realizaram estudos sobre os efeitos dessa na microbiota oral. A partir desses estudos foi constatado que um minuto após o consumo de leite achocolatado contendo nisina foi possível detectar apenas 40% de sua atividade quando comparada ao controle de saliva. Em contraste, o mesmo estudo mostrou que quando o leite achocolatado tinha penicilina, a saliva apresentava atividade antimicrobiana por um tempo maior. Outro estudo mostrou o efeito das enzimas gástricas sobre a nisina; o peptídeo antimicrobiano é inativado pela tripsina e a partir disso concluiu-se que a ingestão da nisina não interfere sobre a microbiota gastrointestinal.²⁷

A bacteriocina com maior uso comercial é a nisina, mas a segurança de outras bacteriocinas com potenciais aplicações em alimentos também tem sido avaliada. A pediocina PA-1(AcH) foi injetada tanto em ratos como em camundongos e o teste imunológico mostrou que a pediocina não é imunogênica para ambos animais. Esse peptídeo é também susceptível a proteólise por tripsina e quimiotripsina.⁵

Muitos microrganismos do gênero *Bacillus* são úteis, sendo utilizados na fermentação de alimentos. A maior atividade da fermentação é a hidrólise de proteínas a aminoácidos e peptídeos. A oxidação dos aminoácidos pela bactéria resulta em aumento do pH e isto leva a produtos, em algumas culturas, que possuem um odor característico de amônia.³³ Por outro lado, algumas espécies também podem causar deterioração e toxinfecções alimentares. *Bacillus cereus* é um patógeno clássico, causando síndrome diarreica ou emética, porém, outras espécies de *Bacillus*, incluindo *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis* têm sido relacionadas a enterites seguidas de ingestão de alimentos contaminados com essas bactérias.^{34,41}

Contudo, a principal contribuição do gênero *Bacillus* para a indústria dá-se através da produção de uma grande variedade de enzimas como, por exemplo, fitase³⁵, xilanase²³, ciclodextrinase²⁰, queratinase⁴⁰ e α -amilase⁴².

Segundo Fermanian & Wong¹⁷, a hemolisina BL produzida por *Bacillus cereus* é composta de três proteínas distintas B, L1 e L2, as quais não são tóxicas individualmente, mas quando combinadas são hemolíticas, enterotoxigênicas, dermonecroticas e citotóxicas para vários tipos de células e tecidos.

A citotoxicidade da toxina CytK, produzida por *Bacillus cereus*, foi avaliada utilizando uma linhagem de células epiteliais intestinais denominada CACO-2. Nesse estudo foi constatado que a quantidade de proteína necessária para inibir em 50% a síntese de proteínas foi de 16 ng, sendo aproximadamente 10.000 vezes mais potente que a β -toxina produzida por *Clostridium perfringens*, que é considerada citotóxica e não citolítica. A atividade da CytK está diretamente relacionada com a formação de poros na membrana das células CACO-2. Os valores obtidos no estudo foram cinco vezes menores do que os encontrados utilizando a linhagem de células epiteliais renais VERO.²⁸

A natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas (hemolisinas) faz com que essas substâncias sejam facilmente degradadas no trato gastrointestinal do homem e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade.⁵⁹ Segundo Marugg⁴⁴, estudos realizados com várias bacteriocinas indicaram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos.

Pariza & Foster⁵⁴ discutiram os critérios de segurança para enzimas industriais usada no processamento de alimentos, derivadas de cepas melhoradas via metodologias tradicionais (não-recombinantes). Os seguintes pontos foram analisados: a segurança da cepa com atenção especial para o seu potencial toxigênico e patogênico; alergias e irritações primárias; carcinogênese; mutagênese; teratogênese e efeitos reprodutivos; antibióticos; produtos de reação enzimática, interações entre enzimas e outros componentes alimentares e efeitos diretos das enzimas alimentares sobre o consumidor. Segundo esses mesmos autores, a avaliação de segurança de enzimas alimentares começa pelo teste oral de toxicidade aguda em ratos com dose única, onde essa deve ser equivalente ao no mínimo 100 vezes a exposição humana média estimada ou no mínimo 2.000 mg/kg de peso corporal conforme diretrizes estabelecidas pela OECD (1987) para testes em animais. O segundo teste de toxicidade proposto é um estudo da dose oral repetida (14-91 dias) de preferência em ratos, onde o material teste pode ser administrado na ração ou via sonda esofágica. A dose mínima para esse teste deve ser ao menos 100 vezes a exposição média humana estimada. Além disso, os autores recomendam que o material teste seja testado quanto à presença de micotoxinas, como as aflatoxinas, zearalenona, toxina T-2, ocratoxina A e esterigmatocistina.

Apesar de Pariza & Foster⁵⁴ questionarem se é cientificamente justificado e necessário testar novas preparações de enzimas alimentares quanto à atividade mutagênica, os testes continuam sendo conduzidos, muitas vezes devido a exigências regulamentares em determinados países. Vale, portanto mencionar que, os testes de toxicidade *in vitro* quanto a agentes mutagênicos e clastogênicos exigidos para novas preparações enzimáticas se mostraram semelhantes aos determinados por química analítica e em animais. Segundo esses autores, existem três razões para isso: (i) proteínas, incluindo enterotoxinas e neurotoxinas alimentares produzidas por algumas bactérias não são genotóxicas; (ii) todas as micotoxinas conhecidas, algumas das quais genotóxicas, também induzem outros efeitos tóxicos em animais de laboratório, facilmente detectáveis em testes alimentares de curto prazo; e (iii) existem procedimentos analíticos confiáveis para virtualmente todas as toxinas e micotoxinas protéicas alimentares.

Phelps & McKillip⁵⁸ investigaram a presença dos genes *hblC*, *hblD*, *hblA*, *nheA* e *nheB* e dos operons HBL e NHE, responsáveis pela produção de enterotoxinas, em 39 espécies de *Bacillus* incluindo *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentimorbis*, *Bacillus pasteurii* e *Bacillus thuringiensis*, utilizando a

reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaios imunológicos e a detecção em placa de lecitinase e hemólise. Os resultados obtidos confirmam a presença dos genes em espécies de *Bacillus* fora do grupo do *Bacillus cereus* e a habilidade dessas em produzir toxinas em sistemas alimentares em aerobiose a 32°C.

Recentemente têm sido realizados vários estudos do potencial citotóxico de cepas industriais de *Bacillus sp.* utilizando ensaios *in vitro*. Pedersen et al.⁵⁶ investigaram o potencial citotóxico de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* em células de óvário de hamsters utilizando o ensaio do sal de tetrazolium (MTT) e ensaios imunológicos e concluíram que as espécies de *Bacillus* pertencentes ao grupo *subtilis* são seguras para uso industrial.

Conclusões

Além da conhecida importância das enzimas produzidas por *Bacillus sp.* utilizadas no processamento de alimentos, as bacteriocinas e enzimas, principalmente as bacteriolíticas, produzidas por algumas espécies desse gênero, podem ser uma nova alternativa para indústria na conservação de alimentos, não apenas como agentes antibacterianos, mas também como agentes antifúngicos.

As bacteriocinas, em geral, são uma das opções em um mosaico de possíveis mecanismos para controlar bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos. Porém, é importante lembrar que as substâncias antimicrobianas dificilmente poderão substituir as boas práticas de fabricação fundamentais para a produção de alimentos seguros.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocins produced by *Bacillus sp.* to conservation and food processing. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.16, n.4, p. 403-411, out./dez. 2005.

