

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**Helen Silvestre da Silva**

**Ação inibitória de *Lactobacillus reuteri* na microbiota de  
camarão (*Litopenaeus vannamei*) refrigerado**

Florianópolis, agosto de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**Ação inibitória de *Lactobacillus reuteri* na microbiota de camarão (*Litopenaeus vannamei*) refrigerado**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira

**Helen Silvestre da Silva**

Florianópolis, agosto de 2010

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Ricardo e Iolanda. Conto sempre  
com seu amor, apoio e incentivo.  
**Amo vocês!**

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço a minha orientadora, Dr. Cleide, pela oportunidade oferecida, pela orientação, pelo aprendizado e pelo crescimento a mim proporcionado. Agradeço muito aos meus amigos que atuam ou atuaram no grupo de pesquisa da microbiologia, Roberta, Andréia, Marília, Letícia, Andressa, Luiz, Isabella. A minha amiga Cléo, sempre por perto quando precisamos. Estar com vocês durante esse tempo me fez uma pessoa muito mais feliz. Aos colegas Pedro, Carol, Tati e todos os outros colegas do Departamento pela sua amizade e ajuda nas horas difíceis. A minha família pela paciência e compreensão com a minha falta de tempo, meu filho amado Ruan, meu marido Anderson e meus pais Iolanda e Ricardo, amo muito vocês, obrigada. Aos professores que aceitaram participar desta banca o meu agradecimento pela colaboração. Aos demais professores e funcionários da pós pela convivência e prestatividade, ao Secretário Sérgio pelo apoio e incentivo. Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

SILVA, H.S. **Ação inibitória de *Lactobacillus reuteri* na microbiota de camarão (*Litopenaeus vannamei*)** 70 p., Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis [2010].

## RESUMO

Em conseqüência ao aumento do interesse dos consumidores por produtos naturais ou minimamente processados, o uso de antimicrobianos naturais pode ser uma alternativa aos métodos utilizados atualmente pela indústria alimentícia. Dessa forma, a aplicação de antimicrobianos naturais vem sendo estudada como alternativa promissora. O microrganismo *Lactobacillus reuteri* é uma espécie heterofermentativa que reside no trato gastrointestinal, vaginal e oral do homem e outros animais de sangue quente e apresenta a capacidade de produzir antimicrobianos. O presente estudo objetiva avaliar a ação antimicrobiana de *L. reuteri* contra bactérias de interesse alimentar e estudar o seu controle sobre a microbiota psicrófila de camarão refrigerado. A avaliação da ação antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em agar e pelos métodos Simultâneo e *Deferred* em caldo. O estudo do controle da microbiota psicrófila de camarão se deu através da aplicação de uma cultura de *L. reuteri* e do seu extrato estéril em amostras de camarão que foram mantidas a temperatura de  $\pm 7$  °C por 48 horas. *L. reuteri* apresentou capacidade de inibir o crescimento de *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae* sendo que a diferença entre a contagem do controle e do teste apresentou diferença estatística. O extrato estéril de *L. reuteri* foi capaz de reduzir a contagem de microrganismos psicrófilos em 2 ciclos Log, enquanto que a sua cultura manteve a contagem inicial dos microrganismos analisados durante o tempo de armazenamento. *L. reuteri* foi eficiente no controle de microrganismos psicrófilos no camarão sugerindo o seu uso como bioconservante em alimentos.

Palavras-chave: *L. reuteri*, atividade antimicrobiana, bioconservação de alimentos

SILVA, H.S. **Inhibitory action of *Lactobacillus reuteri* in the microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*)** 70 p, Dissertation (Master Degree in Food Science) – Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, [2010].

### ABSTRACT

As a result of increased consumer interest in natural or minimally processed products, the use of natural antimicrobials may be an alternative to methods currently used in the food industry. Thus, the application of natural antimicrobials has been studied as a promising alternative. The microorganism *Lactobacillus reuteri* is a heterofermentative species that resides in the gastrointestinal tract, vaginal and oral humans and other warm-blooded animals and has the ability to produce antibiotics. This study aims to evaluate the antimicrobial activity of *L. reuteri* against bacteria of food interest and study its control over the psychrophilic microbiota of chilled shrimp. The evaluation of antimicrobial activity was performed by agar diffusion method and also by simultaneous and deferred methods in broth. The study of control of the psychrophilic microbiota of shrimp was made through the application of *L. reuteri* culture and sterile extract in the samples of shrimp that were kept at a temperature of  $\pm 7^{\circ}\text{C}$  for 48 hours. *L. reuteri* showed ability to inhibit the growth of *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholera*. The sterile extract of *L. reuteri* was able to reduce the count of psychrophilic microorganisms in two log cycles, whereas the culture maintained the initial count during the storage time. *L. reuteri* was proved effective in controlling psychrophilic microorganisms in shrimp suggesting its use as preservative in foods.

Keywords: *L. reuteri*, antimicrobial activity, food preservation.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
INTRODUÇÃO .....	10
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	13
1.2. BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS .....	13
1.3. O GÊNERO <i>LACTOBACILLUS</i> .....	17
1.3.1. OCORRÊNCIA E TAXONOMIA .....	17
1.3.2. A ESPÉCIE <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i> .....	18
1.3.3. Produção de Antimicrobianos por <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	20
1.4. MICROBIOTA DO CAMARÃO .....	23
1.4.1. DECOMPOSIÇÃO MICROBIANA DOS CRUSTÁCEOS .....	25
1.5. CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO ( <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> ) .....	25
1.6. REFERÊNCIAS .....	26
<b>CAPITULO 2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE</b>	
<b><i>LACTOBACILLUS REUTERI</i>.....</b>	<b>36</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	37
2.2. OBJETIVOS .....	39
2.2.1. Objetivos Específicos .....	39
2.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
2.3.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	40
2.3.2. Produção da Cultura de <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	41
2.3.3. Produção do Extrato de <i>Lactobacillus reuteri</i> produzido por fermentação do glicerol .....	41
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
2.5. CONCLUSÕES .....	47
2.6. REFERÊNCIAS .....	47
<b>CAPÍTULO 3: CONTROLE DA MICROBIOTA PSICRÓFILA DE CAMARÃO</b>	
<b>(<i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i>) POR <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i> .....</b>	<b>51</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	52
3.2. OBJETIVOS .....	56
3.2.1. Objetivos específicos .....	56
3.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	56
3.3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	56
3.3.2. Produção da Cultura de <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	57
3.3.3. Produção do extrato de <i>Lactobacillus reuteri</i> produzido por fermentação do glicerol .....	57
3.3.4. Amostra: camarão .....	57
3.3.5. Tratamento das amostras com <i>L. reuteri</i> .....	58
3.3.6. Contagem Padrão em placas de microrganismos psicrófilos .....	58
3.3.7. Análise Estatística.....	58
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
3.5. CONCLUSÕES .....	63
3.6. REFERÊNCIAS .....	63

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.** Foto microscopia óptica: *L. reuteri* em lâmina com coloração de Gram.....**19**
- Figura 2.** (A) Formas Monomérica, (B) Monomérica Hidratada e (C) Dímero Cíclico da Reuterina.....**21**

### Capítulo 2

- Figura1.** Foto das placas apresentando zona de inibição por *L. reuteri*. (a) *B. cereus* e (b) *V. cholerae*.....**43**
- Figura 2.** Gráfico que apresenta as contagens da cepa indicadora no Controle e no Tratamento (Método Simultâneo) após incubação.....**45**
- Figura 3.** Gráfico que apresenta as contagens da cepa indicadora no Controle e no Tratamento (Método *Deferred*) após incubação.....**46**

### Capítulo 3

- Figura 1.** Gráfico que representa a contagem em Log10 de microrganismos psicrófilos do Tratamento 1 (cultura de *L. reuteri*) e do Controle nos tempos de tratamento.....**61**
- Figura 2.** Gráfico que representa a contagem em Log10 de microrganismos psicrófilos do Tratamento 2 (extrato de *L. reuteri*) e do Controle nos tempos de tratamento.....**61**

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.</b> Efeito de agentes antimicrobianos naturais na preservação e qualidade de alimentos.....	<b>14</b>
<b>Tabela 2.</b> Características da Espécie <i>L. reuteri</i> .....	<b>20</b>
<b>Tabela 3.</b> Espectro inibitório da reutericiclina em pH neutro.....	<b>23</b>

### Capítulo 2

<b>Tabela 1.</b> Meios seletivos usados para contagem das cepas indicadoras.....	<b>41</b>
<b>Tabela 2.</b> Diâmetro das zonas de inibição pelo extrato de <i>L. reuteri</i> sobre as cepas indicadoras.....	<b>44</b>

### Capítulo 3

<b>Tabela 1.</b> Procedimentos existentes e emergentes para o controle de microrganismos em alimentos.....	<b>54</b>
--	-----------

## INTRODUÇÃO

Em geral os alimentos, industrializados ou não, contem 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 o 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 ou que sejam minimamente processados, e que não sejam adicionados de produtos químicos.

A indústria alimentícia tem investido muito para atender as exigências dos consumidores. Quem consome quer produtos seguros e mais naturais, porém com uma maior vida útil. Estas exigências, contudo, tem implicações microbiológicas, pois, muitas das mudanças necessárias para obtenção de um produto de aspecto, sabor e composição mais natural, acarretam a também diminuição dos fatores de conservação de um alimento, levando conseqüentemente, a perdas na sua segurança. Portanto, é importante que esta perda potencial seja de alguma forma compensada. É neste ponto que os antimicrobianos naturais encontram seu papel.

Originalmente, especiarias e ervas eram adicionadas para mudar ou melhorar o sabor de alguns alimentos. Algumas destas substâncias também são conhecidas por contribuir para a autodefesa de plantas contra organismos infecciosos.

Em biopreservação, a vida útil do produto é prolongada ou controlada por meio de microbiota natural ou adicionada, principalmente de bactérias ácido lácticas (BAL) ou seus produtos antibacterianos como o ácido láctico, bacteriocinas e outros.

BAL apresentam grande potencial para a aplicação como bioconservadoras de alimentos. Assim, muitos estudos com esses microrganismos vêm sendo desenvolvidos. Dessa forma, o presente estudo foi dirigido com o objetivo de avaliar o potencial da espécie *Lactobacillus reuteri* para a aplicação em alimentos. Sendo assim, o trabalho foi dividido em capítulos onde no capítulo 1 apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre a bioconservação, a aplicação de bactérias lácticas e a microbiota de camarão. O capítulo 2 trata do estudo da ação antimicrobiana de *L. reuteri* sobre bactérias de interesse alimentar por serem patogênicas ou deteriorantes e o capítulo 3 trata do estudo do

controle da microbiota psicrófila de camarão (*Litopenaeus vannamei*) descascado mantido sob refrigeração durante 48 horas.

## **Capítulo 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1 Introdução

Várias técnicas para conservação de alimentos vêm sendo estudadas com o objetivo de substituir tratamentos físicos severos e a adição de conservantes químicos. A biopreservação, que consiste no controle dos microrganismos do alimento através de microbiota natural ou adicionada ou da aplicação de antimicrobianos naturais, torna-se uma alternativa de grande interesse para a indústria alimentícia. A revisão a seguir trás uma visão geral sobre o tema da bioconservação de alimentos e a importância das bactérias ácido lácticas como culturas protetoras. Ainda, aborda temas de importância para o desenvolvimento deste trabalho como a descrição da espécie *Lactobacillus reuteri* e os antimicrobianos por ela produzidos, além de considerações sobre a microbiota dos crustáceos em geral, sua deterioração e mais especificamente sobre a espécie *Litopenaeus vannamei* que foi utilizado neste estudo como alimento modelo.

## 1.2. Bioconservação de Alimentos

O processamento moderno de alimentos é dependente de uma série de tecnologias de conservação para garantir que o alimento seja mantido a um nível aceitável de qualidade desde o momento da fabricação até o consumo. Uma das mais antigas destas tecnologias é a fermentação, um processo dependente da atividade biológica de microrganismos para a produção de uma série de metabólitos que podem suprimir o crescimento e a sobrevivência da microbiota indesejável nos alimentos. A fermentação como uma técnica de conservação de alimentos foi desenvolvida há milhares de anos (FOX, 1993).

Com relação à bioconservação, que se refere à prorrogação da vida útil e melhoria da segurança dos alimentos utilizando microorganismos ou seus metabólitos, culturas *starter* já utilizadas na indústria tem sido alvo constante de estudos. Na verdade, há muitos exemplos que relatam a inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes por BAL (bactérias ácido lácticas), outros grupos de bactérias e compostos isolados de plantas, como apresentado na Tabela 1 (KAO & FRAZIER, 1966; PRICE & LEE, 1970; KLAENHAMMER, 1988; HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

O crescimento, sobrevivência ou atividade de qualquer espécie microbiana em um alimento, seja de organismos deteriorantes não desejáveis, patógenos ou agentes de

bioconservação, em muitos casos será determinado pela presença de outras espécies (FLEET, 1999; GIRAFFA, 2003). Para ROSS *et al.* (2002), está ocorrendo um crescimento no arsenal de bioconservativos potenciais que podem ser usados isoladamente ou em combinação para proteger os alimentos contra patógenos e deterioradores.

Os métodos modernos de preservação biológica ajudam a reduzir os riscos a saúde sem alterar as características sensoriais do produto (HOLZAPFEL *et al.*, 1995). Vários microrganismos já foram avaliados como agentes de bioconservação (MEZIANE *et al.*, 2006; CALVO *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2007). Vários sistemas comerciais de bioconservação podem ser encontrados no mercado, tais como Microgard® 100 (SALIH *et al.* 1990), Microgard® 300 (ALZOREKY *et al.* 1991), nisina (STEVENS *et al.*, 1992), Alta® (SALIH *et al.*, 1990; ALZOREKY *et al.*, 1991) e Perlac® (SALIH *et al.*, 1990; ALZOREKY *et al.*, 2002).

Tabela 1. Efeito de agentes antimicrobianos naturais na preservação e qualidade de alimentos

Produto Alimentar	Agente		Atributos de Qualidade	Referências
	Antimicrobiano (concentração)	Dinâmica Microbiana		
Iogurte de frutas	vanilina (2000 ppm)	Leveduras, bactérias (retardo do crescimento)	Vida de prateleira (↑)	Penney, et al., 2004.
Suco de tomate	óleo de alho (0,1%)	Contagem Total (3,9 RL)	Vida de prateleira (↑)	Nguyen and Mittal, 2007.
	nisina (0,004%)	Contagem Total (↓)		
Salada de frutas pronta para consumo	citral (25-125 ppm)	Leveduras e bactérias lácticas (LAB) (retardo do crescimento)	Vida de prateleira (↑)	Molinos, et.al., 2008.
Melancia minimamente processada	nisina (25 µg/mL)	<i>L. monocytogenes</i> (0.8 RL)	Qualidade (↑)	Ukuku, et. al., 2006.
Vegetais minimamente processados	nisina	<i>Pseudomonas</i> (<1 RL)	Vida de prateleira (↑)	Uyttendaele, et. al., 2004.
		<i>Aeromonas</i> spp (2 RL) contagem total ( 5.44 RL)		
Vinho	reuterina (8 AU/mL)	LAB (MIC = 0.39 mg/mL)		Beatriz, al, al., 2007.
Carne de frango	nisina	<i>L. monocytogenes</i> (4.59 RL)		Arques, al, al., 2004.
		<i>L. innocua</i> (3.8 RL)		
		<i>E. coli</i> (<1 RL)	Vida de prateleira (↑)	Lemay, al, al., 2002.

UA: unidades arbitrarias foram definidas como a recíproca da maior diluição, que não permitiu o crescimento da cultura indicadora.  
AC: teor de antocianinas. ↑ e ↓ indicam aumentar ou diminuir, respectivamente. LR: redução do log microbiano.

Com o maior conhecimento da complexidade das interações microbianas, combinado a fatores de conservação existentes nos sistemas alimentares, novos métodos

têm possibilitado a preservação biológica com o uso das chamadas culturas protetoras (HOLZAPFEL *et al.*, 1995). DEVLIEGHERE *et al.*, 2004 definem o termo cultura protetora como sendo culturas antagonistas que são adicionadas no alimento apenas para inibir patógenos e prolongar a vida útil, causando poucas alterações nas propriedades sensoriais do produto, sendo o efeito antagonista relacionado com a inibição de outros microrganismos pela competição por nutrientes e pela produção de muitos metabólitos antimicrobianos ativos. HOLZAPFEL *et al.*, 1995 discutem o mecanismo básico de inibição por culturas protetoras, especial referência é feita as BAL.

As BAL são promissoras como culturas protetoras, sendo a maioria dos representantes desse grupo de bactérias inofensivas a saúde humana, e algumas são reconhecidas como GRAS (Generally Recognised As Safe). Algumas dessas bactérias são usadas como probióticos e podem fornecer benefícios substanciais à saúde humana como estabilizar e normalizar o trato gastrointestinal. Outras estirpes estão associadas com ação anticancerígena e antitumoral. Estas características relacionadas à saúde podem servir como uma vantagem adicional na seleção e aplicação de culturas protetoras. Os avanços e o aumento do conhecimento da fisiologia e biologia moléculas das BAL, somando-se o progresso nas técnicas de seleção e de cultura, dão razão ao otimismo em relação ao desenvolvimento de culturas protetoras melhoradas (HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

HUGAS (1995) demonstrou que a bioconservação aumenta a vida útil e a segurança de carnes e derivados através do uso de uma microbiota natural ou controlada, principalmente BAL. Para ADAMS & NICOLAIDES (1997) ao usar BAL para segurança alimentar, com exceção de enterococos, o risco de infecção é muito baixo, particularmente tendo em vista a ocorrência destas bactérias em número substancial em carnes e vegetais e seu uso desde a antiguidade na produção de uma variedade de produtos fermentados, onde elas ocorrem em grande número. Exemplos de inibição de deterioradores e patógenos por BAL podem ser encontrados em KLAENHAMMER (1993) e HOLZAPFEL *et al.* (1995).

Alguns autores demonstraram os fatores que contribuem para a atividade antimicrobiana das BAL (LINDGREN & DOBROGOSZ, 1990; HOLZAPFEL *et al.*, 1995; ADAMS & NICOLAIDES, 1997). AMMOR *et al.* (2006) testaram as atividades antibacterianas das BAL contra microrganismos indicadores e patogênicos isolados de

instalações processadoras de alimento, com o objetivo de selecionar estirpes que pudessem ser usadas como bioconservadoras. Estes autores sugerem a possibilidade de uso de bioconservadores no controle de biofilmes formados por *L. innocua*, *H. alvei* e *S. aureus*. TOPISIROVIC *et al.* (2006) também demonstraram o potencial das BAL na conservação de alimentos.

DEVLIEGHERE *et al.* (2004) afirmaram que os estudos com culturas bacteriocigênicas têm sido focalizados principalmente na inibição de patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes*, pouco se conhecendo sobre a atividade dessas culturas protetoras contra organismos deterioradores específicos em diferentes tipos de alimento. Uma alternativa ao uso de culturas bacteriocigênicas é a utilização de culturas altamente competitivas como *Lactobacillus alimentarius* (ANDERSEN, 1995), *Lactobacillus sakei* (BREDHOLT *et al.*, 2001; TANTILLO *et al.*, 2002), *Lactococcus lactis* (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004), *Lactobacillus plantarum* (BERNBOM *et al.*, 2006) e *Lactobacillus acidophilus* (CHIODA *et al.*, 2007). Uma das hipóteses do caráter antagonista destas culturas, proposta por JUVEN *et al.* (1994), baseia-se na produção de ácido lático que provocaria acidificação, detendo o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas. Entretanto, DEVLIEGHERE *et al.* (2004) reconheceram que uma explicação mais completa desta inibição provavelmente é mais complexa, podendo ocorrer devido a combinação de efeitos tais como a produção de antimicrobianos e a competição pelo esgotamento de nutrientes específicos.

As bactérias produzem muitos compostos que são ativos contra outros microrganismos, que podem ser aproveitadas para inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes ou potencialmente patogênicos. Estes incluem produtos finais de fermentação, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e diacetil, além de bacteriocinas e outros compostos antagônicos como a reuterina (DAESCHEL, 1989). A produção destes compostos pode ser explorada para fornecer uma barreira adicional para crescimento de bactérias indesejáveis nos alimentos.

A atividade antimicrobiana dos ácidos lático e acético é, em parte, devido ao fato de que estes ácidos na forma não dissociada podem atravessar a membrana celular microbiana reduzindo o pH intracelular, que irá interferir com importantes funções metabólicas (NAIDU *et al.*, 1999). O ácido acético possui um efeito inibitório mais acentuado, uma vez que sua constante de dissociação é maior que a do ácido lático (PIARD & DESMAZEAUD, 1991).

Os compostos antimicrobianos de natureza não-proteica já descritos na literatura, possuem as seguintes características: pequeno tamanho (massa molecular menor que 1 KDa), estrutura química heterocíclica ou aromática, e amplo espectro de ação antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (NIKU-PAAVOLA *et al.*, 1999). As seguintes substâncias são descritas na literatura como sendo de natureza não protéica: reuterina (produzida por *L. reuteri*), metilhidatoína, acetaldeído e D.isômeros de aminoácidos (NIKU-PAAVOLA *et al.*, 1999).

Por sua vez, o termo bacteriocina somente foi introduzido por JACOB *et al.*, em 1953. Esses pesquisadores definiram as bacteriocinas como proteínas antibacterianas, caracterizadas pela biosíntese letal e ativa, contra linhagens da mesma espécie, ligando-se a receptores específicos na superfície de células bacterianas (JACK *et al.*, 1995). Atualmente o termo bacteriocina abriga uma ampla variedade de peptídeos e proteínas antimicrobianos produzidos por bactérias Gram-positivas com variados espectros e mecanismos de ação, tendo alguns deles, mas não todos, sua ação mediada por receptores específicos (Asaduzzaman *et al.*, 2009; Zouhir *et al.*, 2010). Peptídeos com tais características produzidos por bactérias Gram-negativas são chamados microcinas (Jack & Jung, 2000).