■ **ABSTRACT:** Some microorganisms are able to produce substances that can influence the growth of other microorganisms. The ability of various bacterial species of the genus *Bacillus* to produce substances with antimicrobial activity such as peptides, also called bacteriocins, and enzymes such as subtilisin, subtilin, proteases and thermolysins has been reported since the 1950s. Many of these peptides and enzymes have been characterized biochemically and genetically. Although the structural function, biosynthesis and mode of action of some antimicrobial peptides and enzymes have been identified, many aspects of these compounds are still unknown. This article reviews the main bacteriocins and enzymes produced by *Bacillus sp.*, as well as their application in food conservation and processing. Some data regarding the safety of bacteriocins and enzymes produced by *Bacillus sp.* are also reported.

■ **KEYWORDS:** Bacteriocins; enzymes; *Bacillus sp.*; food.

Referências bibliográficas

1. ABATE, C. M. et al. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, v. 21, n. 3, p. 249-252, 1999.
2. AHERN, M.; VERSCHUEREN, S.; SINDEREN, D. V. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 220, p. 127-131, 2003.
3. BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on antagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*.** 1993. 157 f. Tese (Doutorado) - University of Strathclyde, Glasgow, 1993.
4. BENKERROUM, N.; SANDINE, W. E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.*, v. 71, n. 12, p. 3237-3245, 1988.
5. BHUNIA, A. K. et al. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 69, p. 211-215, 1990.
6. BILLINGTON, S. J.; JOST, B. H.; SONGER, J. G. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 182, p. 197-205, 2000.
7. BRADLEY, D. E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.*, v. 31, n. 4., p. 230-314, 1967.
8. BUYONG, L.; KOK, J.; LUCHANSKY, J. B. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 12, p. 4842-4845, 1998.
9. CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme technology.** 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 264p.
10. CHERIF, A. et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 990-1000, 2003.
11. CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.*, v. 21, p. 53-58, 2004.
12. CLAYPOOL, L. et al. Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. *J. Dairy Sci.*, v. 49, p. 314-316, 1966.
13. CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, p. 1-20, 2001.
14. DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B.

- D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Rev. Int.*, v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.
15. ENTIAN, K. D.; VOS, W. M. de. Genetics of subtilin and nisin: biosyntheses of lantibiotics. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 69, n. 2, p. 109-117, 1996.
 16. FARBER, J. M.; PETEKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.
 17. FERMANIAN, C. F.; WONG, A. C. L. Improved in vitro detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2000.
 18. FIELDS, F. O. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. *J. Food Prot.*, p. 72-77, 1996.
 19. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. *Fed. Register*, v. 53, p. 29-33, 1988.
 20. GALVIN, N. M.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Purification and properties of the cyclodextrinase of *Bacillus sphaericus* ATCC 7055. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 42, n. 1, p. 46-50, 1994.
 21. GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 46, n. 3, p. 207-217, 1999.
 22. GARCÍA, M. T. et al. Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiol.*, v. 20, p. 533-536, 2002.
 23. GESSESSE, A. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaphilic *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 9, p. 3533-3535, 1998.
 24. GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; TARELLI, G. T. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J. Food Prot.*, v. 58, n. 6, p. 621-623, 1995.
 25. GOULD, G. W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot.*, p. 82-86, 1996.
 26. HAGELIN, G. et al. Preparative high-performance liquid chromatographic separation and analysis of the Maltacine complex – a family of cyclic peptide antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Chromatogr. B*, v. 811, p. 243-251, 2004.
 27. HARA, S. et al. An investigation of toxicity of nisin with a particular reference to experimental studies of its oral administration and influences by digestive enzymes. *J. Tokyo Med. Coll.*, v. 20, p. 176-207, 1962.
 28. HARDY, S. P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 197, p. 47-51, 2001.
 29. HEWITT, C. J.; SOLOMONS, G. L. The production of α -amylase (E.C.3.2.1.1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally defined synthetic culture medium. *J. Ind. Microbiol.*, v. 17, n. 2, p. 96-99, 1996.
 30. HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; URDACI, M. C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I₄. *J. Appl. Microbiol.*, v. 85, n. 1, p. 42-50, 1998.
 31. IVÁNOVICS, G. Bacteriocins and bacteriocin-like substances. *Bacteriol. Rev.*, v. 26, n. 2, p. 108-118, 1962.
 32. JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.
 33. JANSEN, E. F.; HIRSCHMANN, D. J. Subtilin, an antibacterial substance of *Bacillus subtilis*. Culturing conditions and properties. *Arch. Biochem.*, v. 4, p. 297-309, 1944.
 34. JAY, J. M. *Modern food microbiology*. 6th ed. London: Aspen Publ., 2000. 620p.
 35. KEROVUO, J. et al. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 6, p. 2079-2085, 1998.
 36. KIM, P. I.; CHUNG, K.-C. 17. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 234, p. 177-183, 2004.
 37. KLEIN, C.; ENTIAN, K. D. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, n. 8, p. 2793-2891, 1994.
 38. LEEJEERAJUMNEAN, A.; AMES, J. M.; OWENS, J. D. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 30, n. 5, p. 385-389, 2000.
 39. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publ., 2000. 1152p.
 40. LIN, X. et al. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, n. 10, p. 3271-3275, 1992.
 41. LINDSAY, D. et al. Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 30, n. 5, p. 364-369, 2000.
 42. MAMO, G.; GESSESSE, A. Effect of cultivation conditions on growth and α -amylase production by a thermophilic *Bacillus* sp. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 29, n. 1, p. 61-65, 1999.
 43. MARTIRANI, L. et al. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb. Cell Factories*, v. 1, p. 1-5, 2002.
 44. MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biotechnol.*, v. 5, n. 3, p. 305-312, 1991.
 45. McMULLEN, L. M., STILLES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the

- preservation of meats. *J. Food Prot.*, p. 64-71, 1996.
46. MORCEL C.; BIEDERMANN, K. Coupling of fermentation and microfiltration for α -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 14, n. 1, p. 57-62, 1994.
 47. MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F.F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Rev. Microbiol.*, v. 30, n. 2, p. 130-136, 1999.
 48. NACLERIO, G et al. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, n. 12, p. 4313-4316, 1993.
 49. NES, I. F. et al. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 70, n. 2-4, p. 113-128, 1996.
 50. NIELSEN, J. W.; DICKSON, J. S.; CROUSE, J. D. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, n. 7, p. 2142-2145, 1990.
 51. OH, J. S.; KIM, B-G.; PARK, T. H. Importance of specific growth rate for subtilisin expression in fed-batch cultivation of *Bacillus subtilis* *sp*11G mutant. *Enz. Microbiol. Tech.*, v. 30, p. 747-751, 2002.
 52. OSCÁRIZ, J. C.; LASA, I.; PISABARRO, A. G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 178, n. 2, p. 337-341, 1999.
 53. PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.*, v. 21, n. 1, p. 465-499, 2003.
 54. PARIZA, M. W.; FOSTER, E. M. Determining the safety of enzymes used in food processing. *J. Food Prot.*, v. 46, p. 453-463, 1983.
 55. PATTNAIK, P.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. *Microbiol. Res.*, v. 160, p. 213-218, 2005.
 56. PEDERSEN, P. B. et al. Cytotoxic potencial of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 36, p. 155-161, 2002.
 57. PERO J.; SLOMA, A. Proteases. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. (Ed.). *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*. Washington, D.C.: ASM Press, 1993. p. 939-952.
 58. PHELPS, R. J.; MCKILLIP, J. L. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, n. 6, p. 3147-3151, 2002.
 59. PIARD, J. C. et al. Purification and parcial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNR 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, p. 279-284, 1992.
 60. PRIEST, F. G. Systematics and Ecology of *Bacillus*. In: SONENSHEIN, A. L., HOCH, J. A., LOSICK, R. (Ed) *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*. Washington, D.C.: ASM Press, 1993. p. 3-16.
 61. SAMPATHKUMAR, B. et al. Production of listeriolysin O by *Listeria monocytogenes* (Scott A) under heat-shock conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 131-137, 1999.
 62. SCHULZ, D. **Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
 63. SEKI, T.; OSHIMA, Y. Taxonomic position of *B. subtilis*. In: MARUO, B.; YOSHIKAWA, M. *Bacillus subtilis: molecular biology and industrial applications*. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 7-25.
 64. SHAFIA, F. Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 92, n. 2, p. 524-525, 1966.
 65. SHEPARD, L. A. et al. Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochem.*, v. 37, p. 14563-14574, 1998.
 66. SIMONEN, M.; PALVA, I. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.*, v. 57, n. 1, p. 109-137, 1993.
 67. TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. **Enzymes in food processing**. 2nd ed. London: Aspen Publ., 1995. 319p.
 68. WELKER, N. E.; CAMPBELL, L. L. Comparison of the α -amilase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Bacteriol.*, v. 94, n. 4, p. 1131-1135, 1967.
 69. WELKER, N. E.; CAMPBELL, L. L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, v. 94, n. 4, p. 1124-1130, 1967.
 70. YU, G. Y. et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. & Biochem.*, v. 34, p. 955-963, 2002.
 71. ZHENG, G.; SLAVIK, M. F. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Soc. Appl. Microbiol.*, v. 28, p. 363-367, 1999.
 72. ZHENG, G et al. Genes of the *sbo-alb* Locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 181, n. 23, p. 7346-7355, Dec. 1999.