Somando-se aos mais tradicionais e emergentes sistemas empregados para se obter uma vida de prateleira desejável existe a pressão dos consumidores por meios mais naturais para a conservação dos alimentos (ROBERTS & HOOVER, 1996; ROLLER, 1995; GOULD, 1996). Este fato tem concentrado a atenção em uma extensa faixa de sistemas antimicrobianos naturais extremamente efetivos que podem ser usados em alimentos (GOULD, 1996). A dinâmica destes sistemas pode contribuir de diversas maneiras para o controle de patógenos e a melhoria da qualidade sensorial dos alimentos.

### **1.3.0 Gênero *Lactobacillus***

#### **1.3.1. Ocorrência e Taxonomia**

Os lactobacilos são bactérias fastidiosas, encontrados em uma variedade de ambientes ricos em nutrientes, tais como carne e laticínios, material vegetal, mucosas

animal e do homem, esgoto e fezes animais (HAMMES & HERTEL, 2006). São bactérias Gram-positivas, não esporogênicas, não-móveis, catalase negativas e microrganismos que fermentam carboidratos de alimentos, geralmente considerados como seguros (AJAY & RAMANA, 2009).

O gênero *Lactobacillus* é um grupo heterogêneo de BAL, composto por bactérias com diferentes propriedades fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas. Essa heterogeneidade é refletida pelo conteúdo de Guanina + Citosina do genoma, que varia de 32 a 54% entre as espécies incluídas. A heterogeneidade e a grande quantidade de espécies são duas características que definem o gênero (SALMINEN *et al*, 2004). A caracterização genética também revelou que antiga classificação dos lactobacilos em homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios é apenas parcialmente ligada à filogenia. Seqüenciamento dos genes 16S rRNA tem sido utilizado para dividir atualmente o gênero em mais de cem espécies agrupadas em sete (HAMMES & HERTEL, 2006) ou 12 (FELIS & DELLAGLIO, 2007) grupos filogenéticos. No entanto, o agrupamento do gênero pode ser objeto de futuras mudanças à medida que mais seqüências inteiras do genoma tornam-se disponíveis e novas espécies são continuamente identificadas (CLAESSON *et al.*, 2008).

As espécies do gênero *Lactobacillus* são amplamente distribuídas na natureza, e muitas delas têm sido aplicadas pela indústria alimentícia. Elas são geralmente as espécies mais ácido-tolerantes e algumas são isoladas de produtos fermentados como silagens, vegetais fermentados, etc (SALMINEN *et al.*, 2004).

### **1.3.2. A espécie *Lactobacillus reuteri***

O microrganismo *Lactobacillus reuteri* é uma espécie heterofermentativa que reside no trato gastrointestinal (TGI), vaginal e oral do homem e outros animais de sangue quente (HAMMES & HERTEL, 2006). Algumas cepas de *L. reuteri* são usadas como probióticos. A empresa BioGaia AB da Suécia possui várias cepas com um grande número de diferentes patentes para o uso comercial de *L. reuteri*.

Logo tenha sido descoberto *L. reuteri* foi incluído na classificação científica de bactérias do ácido láctico (BAL), embora neste momento ele tenha sido erroneamente classificado como uma cepa de *Lactobacillus fermentum*. Na década de 1960 o alemão

microbiologista Gerhard Reuter, começou a distinguir *L. reuteri* de *L. fermentum*. REUTER (1965) reclassificou a espécie como "*Lactobacillus fermentum* biótipo II".

*L. reuteri* foi finalmente identificada como uma espécie distinta em 1980 por KANDLER & WEISS (1986). Foram encontradas diferenças significativas entre *L. reuteri* e outros biótipos de *L. fermentum*, e, assim, a espécie ganhou identidade formal. Eles escolheram o nome da espécie "reuteri" em homenagem ao seu descobridor Gerhard Reuter, e *L. reuteri* desde então tem sido reconhecida como uma espécie separada dentro do gênero *Lactobacillus*. No início de 1980, logo após o seu reconhecimento como uma espécie distinta, os cientistas começaram a encontrar *L. reuteri* em muitos ambientes naturais. *L. reuteri* foi isolado a partir de muitos alimentos, especialmente carnes e produtos lácteos (KANDLER & WEISS, 1986; REUTER, 1965; DELLAGLIO & TORRIANI, 1986).

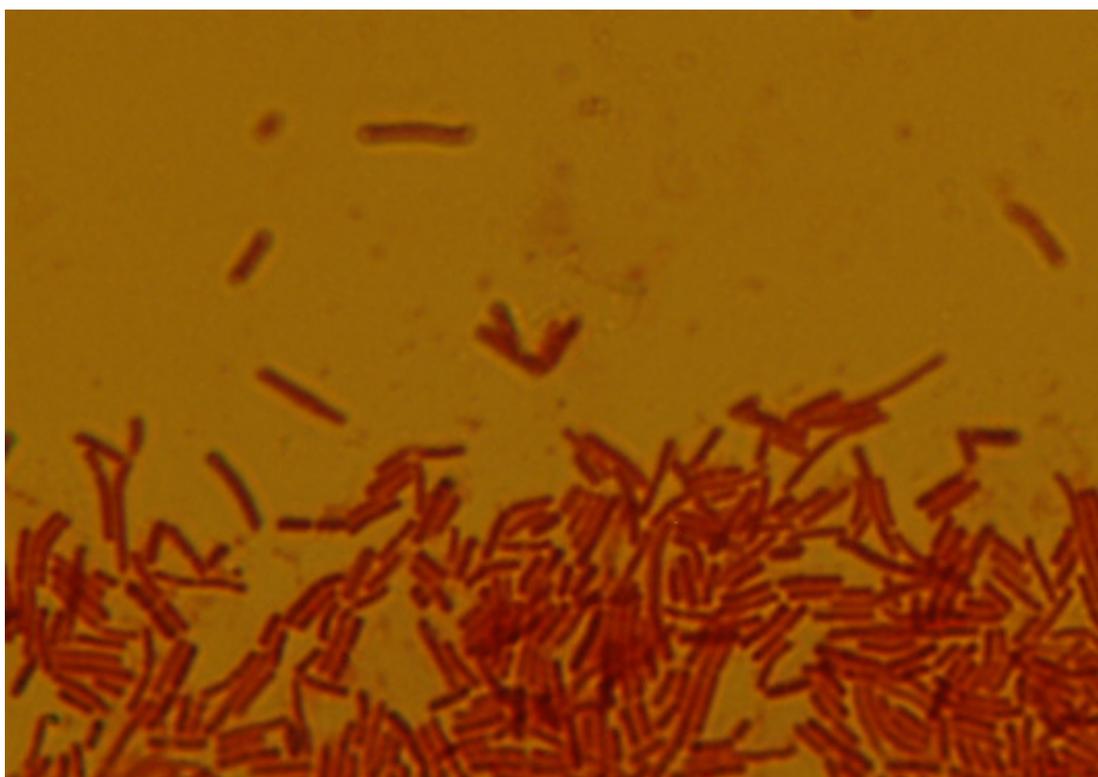


Figura 1. Foto microscopia óptica: *L. reuteri* em lâmina com coloração de Gram.

O interesse em *L. reuteri* começou a aumentar à medida que os cientistas começaram a encontrá-lo colonizando o intestino de animais saudáveis. Gerhard Reuter isolou pela primeira vez *L. reuteri* intestinal de humanos e fezes na década de 1960, e este trabalho foi depois repetido por outros pesquisadores (MOLIN, 2001).

### 1.3.3. Produção de Antimicrobianos por *Lactobacillus reuteri*

A ação probiótica de *L. reuteri* é atribuída a sua capacidade de exercer um efeito inibitório sobre microrganismos patogênicos com uma combinação de diversos mecanismos, incluindo a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas (Tabela 2). *L. reuteri*, como todas as BAL, é capaz de converter açúcares em ácido láctico com produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, *L. reuteri* fermenta carboidratos e ácidos graxos de cadeia curta (CASAS & DOBROGOSZ, 2000).

Tabela 2. Características da espécie *L. reuteri* (CONNOLLY *et al.*, 2004).

% (G+C) do DNA	40-42
Tipo de ácido láctico produzido	DL
Quantidade de ácido láctico produzido	<1%
Hidrolise de arginina	Positivo
Temperatura ótima de crescimento	37° - 38°C
Temperatura máxima de sobrevivência	45°-47°C
Sobrevivência a 15°C	Negativo
Metabolismo	Heterofermentativo

#### 1.3.3.1. Reuterina

Um composto primário produzido por *L. reuteri*, reuterina, não apresenta componentes protéicos e é produzido durante a fermentação do glicerol. Reuterina,  $\beta$ -hydroxypropionaldeído (3-HPA), derivado do glicerol, é produzida em condições de anaerobiose e apresenta efeitos de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, bem como fungos, leveduras e protozoários (SPINLER *et al.*, 2008). O amplo espectro de atividade antimicrobiana de *L. reuteri* tem sido considerado um recurso terapêutico importante e confere potencial para a prevenção ou tratamento de infecções (ANUKAM *et al.*, 2006; ROSENFELDT *et al.*, 2002; YUNMBAM & ROBERTS & HOOVER, 1996).

A reuterina é um composto neutro, de baixo peso molecular capaz de inibir o crescimento de muitas espécies de bactérias, inclusive *Escherichia*, *Salmonella*,

*Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Staphylococcus* e outros organismos como leveduras, fungos e protozoários, muitos dos quais são patogênicos para o homem (TALARICO & DOBROGOZS, 1989). É uma substância solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas (EL-ZINEY *et al.*, 1989).

A reuterina existe como uma mistura em equilíbrio das formas monomérica, monomérica hidratada e dimérica cíclica de b-hydroxypropionaldehyde (Figura 2). Os principais grupos funcionais da molécula de reuterina foram determinados através de Spectrofotometria de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros continham um pico devido a (C-O), uma banda ampla e alongada (O-H), indicando a funcionalidade hidroxila. Isto é, além de um trecho (C = O) junto com trechos (C-H) que ilustram a presença de aldeídos (EL-ZINEY *et al.*, 2000).

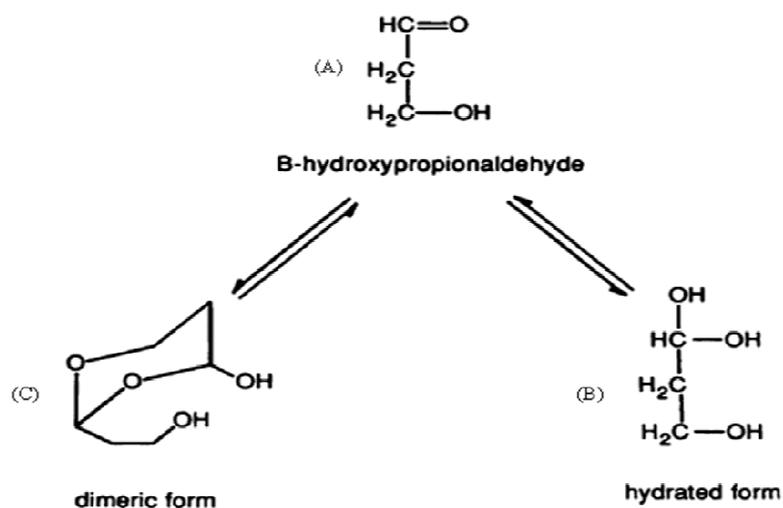


Figura 2. (A) Formas Monomérica, (B) Monomérica Hidratada e (C) Dímero Cíclico da Reuterina.

O modo de ação da reuterina é atribuído ao fato de ela ser considerada um análogo da D-ribose sendo capaz de inibir a síntese de DNA por inibir a ribonucleotideo redutase envolvida no primeiro passo da síntese de novos ribonucleotídeos para a síntese do DNA. Isso foi observado ao testar o efeito inibitório da reuterina contra subunidades B1 e B2 purificadas da ribonucleotideo redutase isolada de *E. coli*. Reuterina causou uma inibição de 50% da atividade da subunidade B. Essa inibição da atividade da ribonucleotideo redutase explicar o amplo efeito antimicrobiano. Nesses experimentos, também foi demonstrado que a Thioredoxina, outra enzima sulfidrílica, foi inibida pela reuterina. Isto sugere que o mecanismo de ação da reuterina pode ser

direcionado para as enzimas sulfidril. Até agora não está demonstrado que uma das três formas de reuterina ou qual combinação é a entidade ativa de origem biológica. É também difícil verificar as mudanças que podem ocorrer na concentração relativa ou eficácia biológica dessas entidades sob diferentes condições ambientais. Além disso, a maior resistência de BAL e em menor medida de algumas cepas de *Listeria sp.* e algumas outras bactérias, ainda precisa ser explicada (EL-ZINEY *et al.*, 2000).

A atividade inibitória da reuterina contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 foi investigada em leite, queijo cottage e carne (EL-ZINEY *et al.*, 1989). Reuterina foi bactericida em leite a 37 °C, inativando vários patógenos Gram-negativos, ao passo que a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* foi somente bacteriostática (ARQUÉS *et al.*, 2004).

ARQUÉS *et al.* (2004) sugere a aplicação de reuterina em leite e outros produtos lácteos para inibir bactérias patogênicas presentes devido à contaminação pós-pasteurização.

#### **1.3.3.2. Outros compostos antimicrobianos produzidos por *L. reuteri***

TOBA *et al.* (1991) em sua pesquisa relataram o isolamento de uma bacteriocina, produzida por uma cepa isolada de fezes de crianças, a qual deram o nome de Reutericina 6. Essa bacteriocina, reutericina 6 inibiu o crescimento de algumas espécies do gênero *Lactobacillus*, mas não de outras bactérias. Reutericina 6 pode desempenhar um papel importante permitindo que *L. reuteri* seja a espécie dominante entre os lactobacilos heterofermentativos.

Posteriormente, reuteriociclina, um ácido tetrâmico, foi purificada a partir de culturas de *Lactobacillus reuteri* isoladas de humanos (GÄNZLE *et al.* 2000; HÖLTZEL *et al.*, 2000). Ela é o primeiro antibiótico de baixo peso molecular de bactérias lácticas.

A atividade inibitória da reuteriociclina foi testada contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como leveduras e fungos. Uma visão geral sobre a sensibilidade de vários microorganismos a ela é dada na Tabela 3 (GÄNZLE *et al.*, 2000).

Tabela 3. Espectro inibitório da reuteriicina em pH neutro (GÄNZLE, 2004)

Organismos	Número e tipo das cepas
<i>Lactobacillus</i>	>30 cepas representando 17 espécies; 5 cepas resistentes de <i>L. brevis</i> e <i>L. plantarum</i>
<i>Enterococcus</i>	4 cepas de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>
<i>Staphylococcus</i>	7 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (9 cepas)
Gram-negativos entéricos	<i>Escherichia coli</i> (4 cepas, incluindo 1 cepa EHEC) e <i>Salmonella entérica</i> (2 cepas)
Fungos e leveduras	<i>Fusariums spp.</i> , <i>Brettariomyces spp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida krusei</i>

Reuteriicina é altamente hidrofóbica e carregada negativamente (GÄNZLE *et al.* 1999). O peso molecular é 350, correspondendo a uma fórmula molecular  $C_{20}H_{31}NO_4$ . A estrutura e a atividade antibacteriana da reuteriicina foram confirmadas com reuteriicina racêmica obtida através de síntese química (MARQUARDT *et al.*, 2000).

Geralmente, as bactérias Gram-positivas são sensíveis à reuteriicina, e as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, bem como o patógeno oportunista *Enterococcus faecium* são inibidas por ela (GÄNZLE, 2004).

#### 1.4. Microbiota do Camarão

A carne e os órgãos internos de peixes e frutos do mar recém capturados são normalmente estéreis, no entanto na pele, guelras e vísceras encontram-se bactérias (ICMSF, 1985).

No entanto, a microbiota do pescado vivo depende da carga microbiana das águas onde ele habita. Conseqüentemente, após a captura, o processamento e armazenamento são essenciais para que não se propicie condições para o crescimento bacteriano, garantindo assim, um produto sem riscos a saúde pública (FRAZIER & WESTHO, 1993; JAY, 1999; ICMSF, 1985).

A microbiota natural dos crustáceos marinhos de águas temperadas é composta predominantemente de bacilos Gram-negativos, no caso dos camarões tropicais, a

microbiota é composta por micrococcos, corineformes e bacilos Gram-negativos (ICMSF, 1985).

Os produtos marinhos tropicais e subtropicais contêm em sua microbiota natural *Pseudomonas* em número insignificante em relação à população total. Existem várias possíveis razões para a deterioração subsequente por *Pseudomonas*, as quais envolvem uma ou mais das seguintes: (1) tempo de geração mais curto do que os outros organismos, (2) reações antagonísticas ou sinérgicas, (3) habilidade de atacar moléculas de proteínas com alto peso molecular, e (4) atividade bioquímica (BEIRÃO, *et al.*; 2001).

Segundo HUSS e colaboradores (2000) existem dois grupos relevantes de bactérias que contaminam os produtos marinhos: o primeiro grupo compreende as que estão presentes naturalmente no ambiente como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*; enquanto o segundo grupo aquelas presentes devido à contaminação de resíduos humanos como *Salmonella* sp, *Shigella* sp e *Escherichia coli* (*Enterobacteriaceas*).

VANDENBERGHE & THOMPSON (2003) relataram que os vibrios são os microrganismos mais importantes na aquicultura, por infectarem organismos marinhos como crustáceos, várias espécies de peixes e moluscos. Algumas espécies de *Vibrios* sp, como o *Vibrio alginolyticus* e *V. fluvialis* são caracterizadas como microrganismos naturais de meios marinhos e camarões (HOSSEINI & CHERAGHALI, 2003).

Em camarões, caranguejos, lagostas e pescados em geral, tem-se encontrado espécies dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Acaligenes* e *Proteus* (ICMSF, 1985; JAY, 2005).

A transmissão de bactérias patogênicas de origem entérica, procedentes de águas residuais humanas ou animais via produtos marinhos, incluindo *Salmonella* sp, têm sido relatada. É possível afirmar, que sorotipos desta bactéria encontrados em águas poluídas sejam provenientes de humanos (ICMSF, 1985). A pesquisa de coliformes a 45°C e *Escherichia coli* fornece com maior segurança, informações sobre suas condições higiênico-sanitárias e indicam a presença de enterobactérias possivelmente patogênicas (FRANCO & LANDGRAF, 2007).

#### **1.4.1. Decomposição microbiana dos crustáceos**

Diversos fatores podem influenciar na velocidade de decomposição do pescado, tais como: (1) número inicial de bactéria, (2) condições de armazenagem (temperatura, umidade e atmosfera gasosa), (3) tipo de pescado (certos produtos marinhos contêm altos níveis de osmorreguladores na forma de nitrogênio não protéico, por exemplo, aminoácidos, óxido de trimetilamina ou uréia, que estão prontamente disponíveis para a bactéria, (4) temperatura da água de captura do pescado (diversos peixes e crustáceos são capturados em águas frias, portanto a microbiota não é efetivamente inibida pela refrigeração como é a microbiota normal de animais de sangue quente), (5) local e método de processamento (a bordo do navio ou barcos, *versus* planta industrial) (BEIRÃO *et al.*; 2000).

As proteínas de produtos marinhos sofrem uma pronunciada decomposição pela ação das bactérias, com formação de compostos tóxicos e com odor pútrido. O músculo do animal vivo ou recém abatido normalmente é estéril, mas um grande número de bactérias está presente. Quando o animal morre, as bactérias gradualmente penetram nos músculos. A decomposição é particularmente intensa quando o produto sai do *rigor mortis*, e as bactérias têm como substrato os produtos hidrolisados formados como resultado da autólise, ou seja, aminoácidos, óxido de trimetilamina, histídina, uréia, etc., que ocorrem no músculo (BEIRÃO, *et al.*; 2000).

A alteração microbiana da carne dos crustáceos é um processo proteolítico (ICMSF, 1985). Devido à anatomia destes organismos, supõe-se que as alterações iniciam-se na superfície externa. Os crustáceos apresentam 300mg de nitrogênio/100g de carne, em aminoácidos livres e substâncias nitrogenadas voláteis, o que os torna muito sensíveis aos microrganismos deteriorantes (JAY, 2005).

#### **1.5. Camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*)**

A espécie de camarão *L. vannamei* pertence ao Filo *Arthropoda*, Classe *Crustácea*, Ordem *Decapoda*, Família *Penaeidae* e Gênero *Penaeus*. Requer temperaturas na faixa de 24 a 32°C, podendo tolerar de 12 a 38°C. Apresentam grande tolerância às variações de salinidade; de 0 a 60‰, embora prefiram salinidades na faixa de 25 a 35‰. É tolerante ao manuseio, apresenta boa taxa de conversão alimentar e o

nível protéico da ração não precisa ser elevado (20 a 25%) (SAINT-BRISSON, 1999). É nativo do Oceano Pacífico, ocorrendo naturalmente desde a costa do Peru até a Califórnia em profundidades que variam de 0 a 72 metros (ARANA, 1999).

Por ser uma espécie exótica, seu processo de adaptação, consolidação e disseminação, necessitou ser profundamente pesquisado, desde a produção de pós-larvas, tipo de ração a ser fornecida para este animal, e transformações dos processos tecnológicos envolvidos desde o manejo até o processamento do produto final (ANDREATTA, *et al.*, 2004).

## 1.6.Referências

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

ADAMS, M.R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v. 8, p. 227-239, 1997.