APÊNDICE D

SCHULZ, D.; BATISTA, C. R. V. Atividade antibacteriana do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a diferentes indicadores. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 73-77, 2006.



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO DE *Bacillus amyloliquefaciens* FRENTE A DIFERENTES INDICADORES*

Denys SCHULZ*
Cleide Rosana Vieira BATISTA**

■ **RESUMO:** O presente estudo teve como objetivo obter um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*, padronizado pela dosagem de proteínas, e quantificar sua atividade antibacteriana pelo halo de inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* somente apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630. Constatou-se que a concentração responsável por 50% da máxima atividade antibacteriana foi 29,22 g do extrato bruto, com um halo de inibição de aproximadamente 4 µmm.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** Atividade antibacteriana; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Listeria monocytogenes*.

INTRODUÇÃO

É notório que alimentos, industrializados ou não, podem conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos, que podem interferir em sua vida útil ou causar doenças. Existem inúmeros recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar seu desenvolvimento nos alimentos, incluindo tratamento térmico, adição de conservadores químicos, uso de baixa temperatura durante o armazenamento, entre outros. No entanto, a cada dia aumenta a procura por alimentos naturais, que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de processamento industrial, que sejam minimamente processados e que não sejam adicionados de produtos químicos. Com isso, aumenta também a preocupação dos fabricantes de alimentos em produzir alimentos que não necessitem desses procedimentos para que sejam saudáveis e para que atendam os parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores e fabricantes.^{5, 10}

Um dos métodos de bioconservação para o controle de microrganismos patogênicos em alimentos consiste na

adição de bacteriocinas. As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos de origem bacteriana capazes de inibir cepas ou espécies que são, geralmente, taxonomicamente relacionadas à bactéria produtora. O mecanismo de ação das bacteriocinas sobre células vegetativas não está totalmente esclarecido, mas envolve ação sobre a membrana celular, pela formação de poros. Atualmente, muitas bacteriocinas têm sido isoladas de bactérias do gênero *Bacillus*.^{4, 11}

A atividade antibacteriana da célula de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Listeria monocytogenes* foi demonstrada por Batista¹ e Schulz.¹³ Em continuidade a esses estudos, o presente trabalho teve como objetivo obter um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e quantificar sua atividade antibacteriana frente a diferentes indicadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foi obtido por técnicas de precipitação de proteínas, centrifugação, diálise e esterilização por filtração conforme Figura 1.¹³

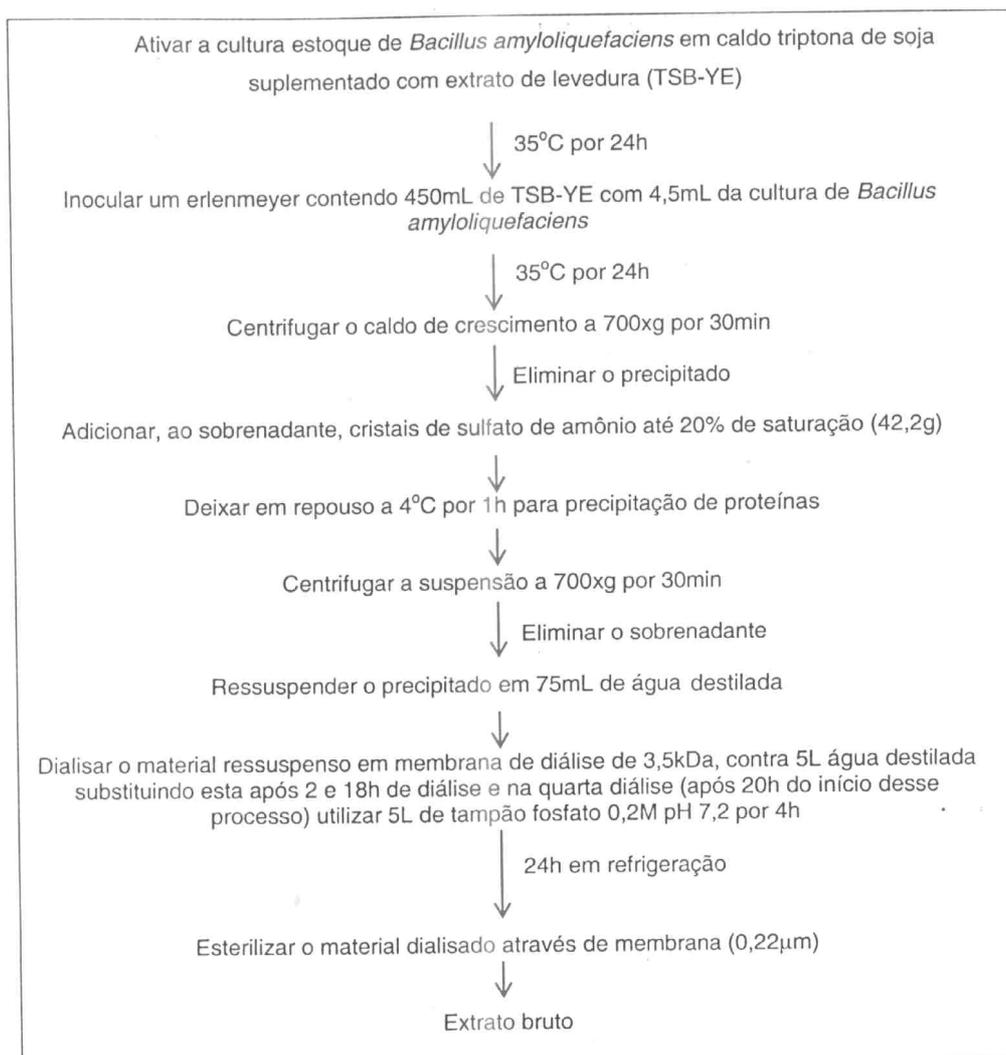
A padronização do teste de atividade antibacteriana do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foi realizada pela determinação da concentração de proteínas utilizando o Kit de Ensaio para Dosagem de Proteínas Totais (Análise Diagnóstica - Método de Biureto) por comparação com padrão de albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Micronal B382) a 545 nm.

Todos os ensaios foram realizados com um pool de extrato bruto, obtido pela mistura dos extratos brutos extraídos em tampão, constituído de 150 mL de extrato bruto. O pool foi concentrado por liofilização para obter as concentrações protéicas testadas nesse estudo (Liofilizador Edwards do Brasil).