AJAY, P., RAMANA, K.V. Isolation and preliminary characterization of a nonbacteriocin antimicrobial compound from *Weissella paramesenteroides* DFR-8 isolated from cucumber (*Cucumis sativus*). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 499-503, 2009.

ALZOREKY, N.S.; NAKAHARA, K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 223–230, 2002.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I.; 1. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 2. Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. **Food Control**, v. 17, p. 462–468, 2006

ANDERSEN, L. Biopreservation with FloraCarn L-2. **Fleischwirtschaft**, v. 75, p. 711-712, 1995.

ANDREATTA, E.R.; Taylor, J. Minimizing the effects of stress during eyestalk ablation of *Litopenaeus vannamei* females with topical anesthetic and a coagulating agent. **Aquaculture** (Amsterdam), v. 233, p. 173-179, 2004.

ANUKAM, K.C., OSAZUWA, E., OSEMENE, G.I., EHIGIAGBE, F., BRUCE, A.W., REID, G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v. 8 (12-13), p. 2772-2776, 2006.

ARANA, L.A.V. **Aqüicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira.** Florianópolis: Editora da UFSC, 1999.

ARQUES, J.L.; FERNANDEZ, J.; GAYA, P.; NUNEZ, M.; RODRIGUEZ, E.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95 (2), p. 225–229, 2004.

ASADUZZAMAN, S.M.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107 (5), p. 475–487, 2009.

BEIRÃO, L.H., TEIXEIRA, E., MEINERT, E.M. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e Workshop “Tecnologia para Aproveitamento Industrial de Pescado”, Campinas, Resumos, Campinas, ITAL, p.38-84, 2000.

BERNBOM, N.; LICHT, T.R.; SAABDYE, P.; VOGENSEN, F.K.; NØRRUNG, B. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *Listeria monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 10-14, 2006.

BREDHOLT, S.; NESBAKKEN, T.; HOLCK, A. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 191-166, 2001.

CALVO, J.; CALVENTE, V.; ORELLANO, M.E.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M.I.S. Biological control postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 251-257, 2007.

CASAS, I.A., DOBROGOSZ, W.J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, p. 247-285, 2000.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; GAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, v. 37, p. 583-585, 2007.

CLAESSON, M.J., VAN SINDEREN, D. & O'TOOLE, P.W. *Lactobacillus* phylogenomics--towards a reclassification of the genus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58(Pt 12), p.2945-2954, 2008.

CONNOLLY, E.; VALEUR, N.; ENGEL, P.; CARBAJAL, N.; LADEFOGED, K. Colonization and Immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the Human Gastrointestinal Tract. **Applied Environmental Microbiology**, v.70,p. 1176-1181, 2004.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; VINAS, I. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 873-878, 2002.

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

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**, v. 18 (2&3), p. 191-208, 2002.

DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria from maize silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 60, p. 83-93, 1986.

DEVLEIGH, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 191-166, 2001.. V. 21 (6), p.703–714, 2004.

EL-ZINEY, M.G.; VAN DEN TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.M.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. **Journal Food Protection**, v. 62, p.257–261, 1989.

EL-ZINEY, M.G.; DEBEVERE, J.M.; JAKOBSEN, M. Reuterin. In: NAYDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC, Florida, p. 567-587, 2000.

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

FLEET, G.H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 101-117, 1999.

FOX, P.F. Cheese: an overview. In: Fox, P.F. (Ed.), **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Chapman & Hall, London, England, p. 1 –36, 1993.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia do alimentos**. São Paulo:

Atheneu, 182p. 2007.

FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Acribia, 465p, 1993.

GANZLE, M.G.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. **International Journal Food Microbiology**, v. 48, p. 37–50, 1999.

GANZLE, M.G.; HOLTZEL, A.; WALTER, J.; JUNG, G.; HAMMES, W.P. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.4325–4333, 2000.

GANZLE, M.G. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.326–332, 2004.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2003.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 51-64, 1996.

HAMMES, W. & HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: **The Prokaryotes**. p. 320-403, 2006.

HELANDER, I.M.; NURMIAHO-LASSILA, E.L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. **International Journal Food Microbiology**, v. 71, p. 235–244, 2001.

HOLTZEL, A., GANZLE, M.G., NICHOLSON, G.J., HAMMES, W.P., JUNG, G. The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, p. 2766–2768, 2000.

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

HOSSEINI, H.; CHERAGHALI, M. A.; *et al.* Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. **Food Control**, 2003.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; MONFORT, J.M. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494. **Journal Applied Bacteriology**, v. 79 (3), p. 322–330, 1995.

HUSS, H. H.; REILLY, A. & EMBAREK, K. B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, v. 11, p. 149-156, 2000.

ICMSF. **Ecologia Microbiana de los Alimentos 2**, Espanha: Zaragoza, 1985.

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

JACK, R.W.; JUNG, G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.4, p.310–317, 2000.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626–631, 1994.

KANDLER, O. & WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** Vol. 2, ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S. & Sharpe, M.E. p. 1209-1234. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

KAO, C.T., FRAZIER, W.C. Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 251– 255, 1966.

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

LINDGREN, S.E.; DOBROGOSZ, W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 87, p. 149–163, 1990.

MARQUARDT, U., D. SCHMID, AND G. JUNG. Racemic synthesis of the new antibiotic tetramic acid reutericyclin. **Synlett**. p.1131–1132, 2000.

MEZIANE, H.; GAVRIEL, S.; SMAILOV, Z.; CHET, I.; CHERNIN, L.; HOFTE, M. Control of green and blue mould on Orange fruit by *Serratia plymuthica* strain IC14 and IC1270 and putative modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, p. 125-133, 2006.

MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or Milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73(2 Suppl), p. 380S-385S, 2001.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal Food Protection**, v. 59,p. 54-63, 1996.

NAIDU, A.S., BIDLACK, W.R., CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 13-126, 1999.

NIKU-PAAVOLA, M.L., LAITILA, A., MATTILA-SANDHOLM, T., HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 29-35, 1999.

PRICE, R.J.; LEE, J.S. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 33, p.13–18, 1970.

REUTER, G. Das vorkommen von laktobacillen in lebensmitteln und ihr verhalten im menschlichen intestinaltrakt. **Zbl Bak Parasit Infec Hyg I Orig.**, v.197S, p.468-87, 1965.

ROBERTS, C.M.; HOOVER, D.G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. **Journal Applied Bacteriology**, v. 81 (4), p.363–368, 1996.

ROLLER, S. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on a European Research project. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 36, p. 333-345, 1995.

ROSENFELDT, V.; MICHAELSEN, K.F.; JAKOBSEN, M.; LARSEN, C.N.; MOLLER, P.L.; PEDERSEN, P. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. **Journal Pediatric Infect Disease**, v.21, p.411–416, 2002.

ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.3-16, 2002.

SAINT-BRISSON, S.C. **Cultivo de camarões marinhos**. Rio de Janeiro: 1999.

SALIH, M.A.; SANDINE, W.E.; AYRES, J.A. Inhibitory effect of Microgard on yoghurt and cottage cheese spoilage organisms. **Journal Dairy Science**, v. 73, p. 887-889, 1990.

SALMINEN, S.; ATTE VON WRIGHT,.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. CRC Press, 4<sup>o</sup> edition, p. 656, 2004.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W.H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Science Technology**, v.7, p.158-164, 1996.

SPINLER, J.K.; TAWEECHOTIPATR, M.; ROGNERUD, C.L.; OU, C.N.; TUMWASORN, S.; VERSALOVIC, J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe**, 2008.

STEVENS, K.A., SHELDON, B.W., KLAPES, N.A., KLAENHAMMER, T.R. Effective treatment conditions on nisin inactivation of Gram negative bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 763–766, 1992.

TALARICO, T.L.; DOBROGOSZ, W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents Chemotherapeutics**, v.33, p.674–679, 1989.

TANTILLO, M.G.; DI, P.A.; NOVELLO, L. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* as starter culture in dry sausages. **New Microbiology**, v. 25, p. 45-49, 2002.

TOBA T., SAMANT S.K., YOSHIOKA E., ITO T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **Letters Applied Microbiology**, v.13, p.281–286, 1991.

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of acid lactic bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 230-235, 2006.

VANDENBERGUE, J.; THOMPSON, F. L.; *et al.* Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. **Aquaculture**, vol. 219, p. 09 – 20, 2003.

YUNMBAM, M.K.; ROBERTS, J.F. In vivo evaluation of reuterin and its combinations with suramin, melarsoprol, DL-alpha-difluoromethylornithine and bleomycin in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. **Comparative Biochemistry Physiology C**, v.105, p.521–524, 1993.

YU, T.; CHEN, J.; CHEN, R.; HUANG, B.; LIU, D.; ZHENG, X. Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p. 339-345, 2007.

ZOUHIR, A.; HAMMAMI, R.; FLISS, I.; HAMIDA, J.B. A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins. **Journal of Protein**, v. 29, p. 432–439, 2010.

**Capítulo 2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE**  
*Lactobacillus reuteri*

## 2.1.Introdução

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de diversos microrganismos amplamente distribuídos na natureza associados com plantas (couve, milho, cevada), carnes, laticínios, mingaus e silagens. Conhecidas como culturas iniciadoras no processamento de produtos lácteos tais como, leites fermentados, iogurtes, queijos e manteigas, são importantes comercialmente também na fabricação de embutidos, carnes curadas, vinhos, cervejas, pickles e outros (CARR *et al.*, 2002).

BAL consistem de bastonetes ou cocos Gram-positivos e compreendem os gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e, mais recentemente, o gênero *Lactococcus*. Estas bactérias são geralmente mesófilas, mas podem crescer tanto a 5 °C quanto a 45 °C. Da mesma maneira, enquanto algumas crescem a pH 4,0 - 4,5, outras são ativas a pH 9,6 ou 3,2 (CAPLICE & FITZGERALD, 1999). São oxidases negativas, benzidinas negativas, catalase negativas com exceção de algumas que produzem uma pseudo catalase e necessitam de porfirina férrica (CARR *et al.*, 2002).

BAL têm sido caracterizadas principalmente pela sua habilidade em formar vários isômeros de ácido láctico pela fermentação da glicose (CAPLICE & FITZGERALD, 1999, CARR *et al.*, 2002).

BAL produzem muitos compostos que são ativos contra outros microrganismos, que podem ser aproveitados para inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes ou potencialmente patogênicos. Estes incluem produtos finais de fermentação, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e diacetil, além de bacteriocinas e outros compostos antagonicos como a reuterina (DAESCHEL, 1989).

### **A espécie *Lactobacillus reuteri***

O microrganismo *Lactobacillus reuteri* é uma espécie heterofermentativa que reside no trato gastrointestinal (TGI), vaginal e oral do homem e outros animais de sangue quente (HAMMES & HERTEL, 2006). Algumas cepas de *L. reuteri* são usadas como probióticos. A empresa sueca BioGaia possui várias cepas com um grande número de patentes para o uso comercial de *L. reuteri*.

O interesse em *L. reuteri* começou a aumentar à medida que os cientistas começaram a encontrá-lo colonizando o intestino de animais saudáveis. Gerhard Reuter

isolou pela primeira vez *L. reuteri* intestinal de humanos e fezes na década de 1960, e este trabalho foi depois repetido por outros pesquisadores (MOLIN, 2001).

## **Reuterina**

Um composto primário produzido por *L. reuteri*, reuterina, não apresenta componentes protéicos e é produzido durante a fermentação do glicerol. Reuterina,  $\beta$ -hydroxypropionaldeído (3-HPA), derivado do glicerol, é produzida em condições anaeróbicas e apresenta efeitos de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, bem como fungos, leveduras e protozoários (SPINLER *et al.*, 2008). O amplo espectro de atividade antimicrobiana de *L. reuteri* tem sido considerado um recurso terapêutico importante e confere potencial para a prevenção ou tratamento de infecções (ANUKAM *et al.*, 2006; ROSENFELDT *et al.*, 2002; YUNMBAM & ROBERTS & HOOVER, 1996).

A Reuterina é um composto neutro, de baixo peso molecular capaz de inibir o crescimento de muitas espécies de bactérias, inclusive *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Staphylococcus* e outros organismos como leveduras, fungos e protozoários, muitos dos quais são patogênicos para o homem (TALARICO & DOBROGOSZ, 1989). É uma substância solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas (EL-ZINEY *et al.*, 1999).

O modo de ação da reuterina é atribuído ao fato de ela ser considerada um análogo da D-ribose sendo capaz de inibir a síntese de DNA por inibir a ribonucleotideo redutase envolvida no primeiro passo da síntese de novos ribonucleotídeos para a síntese do DNA. Isso foi observado ao testar o efeito inibitório da reuterina contra subunidades B1 e B2 purificadas da ribonucleotideo redutase isolada de *E. coli*. Reuterina causou uma inibição de 50% da atividade da subunidade B. Essa inibição da atividade da ribonucleotideo redutase explica o amplo efeito antimicrobiano. Nesses experimentos, também foi demonstrado que a Thioredoxina, outra enzima sulfidril, foi inibida pela reuterina. Isto sugere que o mecanismo de ação da reuterina pode ser direcionado para as enzimas sulfidril. Até agora não está demonstrado que uma das três formas de reuterina ou qual combinação é a entidade ativa de origem biológica. É também difícil verificar as mudanças que podem ocorrer na concentração relativa ou

eficácia biológica dessas entidades sob diferentes condições ambientais. Além disso, o fato de algumas BAL e em menor medida algumas cepas de *Listeria sp.* apresentarem resistência a reuterina ainda precisa ser explicado (EL-ZINEY *et al.*, 2000).

A atividade inibitória da reuterina contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 foi investigada em leite, queijo tipo *cottage* e carne (EL-ZINEY *et al.*, 1999). Reuterina foi bactericida em leite a 37 °C, inativando vários patógenos Gram-negativos, ao passo que a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* foi somente bacteriostática (ARQUÉS *et al.*, 2004).

ARQUÉS *et al.* (2004) sugere a aplicação de reuterina em leite e outros produtos lácteos para inibir bactérias patogênicas presentes devido à contaminação pós-pasteurização. Assim, A produção destes compostos pode ser explorada para fornecer uma barreira adicional para crescimento de bactérias indesejáveis nos alimentos.

## **2.2.Objetivos**

Avaliar a eficácia antimicrobiana da cultura celular e do extrato de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse em alimentos.

### **2.2.1. Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito inibitório da cultura de *Lactobacillus reuteri* em meio sólido contra *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*.
- Avaliar o efeito inibitório do extrato estéril de *Lactobacillus reuteri* contra *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*.
- Avaliar o efeito inibitório de *Lactobacillus reuteri* em meio líquido contra, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae* pelo Método Simultâneo.

- Avaliar o efeito inibitório de *Lactobacillus reuteri* em meio líquido contra, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae* pelo Método *Deferred*.

## 2.3. Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos I do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 2.3.1 Microrganismos e condições de cultivo

O microrganismo *Lactobacillus reuteri* ATCC 1428, isolado de fezes humanas, foi adquirido da Coleção de Cepas Tropicais da Fundação André Tosello e foi mantido em Caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) com 20% de glicerol a -20 °C. Para reativação 1 mL da cultura em temperatura ambiente foi transferida para 10mL de caldo MRS e incubada a 37 °C por 24 horas.

As seguintes cepas foram usadas como indicadoras: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* 19117, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Vibrio cholerae* ATCC 15748. Todas as cepas foram gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz). As mesmas foram mantidas em meio sólido inclinado recomendado pela FioCruz a temperatura de 7 °C.

Para reativação, todas as cepas foram cultivadas em caldo tripton de soja (TSB).

Os meios seletivos usados para a contagem das cepas indicadoras utilizadas nos ensaios de inibição em caldo são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Meios seletivos usados para a contagem das cepas indicadoras.

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio Seletivo</b>
<i>Bacillus cereus</i>	Ágar Gema de Ovo e Polimixina (MYP)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM)
<i>Escherichia coli</i>	Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM)
<i>Proteus vulgaris</i>	Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ágar Cetrimide
<i>Salmonella entérica</i>	Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ágar Baird-Parker (BP)
<i>Vibrio cholerae</i>	Ágar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (TCBS)

### 2.3.2. Produção da Cultura de *Lactobacillus reuteri*

A partir da cultura pré reativada, 1 mL foi transferido para um novo tubo contendo 10mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 6 horas. Após a incubação, o volume total foi transferido para um frasco contendo 250 mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 horas. Este caldo foi usado como inóculo de *Lactobacillus reuteri*.

### 2.3.3. Produção do Extrato de *Lactobacillus reuteri* produzido por fermentação do glicerol

A produção do extrato de *L. reuteri* por fermentação do glicerol foi realizado conforme a metodologia descrita por CLEUSIX (2008) com algumas modificações. A partir da cultura de *L. reuteri* pré reativada, 1 mL foi transferido para um novo tubo contendo 10mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 6 horas. Após a incubação, o volume total foi transferido para um frasco contendo 50 mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 12 horas. Todo o volume foi transferido para um frasco contendo 500 ML de caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 horas. As células foram colhidas por centrifugação em 1500 x g por 10 minutos a 20 °C, lavadas com tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), ressuspendidas em 300 mL de solução estéril aquosa de glicerol (200 mm) e incubadas por 3 horas a 37 ° C em cuba de anaerobiose

(Anaerogen®). As células foram removidas por centrifugação (8000 x g, 10 minutos) e 150 mL do sobrenadante foram esterilizados por filtração em membrana 0,22 µm (Millipore).

#### 2.3.4. Ensaio de inibição em Meio Sólido

Os ensaios de inibição em meio sólido foram realizados através do Método de Difusão em Agar pela técnica de poços (PINTO *et al.*, 2003). Em placas de Petri 10x90 mm, contendo ágar triptona de soja (TSA), foi aplicada a cultura indicadora, descritas no item 2.3.1, com auxílio de um *swab* para a formação de um tapete bacteriano. Após a total absorção do inóculo, foram feitas cavidades de 6 mm de diâmetro, onde foi inoculado 50 µL do extrato e 50 µL da cultura de *L. reuteri*. O ensaio foi pré-incubado por 2 horas a temperatura ambiente para difusão dos extratos e posteriormente incubado a 37 °C por 24-48 horas. Cada ensaio foi feito em triplicata e após, o período de incubação, procedeu-se à leitura e interpretação dos resultados, através da medida do diâmetro da zona sem crescimento da cepa indicadora.

#### 2.3.5. Ensaio de Inibição em Meio Líquido

Os ensaios de antagonismo em meio líquido foram realizados por Método Simultâneo e Método *Deferred*. Inicialmente o inóculo foi preparado pela cultivo de uma colônia isolada de cada microrganismo indicador, descritos no item 2.3.1, em caldo TSB por 24 horas a 36 °C. Após incubação o inóculo foi padronizado em 10<sup>3</sup> UFCg<sup>-1</sup> usando o padrão 0,5 da escala de McFarland e diluições seriadas. No Método Simultâneo, cada microrganismo indicador (item 2.3.1) e *L. reuteri* foram inoculados simultaneamente em 10 mL de caldo TSB e o experimento foi incubado por 24 horas a 36 °C. No Método *Deferred*, *L. reuteri* foi inoculado em 10 mL de caldo TSB e incubado por 24 horas a 36 °C em anaerobiose (Anaerogen®) e após o período de incubação o microrganismo indicador (item 2.3.1) foi inoculado e novamente incubado por 24 horas a 36 °C. Para os dois experimentos o controle foi a cultura da cepa indicadora em caldo TSB. Após a incubação, a contagem final da cepa indicadora em meio seletivo foi realizada para os dois métodos e para o controle.

### 2.3.6. Análise Estatística

O resultado dos Ensaio em caldo foi submetido à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para avaliar a diferença estatística entre o controle e o tratamento. As análises foram realizadas com auxílio do programa STATISTICA® 9.0 (StaSoft).

## 2.4. Resultados e Discussão

De todas as culturas indicadoras testadas, duas apresentaram crescimento inibido pela cultura de *L. reuteri* em meio sólido, *Proteus vulgaris* e *Vibrio cholerae*, com zonas de inibição médias de 3,3 mm e 7,8 mm de diâmetro.

Resultados pouco expressivos foram observados nos ensaios em meio sólido quando se avaliou a inibição usando uma cultura de *L. reuteri*. O caldo de crescimento e o ensaio de inibição ocorreram todos em aerobiose, desta forma a produção de antimicrobianos por *L. reuteri* pode ter sido insuficiente para inibir o crescimento da maioria das cepas indicadoras. Segundo RUCH *et al.* (1974) os microrganismos que tem a capacidade de produzir reuterina como *L. reuteri* e *K. pneumonie*, apresentam essa produção apenas em anaerobiose e produção bastante reduzida em aerobiose.

Os ensaios de inibição feitos com o extrato de *L. reuteri*, apresentaram resultados positivos para cinco cepas indicadoras, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*. O resultado da media das zonas de inibição observadas nas três repetições para o ensaio com o extrato é apresentado na Tabela 3. A Figura 1 apresenta zonas de inibição de *Vibrio cholerae* e *Bacillus cereus* quando tratados com o extrato de *L. reuteri* em Agar TSA.

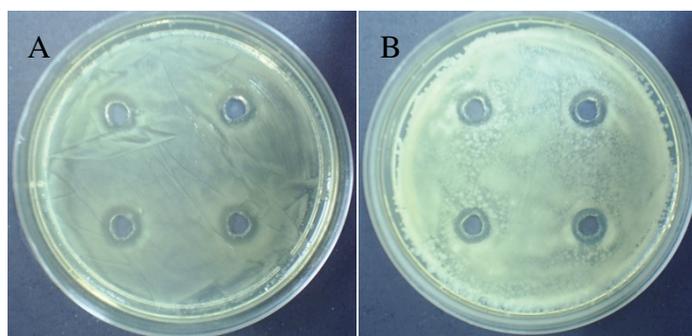


Figura 1. Zonas de inibição de *Vibrio cholerae* (A) e *Bacillus cereus* (B) quando tratados com o extrato de *L. reuteri* em Agar TSA.