O processo de diálise foi monitorado qualitativamente com o reagente de Nessler, objetivando o controle da remoção de todo o sulfato de amônio utilizado no processo de precipitação.⁶

* Trabalho elaborado com auxílio financeiro da CAPES, sob a forma de Bolsa de Doutorado do primeiro autor.

** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - UFSC - 88034-001 - Florianópolis - SC - Brasil.



Fonte: Schulz,¹³ com algumas modificações.

FIGURA 1 - Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Triagem da atividade antibacteriana do extrato bruto

Listeria monocytogenes NCTC 098630 foi ativada em TSB-YE a 35°C por 24 h. Para detecção da atividade inibitória do extrato bruto foram preparadas placas contendo ágar Triptona de Soja (Oxoid) suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura (Difco) - TSA-YE que, após solidificado, foi inoculado, por semeadura em superfície, com 0,1 mL de *Listeria monocytogenes* na concentração de 10^5 UFC/mL.

Volumes de 10 µL do extrato bruto foram aplicados na superfície das placas de TSA-YE. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min para difusão do extrato bruto no ágar e depois incubado a 35°C por 24 h.

Após incubação foi realizada a leitura para observação dos halos de inibição. Esta triagem da atividade antibacteriana do extrato bruto foi realizada a cada extração para ser em seguida padronizada pela dosagem de proteínas e posteriormente quantificada nos ensaios de atividade antibacteriana.^{1, 13}

Quantificação da atividade antibacteriana utilizando diferentes indicadores

Dentre os diferentes indicadores foram utilizadas bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* NCTC 098630, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram negativas

(*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

A quantificação da atividade antibacteriana do extrato bruto foi realizada utilizando placas de TSA-YE, previamente inoculadas com 0,1 mL de cada microrganismo indicador na concentração de 10^8 UFC/mL, pela técnica de difusão em poços. Para o estudo foram utilizados 5; 20; 40; 60; 80 μ L de uma solução estoque de 1000 μ g de proteína/mL em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 contendo 5, 20, 40, 60 e 80 μ g de proteína, respectivamente. A atividade antibacteriana do extrato bruto foi comparada com a nisina comercial (Nisaplin), por ser essa a única bacteriocina utilizada comercialmente na conservação de alimentos. A partir de uma solução estoque de Nisaplin contendo 1000 μ g de nisina/mL em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 foram utilizados 5; 20; 40; 60; 80 μ L contendo 5; 20; 40; 60; 80 μ g de nisina, respectivamente.

Após inoculação nas placas foram necessários 30 min para difusão do inóculo no ágar. Após esse período as placas inoculadas foram incubadas a 35°C por 24 h. Como controle negativo utilizou-se tampão fosfato 0,2 M pH 7,2. A atividade antibacteriana foi quantificada pela medida do raio do halo de inibição utilizando um paquímetro. Considerou-se como inibição um halo de inibição superior a 2 mm de raio na maior concentração testada.¹⁻¹³

Análise estatística

Os valores obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de regressão não linear, utilizando o programa SAS, versão 6.12 (Copyright 1989-1996, SAS Institute Inc, Cary, NC 27513, USA). O gráfico foi plotado utilizando o programa Microsoft Excel 2000, versão 9.0.2812. O teste de separação de médias utilizado foi o teste F ao nível de significância de 5%. A equação ajustada foi utilizada para calcular a concentração responsável por 50% da máxima atividade antibacteriana.

Os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana em placas de TSA-YE do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* foram ajustados utilizando regressão não linear, através da seguinte equação: $Y_i = aX_i/(b+X_i)$.

Os resultados para a nisina comercial (Nisaplin) no ensaio de atividade antibacteriana não foram ajustados em função da ausência de atividade antibacteriana nas concentrações testadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagem de proteínas do extrato bruto

O pool de extratos brutos foi liofilizado e ressuspenso em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 para uma concentração final de 1000 μ g de proteína/mL. A concentração de proteína foi utilizada na padronização da atividade antibacteriana do extrato bruto devido à sua praticidade e

sensibilidade. Para a nisina, não foi realizada a dosagem de proteínas, uma vez que é um produto comercial (Nisaplin) composto de rico material protéico. A concentração da nisina utilizada nos ensaios foi baseada em informações fornecidas pelo fabricante.

Triagem da atividade antibacteriana do extrato bruto

O pool de extratos brutos apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, tanto antes quanto após a liofilização.

Quantificação da atividade antibacteriana utilizando diferentes indicadores

Para calcular a concentração de proteína do extrato bruto responsável por 50% (X_{50}) da máxima atividade antibacteriana utilizou-se como referência a melhor equação da reta para o fenômeno observado. Os resultados observados para o extrato bruto (substância observada) e nisina são os dados constatados no laboratório e os estimados (substância estimada) são os calculados com a equação da reta.

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* somente apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630. O extrato bruto quando inoculado em placas de TSA-YE previamente inoculadas com *Listeria monocytogenes* apresentou um halo de inibição de 1,3 e 8,3 mm numa concentração de 5 e 80 μ g de proteína, respectivamente. Em contrapartida, a nisina não apresentou halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas.

Os resultados para o extrato bruto inoculado em profundidade de placas de TSA-YE foram ajustados pela seguinte equação: $Y_i = 18,77X_i/(108,24+X_i)$, com um $R^2 = 0,94$. Portanto, se considerarmos que o halo de inibição na concentração de 80 μ g de proteína corresponde a atividade máxima, com uma concentração de $X_{50} = 29,22$ μ g do extrato bruto obtivemos uma atividade antibacteriana de 50% com um halo de inibição de aproximadamente 4 mm. Todos os resultados de atividade antibacteriana em profundidade para o extrato bruto e nisina em placas de TSA-YE previamente inoculadas com *Listeria monocytogenes* NCTC 098630 podem ser observados na Figura 2.

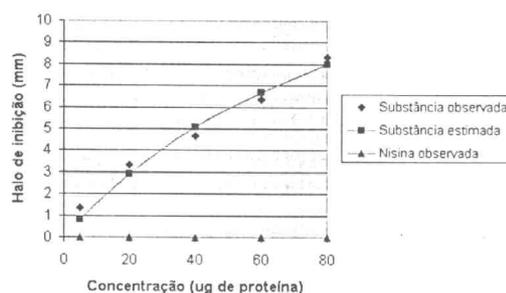


FIGURA 2 - Atividade antibacteriana do extrato bruto e nisina comercial (Nisaplin) em placas de TSA-YE incubadas a 35°C por 24 h, utilizando *Listeria monocytogenes* NCTC 098630 como microrganismo indicador. Os resultados apresentados correspondem a média de três ensaios independentes, cada um em triplicata.

Analisando os resultados de atividade antibacteriana, podemos constatar que o extrato bruto quando inoculado em profundidade em placas de TSA-YE apresentou inibição em todas as concentrações testadas; ao contrário da nisina. Logo, o extrato bruto é mais potente do que a nisina nas concentrações testadas, e pode ser considerado um potencial candidato à bioconservador de alimentos.

De modo geral, a nisina é ativa apenas frente a bactérias Gram positivas e seus esporos, não afetando as Gram negativas, bolores e leveduras. Postula-se que a parede das bactérias Gram negativas, composta por lipopolissacarídeos e proteínas, atua como uma barreira de permeabilidade celular, impedindo que a nisina atinja a membrana citoplasmática. Contudo, a presença de agentes quelantes, pressão hidrostática ou injúria celular podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina.⁵

Recentemente têm sido realizados vários estudos de isolamento e caracterização de bacteriocinas produzidas por *Bacillus*. Dentre esses destacam-se:

Cherif et al.² constataram que *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9 produz uma bacteriocina denominada de entomocina 9 ativa contra *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e vários fungos. Essa bacteriocina manteve 72% de sua atividade antimicrobiana quando incubada a 121°C por 20min. É estável na faixa de pH de 3 a 9, perde sua atividade quando tratada com proteinase K, apresenta um peso molecular aproximado de 12,4 kDa e não é tóxica para células Vero. Na pesquisa não se verificou a presença de genes de virulência, incluindo hemolisina BL, enterotoxina não hemolítica e citotoxina K.