Novamente, houve inibição do crescimento de *V. cholerae*, apresentando as maiores médias para as zonas de inibição observadas, seguido de *Bacillus cereus* e *Proteus vulgaris*. Ainda, apresentaram-se inibidos pelo extrato, *Staphylococcus aureus* e *E. coli*.

Tabela 2. Zonas de inibição de diferentes micro-organismos tratados com o extrato de *L. reuteri* em Agar TSA.

<b>Microrganismo Indicador</b>	<b>Zona de Inibição halo* (mm)</b>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,00
<i>Bacillus cereus</i>	5,06
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,00
<i>Escherichia coli</i>	2,30
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,00
<i>Proteus vulgaris</i>	5,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00
<i>Salmonella enterica</i>	0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,36
<i>Vibrio cholerae</i>	5,90

\* halo é a medida da diferença do diâmetro da zona de inibição menos o diâmetro do poço.

A capacidade de algumas cepas de *L. reuteri* de inibir o crescimento de *V. cholerae* foi testada por SPINLER *et al.* (2008). Neste trabalho os autores testaram a atividade de quatro cepas de *L. reuteri* e verificaram que todas elas apresentaram efeito inibitório contra este microrganismo. Segundo os autores as cepas de *L. reuteri* apresentam diferenças na síntese de reuterina, o que revela diferenças na expressão gênica. No entanto, o composto produzido por todas as cepas apresentam-se semelhantes quanto à capacidade de inibição contra as cepas indicadoras testadas. Os autores utilizaram neste estudo uma solução de reuterina que foi produzida de forma semelhante ao extrato de *L. reuteri* usados no presente trabalho. Ainda, o estudo de SPINLER *et al.* (2008), apresenta resultados de inibição da solução de reuterina contra cepas patogênicas de *E. coli*.

EL-ZINEY *et al.* (2000) já haviam relatado a capacidade inibitória de reuterina produzida por *L. reuteri* contra cepas de *Bacillus cereus* com Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 2 UA/mL.

Para os ensaios realizados em meio líquido pode-se observar que pelo Método Simultâneo *L. reuteri* apresentou efeito inibitório baixo contra todos os microrganismos testados, porém quando analisados estatisticamente, apenas os resultados para *E. aerogenes*, *P. vulgaris* e *V. cholerae* apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). O resultado da contagem do controle comparado ao tratamento pelo Método Simultâneo pode ser observado na Figura 2.

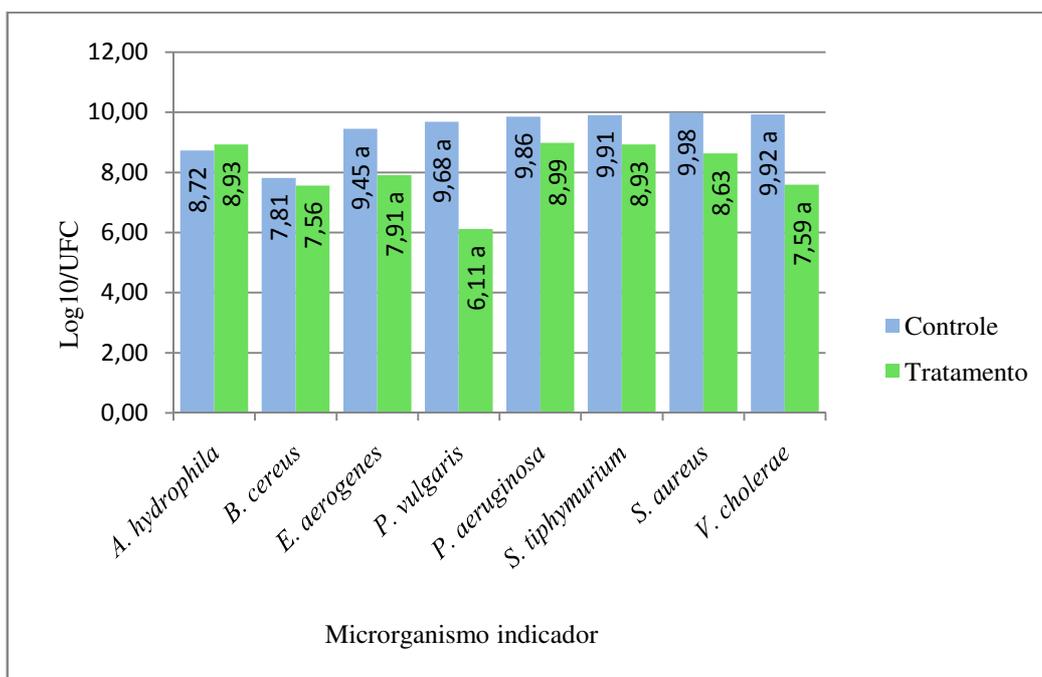


Figura 2. Contagens (Log 10) de diferentes microrganismos quando tratados com *L. reuteri*, em meio líquido, pelo método Simultâneo.

\*O símbolo (a) representa diferença estatística entre o controle e o tratamento.

A produção de reuterina em aerobiose é baixa (RUCH, 1974). Dessa forma, o crescimento simultâneo do microrganismo indicador não permitiu que uma concentração suficiente de reuterina para ser efetiva fosse atingida a tempo de inibir o seu crescimento.

Os resultados dos ensaios da atividade antimicrobiana de *L. reuteri* contra diferentes microrganismos, em meio líquido, pelo método Deferred, são apresentados na Figura 3.

Os resultados desse estudo mostraram que *L. reuteri* inibiu todos os organismos testados apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

ARQUÉS *et al.* (2007) em estudo de aplicação de reuterina em leite refrigerado avaliaram a atividade inibitória deste antimicrobiano contra patógenos Gram-negativos.

Os autores observaram que a reuterina foi efetiva contra *E.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e *Campylobacter jejuni*.

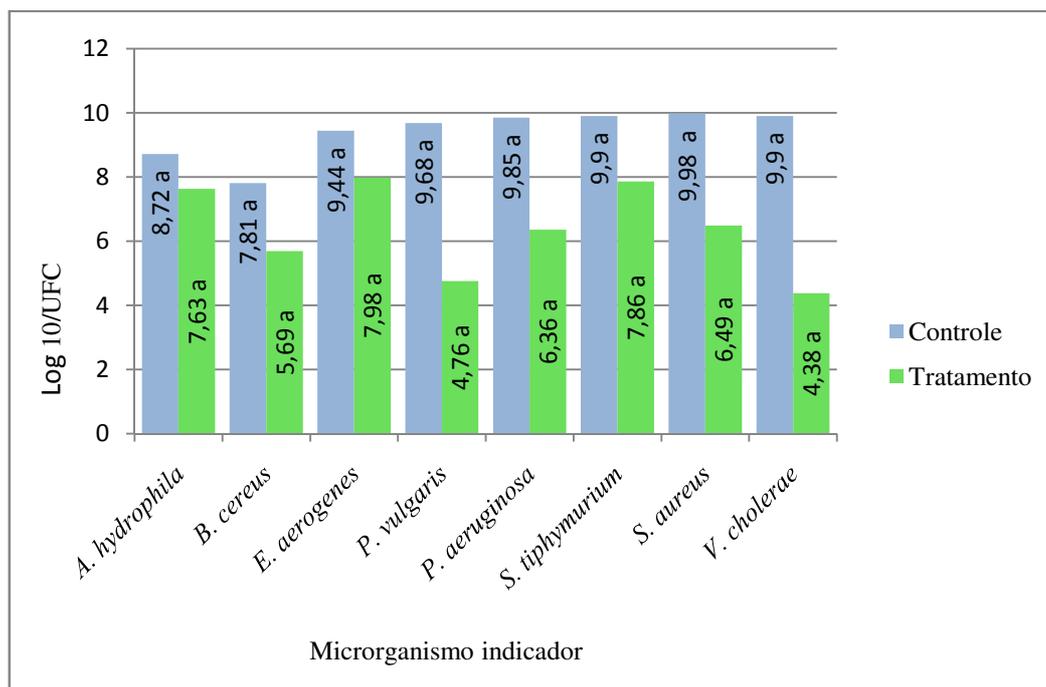


Figura 3. Contagens (Log 10) de diferentes microrganismos quando tratados com *L. reuteri*, em meio líquido, pelo método *Deferred*.

\*O símbolo (a) representa diferença estatística entre o controle e o tratamento.

Cepas de *Salmonella sp.* apresentam-se sensíveis a antimicrobianos produzidos por *L. reuteri*. BARROS *et al.* (2009) avaliaram a atividade de cepas de *Lactobacillus sp.* isolados de ingluvío e ceco de aves contra salmonelas isoladas de vísceras de galinha. *L. reuteri* foi eficiente contra todas as cepas testadas. SPINLER *et al.* (2008) também reportaram a atividade inibitória da reuterina contra *Salmonella entérica*.

A reuterina é efetiva na inibição de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella putrefaciens* e outros (EL-ZINEY *et al.*, 1997; CHUNG *et al.*, 1989).

Neste estudo *Lactobacillus reuteri* foi capaz de inibir todas as cepas testadas pelo Método *Deferred*, sugerindo que houve produção de reuterina durante a incubação em anaerobiose. No entanto, a produção de outros compostos antimicrobianos como ácido lático, ainda que em pequena quantidade, peróxido de hidrogênio e reuter ciclina, além da exaustão de nutrientes podem também ter influenciado nestes resultados.

## 2.5. Conclusões

- 2.5.1. A cultura de *L. reuteri* foi eficiente na inibição de *Proteus vulgaris* e *Vibrio cholerae* em meio sólido.
- 2.5.2. O extrato de *L. reuteri* foi eficiente na inibição de *B. cereus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus* e *V. cholerae* em meio sólido.
- 2.5.3. *L. reuteri* inibiu o crescimento de *E. aerogenes*, *P. vulgaris* e *V. cholerae* pelo Método Simultâneo.
- 2.5.4. *L. reuteri* inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados pelo Método *Deferred*.
- 2.5.5. Sugere-se que *L. reuteri* produz reuterina através da fermentação do glicerol, e esta foi eficiente para a inibição dos microrganismos testados neste trabalho.

## 2.6. Referências

ANUKAM, K.C., OSAZUWA, E., OSEMENE, G.I., EHIGIAGBE, F., BRUCE, A.W., REID, G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v. 8 (12-13), p. 2772-2776, 2006.

ARQUES, J.L.; FERNANDEZ, J.; GAYA, P.; NUNEZ, M.; RODRIGUEZ, E.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95 (2), p. 225–229, 2004.