Martirani et al.⁹ detectaram e caracterizaram a bacillocina 490 produzida por *Bacillus licheniformis*. Essa bacteriocina é inativada quando tratada com pronase E e proteinase K. Apresentou um peso molecular de 2 kDa e foi ativa contra *Bacillus smithii*.

Pattnaik et al.¹² estudaram o efeito de fatores ambientais na produção da lichenina, um composto codificado cromossomicamente como uma bacteriocina, produzido por *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA, isolado do rúmen de búfalo. Segundo esse estudo, a lichenina representa o primeiro composto antibacteriano de amplo espectro expresso em anaerobiose e efetivo somente em condições de anaerobiose, sendo codificada pelo DNA cromossômico. Resultados obtidos pelos autores podem ser utilizados para a produção da lichenina em larga escala, com potencial aplicação na manipulação da função do rúmen com o propósito de melhorar a produtividade dos ruminantes.

Cladera-Oliveira et al.³ constataram que a metodologia estatística de superfície de resposta pode ser empregada para otimizar a produção de bacteriocinas por *Bacillus licheniformis* P40. O soro de leite proveniente do queijo foi utilizado como meio para testar por superfície de resposta as variáveis temperatura, pH inicial e concentração de leite. A análise estatística dos resultados demonstrou que todas as variáveis estudadas tiveram um efeito significativo na produção da bacteriocina. Dados da superfície de res-

posta demonstraram produção máxima de bacteriocina nos pHs iniciais de 6,5 e 7,5 e temperatura entre 26 e 27°C quando a concentração do soro de leite do queijo foi 70 g.L⁻¹.

Kim & Chung⁸ caracterizaram uma potente proteína antifúngica isolada de uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908, proveniente do solo. A proteína isolada por cromatografia de filtração em gel apresentou na eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) um peso molecular aparente de 40 kDa. A proteína isolada é estável a 80°C por 20 min e apresentou um amplo espectro de atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos. Análises por microscopia mostraram que a proteína atua na parede celular do fungo *Colletotrichum lagenarium*, responsável pela doença antracnose que afeta melancias. A sequência aminoacídica N-terminal da proteína purificada também foi determinada, sendo Ser-Lys-Ile-x-Ile-Asn-Ile-Asn-Ile-x-Gln-Ala-Pro-Ala-Pro-x-Ala. A pesquisa da sequência no programa NCBI BLAST demonstrou que a proteína purificada ainda não havia sido identificada.

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas classificadas como não lantibióticas (classe II e III) incluem tanto as bacteriocinas de alto como as de baixo peso molecular. As pertencentes à subclasse IIb apresentam atividade antibacteriana frente *Listeria* (antilisterial) e as da classe IIc são as que necessitam de dois peptídeos para a atividade antibacteriana.⁷

A(s) substância(s) antibacteriana(s) presente(s) no extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* ativo frente *Listeria monocytogenes* provavelmente pertence(m) a uma das classes de bacteriocinas não lantibióticas.

Para a confirmação dessa hipótese, estudos futuros de caracterização e do mecanismo de ação da(s) substância(s) antibacteriana(s) presente(s) no extrato bruto serão de vital importância para sua classificação definitiva.

Apesar do grande número de trabalhos de pesquisa sobre a aplicação de bacteriocinas em bioconservação, o uso efetivo desses compostos em alimentos ainda é bastante limitado, particularmente às produzidas por *Bacillus* spp. Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg e nosso país é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida a sua aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico grau alimentício.⁵ Apesar da nisina não ter sido ativa frente *Listeria monocytogenes* nesse estudo deve-se levar em consideração que essa foi diluída em tampão fosfato, o que pode ter influenciado na atividade antibacteriana. Isso é um indicativo de que seja necessário maior concentração de nisina para compensar o efeito sinérgico com o ácido fosfórico.

CONCLUSÃO

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria*

monocytogenes NCTC 098630.

O extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* apresenta natureza protéica sendo provavelmente composto de algumas proteases, bacteriocinas e outras enzimas bacteriolíticas.

As bacteriocinas, em geral, são uma das opções em um mosaico de possíveis mecanismos para controlar bactérias patogênicas e deteriorantes em alimento. Porém, é importante lembrar que elas jamais poderão substituir as boas práticas de fabricação fundamentais para a produção de alimentos seguros.

SCHULZ, D.; BATISTA, C. R. V. Antibacterial activity of the crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens* with different indicators. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 17, n. 1, p.73-77, jan./mar. 2006.

■ **ABSTRACT:** The present study aims to obtain one crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens*, standardized by the measure of proteins, and to quantify its antibacterial activity by the inhibition of the growth of *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. The crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens* was only active with *Listeria monocytogenes* NCTC 098630. The results showed that the concentration responsible for 50% of the maximum antibacterial activity was 29,22 g of protein, with a inhibition of the growth of 4 mm.

■ **KEYWORDS:** Antibacterial activity; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Listeria monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on antagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*.** 1993. 157 f. Tese (Doutorado) - University of Strathclyde, Glasgow, 1993.
- CHERIF, A. et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 990-1000, 2003.
- CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.*, v. 21, p. 53-58, 2004.
- CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 71, p. 1-20, 2001.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Rev. Int.*, v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.
- FARMACOPÉIA brasileira: generalidades e métodos de análise. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 360p.
- GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, v. 84, p. 577-592, 2002.
- KIM, P. I.; CHUNG, K-C. 17. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 234, p. 177-183, 2004.
- MARTIRANI, L. et al. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbiol. Cell Factories*, v. 1, p. 1-5, 2002.
- MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot.*, v. 59, p. 54-63, 1996.
- PALMER, M. Cholesterol and activity of bacterial toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 238, p. 281-289, 2004.
- PATTNAIK, P.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. *Microbiol. Res.*, v. 160, p. 213-218, 2005.
- SCHULZ, D. **Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade.** 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

APÊNDICE E

SCHULZ, D.; CAON, T.; MUSSI, C. S.; SIMÕES, C. M. O.; BATISTA, C. R. V. Genotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a células VERO. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. xx, n. xx, p. xx-xx, 2007. [submetido].



Araraquara, 29 de setembro de 2007.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Denys Schulz

A Comissão Editorial da revista Alimentos e Nutrição informa que o trabalho:

Título: *Genotoxicidade do extrato bruto de Bacillus amyloliquefaciens frente a células vero.*

Autores: Denys Schulz; Cleide Rosana Vieira Batista; Cláudia Maria Oliveira Simões; Thiago Caon e Carolina Schmanech Mussi

foi recebido e será submetido à apreciação de nossa Assessoria Científica.

Respeitosamente,


Prof. Dr. João Bosco Faria
Diretor da Revista

GENOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE
Bacillus amyloliquefaciens FRENTE A CÉLULAS VERO*

Denys SCHULZ*

Thiago CAON**

Carolina Schmanech MUSSI***

Cláudia Maria Oliveira SIMÕES****

Cleide Rosana Vieira BATISTA*****

- RESUMO: O presente estudo teve como objetivo obter um extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, e investigar sua genotoxicidade frente a células VERO. O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi obtido por técnicas de precipitação de proteínas, centrifugação, diálise e esterilização por filtração. A padronização do teste de genotoxicidade foi realizada pela determinação da concentração de proteínas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. A investigação da genotoxicidade com células VERO ATCC-CCL 81 foi realizada pelo Ensaio Cometa, utilizando-se 60, 80 e 100µg de proteína do extrato bruto. Como controle positivo utilizou-se lâminas preparadas com células VERO tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O

*Trabalho elaborado com auxílio financeiro da CAPES, sob a forma de Bolsa de Doutorado em Ciência dos Alimentos do primeiro autor.

** Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

*** Estagiária do Laboratório de Virologia Aplicada do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

**** Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências da Saúde - UFSC - 88040-900 - Florianópolis - SC - Brasil.

***** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - UFSC - 88034-001 - Florianópolis - SC - Brasil.

extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não foi genotóxico para células VERO na concentração de 60µg/mL, porém apresentou genotoxicidade nas concentrações de 80 e 100 µg/mL. O indicativo de genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresentado no ensaio do Cometa, indica a necessidade da realização de análises toxicológicas *in vivo*.

- PALAVRAS-CHAVE: Genotoxicidade; *Bacillus amyloliquefaciens*; células VERO.

Introdução

O processamento moderno dos alimentos dependente de várias tecnologias de conservação para assegurar níveis aceitáveis de qualidade desde a produção até o consumo. Assim, deu-se o início do uso de bioconservadores, onde o desenvolvimento de microrganismos em alimentos é controlado pela adição de substâncias conhecidas como bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos produzidos por uma grande variedade de bactérias, particularmente bactérias lácticas (BAL) e *Bacillus*.^{3, 13, 16}

A natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas (hemolisinas) faz com que essas substâncias sejam degradadas no trato gastrointestinal de homens e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade.¹⁴ Segundo Marugg¹⁰, estudos realizados com várias bacteriocinas indicaram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos. Até o presente, as únicas bacteriocinas produzidas para conservação de alimentos são a nisina e a pediocina PA-1, vendidas com os nomes comerciais de Nisaplin® e Alta®, respectivamente.^{6, 12}

Frente a essa realidade, Schulz²⁰ investigou a citotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 isolado por Batista².

Em continuidade aos estudos realizados, esse trabalho teve como objetivo investigar a genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, com o intuito de utilizá-lo como conservador natural de alimentos.

Material e métodos

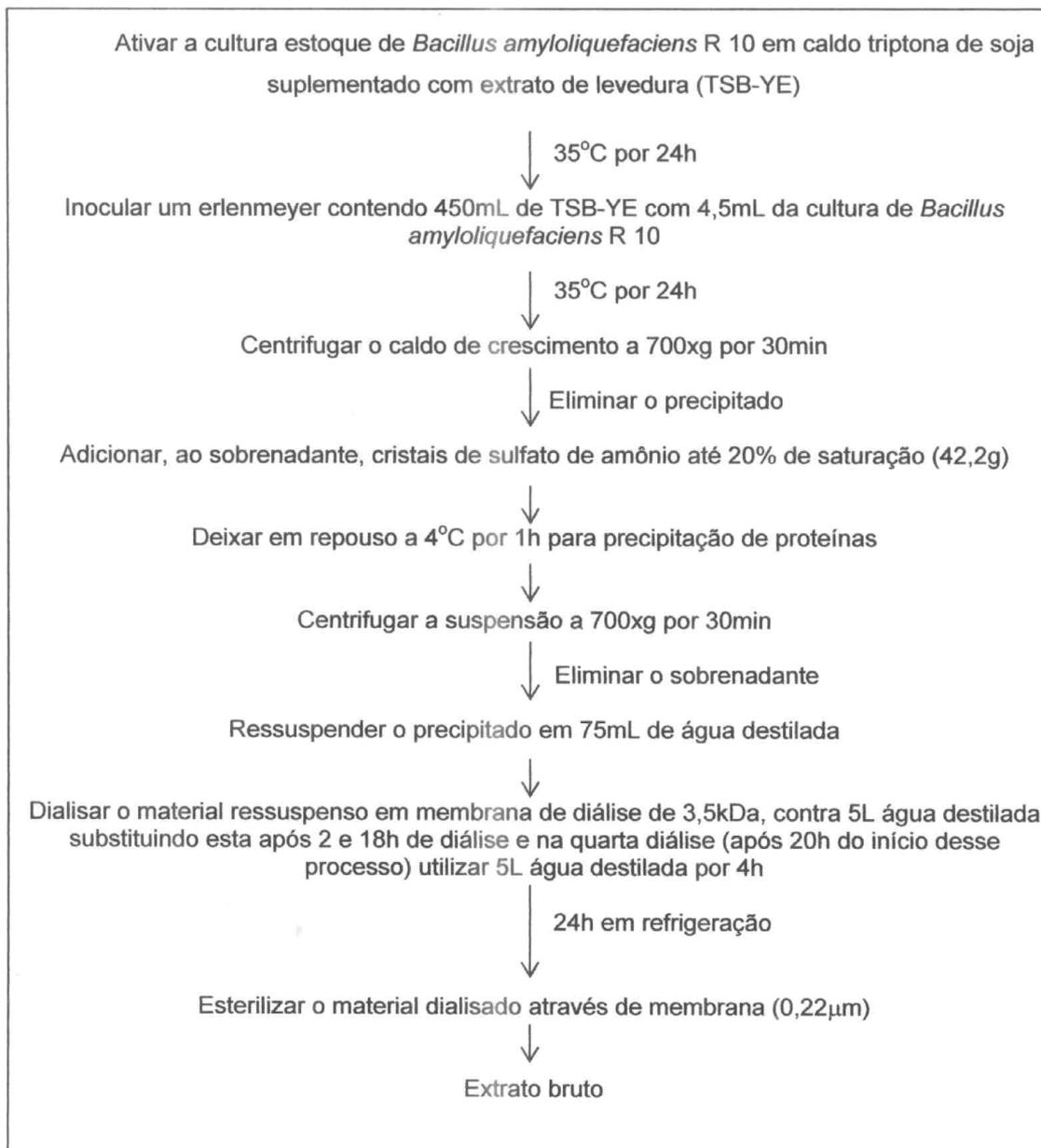
Obtenção do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi obtido por técnicas de precipitação de proteínas, centrifugação, diálise e esterilização por filtração conforme Figura 1.²⁰

A padronização do teste de genotoxicidade foi realizada pela determinação da concentração de proteínas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 utilizando o Kit de Ensaio para Dosagem de Proteínas Totais (Análise Diagnóstica - Método de Biureto) por comparação com padrão de albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Micronal B382) a 545 nm.

Todos os ensaios foram realizados com o *pool* de extrato bruto, obtido pela mistura dos extratos brutos extraídos em água destilada. O *pool* foi concentrado por liofilização para obter as concentrações protéicas testadas nesse estudo (Liofilizador Edwards do Brasil).

O processo de diálise foi monitorado qualitativamente com o reagente de Nessler, objetivando o controle da remoção de todo o sulfato de amônio utilizado no processo de precipitação.⁷



Fonte: Schulz²⁰, com algumas modificações.

FIGURA 1 – Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10.

Triagem da atividade antibacteriana do extrato bruto

Listeria monocytogenes NCTC 098630 foi ativada em TSB-YE a 35°C por 24 h. Para detecção da atividade inibitória do extrato bruto foram preparadas placas contendo ágar Triptona de Soja (Oxoid) suplementado com 0,6% de Extrato de

Levedura (Difco) - TSA-YE que, após solidificado, foi inoculado, por semeadura em superfície, com 0,1 mL de *Listeria monocytogenes* na concentração de 10^5 UFC/mL.

Volumes de 10 μ L do extrato bruto foram aplicados na superfície das placas de TSA-YE. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min para difusão do extrato bruto no ágar e depois incubadas a 35°C por 24 h. Após incubação foi realizada a leitura para observação dos halos de inibição. Esta triagem da atividade antibacteriana do extrato bruto foi realizada a cada extração e após o processo de liofilização.^{2, 20}

Genotoxicidade

Para avaliação da genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi utilizado o Ensaio do Cometa, segundo a técnica alcalina originalmente proposta por Singh et al.²², com algumas modificações na preparação das lâminas propostas por Klaude et al.⁸ e de acordo com as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*.²³

a) Procedimento

As células VERO ATCC-CCL 81, foram cultivadas em placas de 24 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/mL, 1mL/cavidade), formando uma monocamada confluenta em 24h a 37°C/5% de CO₂. Essas células foram cultivadas em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100U/mL de estreptomicina/penicilina/fungizona. Após o tapete formado, cada uma das amostras foi adicionada à placa (500 μ L/cavidade), a qual foi incubada durante 90min, a 37°C/5% CO₂, para avaliação da indução de genotoxicidade por exposição aguda das células ao extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. As concentrações utilizadas do extrato bruto foram 60, 80 e 100 μ g de proteína. A amostra liofilizada testada continha 1000 μ g de proteína do extrato bruto.

Os controles positivos foram lâminas preparadas com células VERO tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 200 e 100 μ M, durante 90min, a 37°C/5% CO_2 . A titulação da solução a 30% de H_2O_2 por permanganometria, foi realizada periodicamente, para garantir a concentração dos controles positivos. Os controles negativos foram lâminas preparadas com células VERO não tratadas, ou seja, contendo apenas meio de manutenção, submetidas ao mesmo tratamento que as demais.

b) Preparação da suspensão celular

Após os tratamentos, o tapete celular de cada cavidade das placas foi lavado três vezes com 300 μ L de tampão fosfato de sódio (PBS) e então tripsinizado. Em cada cavidade, foram adicionados 150 μ L da solução de tripsina (0,05%):EDTA (0,02%), deixando-se agir por até 5min, para a obtenção da suspensão celular e a ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio MEM/5% soro fetal bovino - SFB (500 μ L/cavidade). A suspensão celular foi recolhida com auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugada a 350xg por 3min em tubo Falcon. Após o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram ressuspensas com 200 μ L de meio MEM de forma a obter uma suspensão de aproximadamente 1×10^8 células/mL. Essa suspensão celular foi, posteriormente, adicionada à agarose de baixo ponto de fusão (Gibco BRL) para formar a segunda camada sobre as lâminas. Foram utilizadas duas lâminas por tratamento.

c) Preparação das lâminas

Conforme as modificações propostas por Klaude et al.⁸, foram utilizadas lâminas de microscópio foscas apenas numa das extremidades, desengorduradas, e que já tiveram uma primeira camada de agarose formada com uma solução de agarose de ponto de fusão normal (Gibco BRL) a 1,5% em PBS livre de íons cálcio e

magnésio e deixadas à temperatura de 4°C para secagem. Após coloração e análise, as lâminas podem, ainda, ser secadas novamente e guardadas sem que haja perda importante de material ou alteração na aparência dos cometas.

Para cada lâmina foram usados 40µL da suspensão celular, previamente preparada e tratada, e 60µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio, mantida a 37°C. Uma lamínula de 24x60mm foi colocada sobre cada lâmina, imediatamente, para que a agarose não secasse, antes de se espalhar por toda lâmina. As lâminas foram deixadas a 4°C, por 15min, para a solidificação da agarose.

d) Lise celular

Em seguida, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram submersas em 100mL de solução de lise gelada (4°C), recém-preparada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris-HCl 10mM, qsp de NaOH 10N para obter pH 10) adicionada de 10% DMSO e 1% Triton X-100. A solução de lise é uma solução detergente contendo altas concentrações de sais, que promove a desintegração das membranas celulares. As lâminas podem permanecer nesta solução, no mínimo, por 1h e, no máximo, por 30 dias.

e) Tratamento alcalino e eletroforese

Após a lise celular, as lâminas foram lavadas com PBS gelado com auxílio de uma pipeta Pasteur e submetidas ao tratamento alcalino em solução tampão de pH 13 (300mM NaOH e 1mM EDTA), previamente refrigerada, por 30min, em banho de gelo. A corrida de eletroforese foi feita numa cuba horizontal disposta num banho de gelo, com voltagem constante (25Volts) e amperagem de 280-300mA, por 30min. Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA.¹⁵

f) Neutralização

Após eletroforese, as lâminas foram lavadas três vezes com uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), por 5min cada, sendo em seguida secadas e posteriormente colocadas numa cuba com etanol absoluto por alguns segundos. Após secagem, as lâminas foram submetidas à coloração.

g) Coloração

As lâminas foram coradas com 30 μ L de uma solução aquosa de brometo de etídeo a 20 μ g/mL e cobertas com lamínulas. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV.¹⁷

h) Análise dos cometas

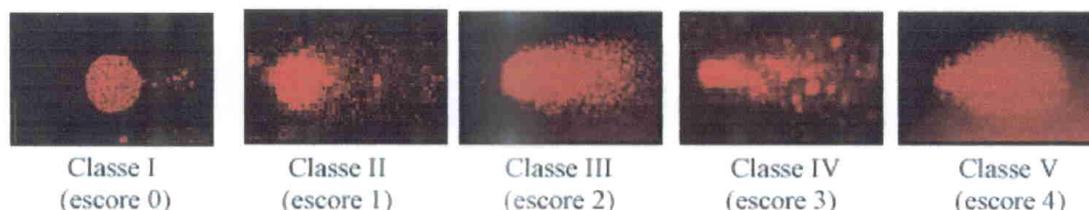
Após coradas, as lâminas foram avaliadas, imediatamente, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm, com aumento de 400X.

A análise dos cometas foi realizada visualmente, conforme classificação proposta por Kobayashi et al.⁹, seguindo algumas modificações introduzidas por Miyamae et al.¹¹.

Através da análise microscópica, os cometas foram classificados em cinco categorias: classe I, sem cauda; classe II, cometas com pequenas caudas (comprimento da cauda menor que 25% do diâmetro da cabeça); classe III, cometas com caudas médias (comprimento da cauda entre 25% e 100% do diâmetro da cabeça); classe IV, cometas com caudas longas (comprimento da cauda maior do que o diâmetro da cabeça); e classe V, cometas mal definidos ou com cabeças pequenas.⁹

Cinquenta células foram analisadas, ao acaso, na região central de cada lâmina e diferenciadas visualmente em cinco classes, utilizando-se um escore, onde

foram atribuídos valores 0, 1, 2, 3 e 4 para as classes I, II, III, IV e V, respectivamente, conforme Figura 2.^{4, 5, 21} Os cometas localizados nas bordas do gel não foram quantificados a fim de evitar resultados falso-positivos.



Fonte: Savi¹⁹.

Figura 2 – Diferenciação das classes dos cometas em ensaios de genotoxicidade.

Análise estatística

Os resultados da avaliação da genotoxicidade através do Ensaio Cometa foram submetidos ao teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de significância de 5%. Os dados foram obtidos de três ensaios independentes, cada um em duplicata. Os valores referentes às repetições foram obtidos mediante somatório dos resultados experimentais, para as diferentes classes de cometas.

Resultados e discussão

Dosagem de proteínas do extrato bruto

O *pool* de extratos brutos obtido em água apresentou 283,88 μ g de proteína/mL.

Triagem da atividade antibacteriana do extrato bruto

O *pool* de extratos brutos apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, tanto antes quanto após a liofilização.

Genotoxicidade

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não foi genotóxico para células VERO na concentração de 60µg/mL, haja vista que não se diferenciou, estatisticamente, do controle negativo. As demais concentrações testadas, 80 e 100 µg/mL, foram genotóxicas para células VERO (Tabela 1).

Analisando-se a Tabela 1, constata-se que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 na concentração de 100µg/mL foi altamente genotóxico para células VERO, pois não se diferenciou, estatisticamente, dos controles positivos. Já na concentração de 80µg/mL apresentou uma genotoxicidade intermediária, pois se constatou uma diferença estatística significativa, tanto em relação ao controle negativo, quanto em relação aos controles positivos.

Tabela 1 – Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 utilizando-se células VERO

Concentração	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média	Desvio-padrão	Tratamento Estatístico
100µg/mL	215	162	144	173,67	36,91	a
80µg/mL	120	126	89	111,67	19,86	b
60µg/mL	81	46	38	55,00	22,87	c
C (+) 100 µM	160	147	174	160,33	13,50	a
C (+) 200 µM	197	151	189	179,00	24,58	a
C (-)	34	34	37	35,00	1,73	c

Os valores referentes às repetições foram obtidos mediante somatório dos resultados experimentais, para as diferentes classes de Cometa, seguindo-se as classificações de Silva et al.²¹. C(+). Controle positivo; C(-) Controle negativo. Letras diferentes significam que houve diferença significativa entre os grupos; teste SNK.

Cabe ressaltar, que mesmo em função da ausência de genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano na concentração de 60µg/mL, não devemos descartar o

indicativo de genotoxicidade apresentado nas demais concentrações testadas. Assim, esses resultados foram importantes para justificar a realização dos estudos toxicológicos *in vivo* do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10.

Poucos estudos de genotoxicidade *in vitro* têm sido realizados com bacteriocinas para uso em alimentos. Esses ensaios conseguem detectar a maioria das substâncias ou seus metabólitos genotóxicos, porém os resultados positivos precisam ser confirmados com ensaios de toxicidade *in vivo*.¹

Tanto os ensaios de genotoxicidade quanto os de toxicidade de dose repetida são fundamentais para avaliação da segurança dos aditivos alimentares, sendo importantes na predição de toxicidade e identificação dos alvos de toxicidade. Em alguns casos, quando constatada toxicidade em tecidos ou órgãos-alvos, torna-se necessário à realização de ensaios complementares para investigação definitiva da segurança desses compostos.¹

Levando-se em consideração a crescente resistência ao uso de nisina e outras bacteriocinas em alimentos por certos países, principalmente da União Européia, deve-se considerar a necessidade de estudos sistemáticos de mutagenicidade, teratogenicidade, de efeitos alérgicos, genotoxicidade, bem como de ação dessas substâncias na microbiota intestinal, haja vista a possibilidade de resistência cruzada desses antimicrobianos com os antibióticos utilizados rotineiramente no combate a infecções.²⁴

Recentemente, SASAKI et al.¹⁸ investigaram a genotoxicidade *in vivo* de 39 aditivos alimentares em uso, pertencentes a seis categorias: (1) corantes, (2) fixadores de cor, (3) conservantes, (4) antioxidantes, (5) fungicidas e (6) adoçantes. No estudo foram testados grupos de quatro camundongos machos tratados por via

oral com cada aditivo na dose de até $0,5 \times DL_{50}$ ou dose limite (2.000mg/kg). Os animais foram sacrificados 3 e 24h após o tratamento e suas vísceras (estômago, cólon, fígado, rins, bexiga, pulmão, cérebro e medula óssea) submetidas ao ensaio do Cometa. De todos os aditivos, os corantes foram os mais genotóxicos, induzindo danos no DNA do estômago, cólon e/ou bexiga. Todos os corantes induziram danos no DNA dos órgãos gastrintestinais nas doses mais baixas testadas (10 ou 100mg/kg). Dois antioxidantes, três fungicidas e quatro adoçantes também induziram danos no DNA dos órgãos gastrintestinais. Os autores acreditam que são necessárias avaliações de genotoxicidade *in vivo* em larga escala para os aditivos alimentares, em função do elevado número de pessoas expostas diariamente aos mesmos.

A genotoxicidade *in vivo* nem sempre resulta em carcinogenicidade, haja vista que esse ensaio detecta o dano no DNA após administração de dose única relativamente alta, enquanto carcinogenicidade é detectada após longo tratamento com doses relativamente menores. O desenvolvimento de tumores em órgãos-alvos não depende somente do nível inicial de dano induzido no DNA ou do seu reparo, mas também de outros fatores, como a produção de metabólitos reativos, sua distribuição e seus efeitos na proliferação celular.¹⁸

Conclusão

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresentou genotoxicidade frente a células VERO, indicando a necessidade da realização de análises toxicológicas *in vivo*.

SCHULZ, D.; BATISTA, C. R. V. Genotoxicity of the crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens* against VERO cells. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. xx, n. xx, p. xx-xx, 2007.

- **ABSTRACT:** The present study aims to obtain one antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, and investigate its genotoxicity against VERO cells. The antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was obtained by techniques of precipitation of proteins, centrifugation, dialysis, sterilization and filtration. The standardization of genotoxicity test was performed by determining the concentration of protein in antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. The investigation of genotoxicity with VERO ATCC-CCL 81 cells was realized by Comet assay, using 60, 80 and 100 µg of protein of the extract the crude. As positive control is used slides prepared with VERO cells treated with a solution of hydrogen peroxide (H₂O₂). The antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was not genotoxic to VERO cells in the concentration of 60µg/mL, but showed genotoxicity in the concentrations of 80 and 100 µg/mL. The indicative of genotoxicity of antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 presented in the Comet assay, indicates the need for the realization of toxicological analysis in vivo.
- **KEYWORDS:** Genotoxicity; *Bacillus amyloliquefaciens*; VERO cells.

Referências bibliográficas

1. BARLOW, S. M. et al. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, Leicester, v. 40, p. 145-191, 2002.
2. BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on anthagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*.** 1993. 157 f. Tese (Doutorado) - University of Strathclyde, Glasgow, 1993.

3. CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 71, p. 1-20, 2001.
4. COLLINS, A. R. et al. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat. Res.**, v. 375, p. 183-193, 1997.
5. DA SILVA, A. G. Propriedades gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p. 1-14.
6. DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Int. Dairy J.**, Cork, v. 16, p. 1058-1071, 2006.
7. FARMACOPÉIA brasileira: generalidades e métodos de análise. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 360p.
8. KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.
9. KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 2, n. 3, p. 103-115, 1995.
10. MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. **Food Biotechnol.**, New York, v. 5, n. 3, p. 305-312, 1991.
11. MIYAMAE, Y. et al. Evaluation of a tissue homogenization that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutat. Res.**, v. 418, p. 131-140, 1998.
12. MORENO, I. et al. Efeito e modo de ação das bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.

13. PALMER, M. Cholesterol and activity of bacterial toxins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 238, p. 281-289, 2004.
14. PIARD, J. C. et al. Purification and parcial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNR 481. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 58, p. 279-284, 1992.
15. ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Review: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J. Chromatogr. B**, v. 722, p. 225-254, 1999.
16. ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **Int. J. Food Microbiol.**, Cork, v. 2489, p. 1-14, 2002.
17. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. 3 ed. New York: CSHL Press, 2001. 2100p.
18. SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutat. Res.**, Hachinohe, v. 519, p. 103-119, 2002.
19. SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidante de compostos fenólicos**. 2004. 70 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
20. SCHULZ, D. **Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
21. SILVA, J. et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v.40 p.941-947, 2002.

22. SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.
23. TICE, R. R. et al. Single Cell Gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.35, p. 206-221, 2000.
24. WESSELS, S.; JELLE, B.; NES, I. **Bacteriocins of the lactic acid bacteria: an overlooked benefit for food.** 1. ed. Horsholm: CHR Hansen, 1998. 85p.