ARQUES, J.L., NUNEZ, M., RODRIGUEZ, E., MEDINA, M. Antimicrobial Activity of Nisin, Reuterin, and the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada, a Semisolid Dairy Product Manufactured in Spain. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.70–75, 2007.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T., CROCCI, J.A. Avaliação *in vitro* da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do ingluvío e cecos de aves

sobre *Salmonella*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.61, p.863-868, 2009.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F.; Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.131-149, 1999.

CARR, F.J. CHILL, D., MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p.281-370. 2002.

CASAS, I.A., DOBROGOSZ, W.J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, p. 247-285, 2000.

CHUNG, T.C., AXELSSON, L., LINDGREN, S.E., DOBROGOSZ, W.J. *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 2 p. 137-144, 1989.

CLEUSIX, V., LACROIX, C., VOLLENWEIDER, S., LE BLAY, G. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in a *in vitro* model of colonic fermentation with immobilized human feces. **FEMS Microbiology Ecology**, v.63, p.56–64, 2008.

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

EL-ZINEY, M.G.; VAN DEN TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.M.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. **Journal Food Protection**, v. 62, p.257–261, 1999.

EL-ZINEY, M.G.; DEBEVERE, J.M.; JAKOBSEN, M. Reuterin. In: NAYDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC, Florida, p. 567-587, 2000.

EL-ZINEY, M.G. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria metabolites: the role of lactic acid, enterocin 5701 and reuterin. In: NAYDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. CRC, Florida, p. 567-587, 2000.

GÄNZLE, M.G.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. **International Journal Food Microbiology**, v. 48, p. 37–50, 1999.

GÄNZLE, M.G.; HOLTZEL, A.; WALTER, J.; JUNG, G.; HAMMES, W.P. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.4325–4333, 2000.

GÄNZLE, M.G. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.326–332, 2004.

HAMMES, W. & HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: **The Prokaryotes**. p. 320-403, 2006.

HOLTZEL, A., GANZLE, M.G., NICHOLSON, G.J., HAMMES, W.P., JUNG, G. The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, p. 2766–2768, 2000.

MARQUARDT, U., D. SCHMID, AND G. JUNG. Racemic synthesis of the new antibiotic tetramic acid reutericyclin. **Synlett**. p.1131–1132, 2000.

MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or Milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73(2 Suppl), p. 380S-385S, 2001.

PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p, 2003.

ROSENFELDT, V.; MICHAELSEN, K.F.; JAKOBSEN, M.; LARSEN, C.N.; MOLLER, P.L.; PEDERSEN, P. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. **Journal Pediatric Infect Disease**, v.21, p.411–416, 2002.

RUCH, F.E., LENGELER, J., LIN, E.C.C. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.119, p.50-56, 1974.

SPINLER, J.K.; TAWEECHOTIPATR, M.; ROGNERUD, C.L.; OU, C.N.; TUMWASORN, S.; VERSALOVIC, J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe**, 2008.

TALARICO, T.L.; DOBROGOSZ, W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents Chemotherapeutics**, v.33, p.674–679, 1989.

TOBA T., SAMANT S.K., YOSHIOKA E., ITO T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **Letters Applied Microbiology**, v.13, p.281–286, 1991.

YUNMBAM, M.K.; ROBERTS, J.F. In vivo evaluation of reuterin and its combinations with suramin, melarsoprol, DL-alpha-difluoromethylornithine and bleomycin in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. **Comparative Biochemistry Physiology C**, v.105, p.521–524, 1996.

**Capítulo 3: CONTROLE DA MICROBIOTA PSICRÓFILA DE  
CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) POR *Lactobacillus reuteri***

### 3.1.Introdução

A atividade de camarão marinho cultivado no país é uma prática nova, assim mesmo, teve uma trajetória de crescimento rápido instigada por fatores técnicos e econômicos num ambiente favorável de preço e demanda em condições no mercado internacional e doméstico além de uma base interna de estímulo aos fatores propulsores de seu desenvolvimento. O setor detém forte potencial de crescimento e se transformou numa das atividades agropecuárias importantes para a economia do país, muito especialmente para a região nordeste (BRDE, 2004).

A história catarinense do camarão cultivado começou em 1984, quando a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciou suas pesquisas de reprodução e cultivo do camarão-rosa (espécie nativa). Os resultados obtidos nos cultivos foram insatisfatórios e os empreendimentos foram se enfraquecendo, a produção caindo, até que, finalmente, deixaram de existir. Em 1998, após o fechamento de vários empreendimentos, a UFSC e a Epagri introduziram no estado a espécie *Litopenaeus vannamei* (camarão-branco-do-pacífico), que havia apresentado nos cultivos do Nordeste ótimas taxas de sobrevivência, conversão alimentar e crescimento. Este alto desempenho do *L. vannamei* viabilizou a reativação dos antigos empreendimentos e possibilitou novas instalações de cultivo.

O Brasil com a produção de 90.000 toneladas de camarão, em 2003, tornou-se o maior produtor de camarão da América Latina e um exportador em potencial. No ano 2004, as vendas externas de camarão cultivado foram de 45 mil t no período de janeiro a outubro (ABCC, 2002).

O processamento da produção do setor da carcinicultura nacional, de forma geral, não constitui tarefa muito especializada. A operação tem início depois de encerrada a fase de despesca do camarão (fase de retirada da produção dos tanques de engorda) e antes da comercialização. O produto é beneficiado para se adequar à demanda do comprador e, conforme especialistas inclui um procedimento simples e sem agregar muito valor (BRDE, 2004).

Por serem alimentos muito perecíveis, os pescados devem ser criteriosamente armazenados para manutenção de suas qualidades e aumento de sua vida útil. A diminuição do frescor dos pescados depende de vários fatores como condição de captura e abate e processamento.

Diversos fatores podem influenciar na velocidade de decomposição do pescado, tais como: (1) número inicial de bactéria, (2) condições de armazenagem (temperatura, umidade e atmosfera gasosa), (3) tipo de pescado (certos produtos marinhos contêm altos níveis de osmorreguladores na forma de nitrogênio não protéico, por exemplo, aminoácidos, óxido de trimetilamina ou uréia, que estão prontamente disponíveis para a bactéria, (4) temperatura da água de captura do pescado (diversos peixes e crustáceos são capturados em águas frias, portanto a microbiota não é efetivamente inibida pela refrigeração como é a microbiota normal de animais de sangue quente), (5) local e método de processamento (a bordo do navio ou barcos, *versus* planta industrial) (BEIRÃO *et al.*, 2000).

A indústria de alimentos busca técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de microrganismos nos alimentos, como tratamentos intensos de calor, acidificação, congelamento, desidratação e adição de sal ou agentes químicos. Nos últimos anos as alternativas mais estudadas são as de inativação de microrganismos por métodos não-térmicos, como uso de alta pressão hidrostática, utilização de pulsos eletromagnéticos, sistema de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, utilização de compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004). A tabela 1 resume os procedimentos existentes e emergentes para o controle de microrganismos em alimentos. Somando-se aos mais tradicionais e emergentes sistemas empregados para se obter uma vida de prateleira desejável existe a pressão dos consumidores por meios mais naturais para a conservação dos alimentos (ROBERTS & HOOVER, 1996; ROLLER, 1995; GOULD, 1996). Este fato tem concentrado a atenção em uma extensa faixa de sistemas antimicrobianos naturais extremamente efetivos que podem ser usados em alimentos (GOULD, 1996). A dinâmica destes sistemas pode contribuir de diversas maneiras para o controle de patógenos e a melhoria da qualidade sensorial dos alimentos.

Nos últimos anos os consumidores passaram a exigir alimentos com maior qualidade, sem conservadores químicos e prolongada vida útil. A utilização de agentes químicos como conservantes não é compatível com a imagem de produtos “frescos” (BRUEL & COOTE, 1999; PRANOTO *et al.*, 2005).

Tabela 1. Procedimentos existentes e emergentes para o controle de microrganismos em alimentos, adaptado de GOULD, 1996.

<b>Fundamento</b>	<b>Procedimento</b>
Conservadores	Adição de conservadores inorgânicos (nitrito, sulfito), orgânicos (propionato, sorbato, benzoato) e antibióticos (natamicina) e bacteriocinas (nisina, pediocina)
↓ Aa	Liofilização, processos de cura
Redução de Nutrientes Disponíveis	Compartimentalização de emulsões em água e óleo
Retirada do oxigênio	Embalagens com nitrogênio e vácuo
Dióxido de carbono	Embalagens com atmosfera modificada
Acidificação	Adição de ácidos e fermentação
Fermentação Alcoólica	Vinificação e fermentação em cervejarias
Baixa temperatura	Congelamento ou refrigeração
Aquecimento	Pasteurização e esterilização
Irradiação	Radiação ionizante
Pressurização	Aplicação de alta pressão hidrostática
Eletricidade	Cargas elétricas de alta voltagem
Termossonificação	Aquecimento através de ultrasonificação a baixa pressão
Uso de enzimas (Lizosima)	Lise bacteriana

Em consequência ao aumento do interesse dos consumidores por produtos naturais ou minimamente processados (CLEVELAND, 2001; PRANOTO *et al.*, 2005), o uso de antimicrobianos naturais pode ser uma alternativa a aos métodos utilizados atualmente pela indústria alimentícia. Uma alternativa seria o uso combinado de diferentes tipos de tratamentos considerados subletais para promover a proteção dos

alimentos e consumidores contra microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, através do efeito sinérgico apresentado entre os tratamentos (BRUL & COOTE, 1999).

A bioconservação pode aumentar a vida de prateleira e a segurança dos alimentos através do uso de uma microbiota natural ou controlada, principalmente BAL (HUGAS, 1995). Para ADAMS & NICOLAIDES (1997), o uso de BAL na segurança de alimentos reduz o risco de infecção tendo em vista a ocorrência destas bactérias em numero substancial em carnes e vegetais e seu uso desde a antiguidade na produção de uma variedade de produtos fermentados, onde elas ocorrem em grande número. Exemplos de inibição de deterioradores e patógenos por BAL podem ser encontrados em KLAENHAMMER (1993) e HOLZAPFEL *et al.* (1995). As bactérias ácido lácticas (BAL) são usadas de forma empírica pelo homem para a preservação de alimentos por séculos. A maioria dos representantes desse grupo de bactérias é inofensiva a saúde humana, e algumas são reconhecidas como GRAS (Generally Recognised As Safe). Algumas dessas bactérias são usadas como probióticos e podem fornecer benefícios substanciais à saúde humana como estabilizar e normalizar o trato gastrointestinal. Algumas estirpes estão associadas com ação anticancerígena e antitumoral. Estas características relacionadas à saúde podem servir como uma vantagem adicional na futura seleção e aplicação de culturas protetoras. Os avanços e o aumento do conhecimento da fisiologia e biologia moléculas das BAL, somando-se o progresso nas técnicas de seleção e de cultura, dão razão ao otimismo em relação ao desenvolvimento de culturas protetoras melhoradas (HOLZAPFEL *et al.*, 1995). HELANDER *et al.* (2001) testaram o uso potencial de BAL contra bactérias Gram negativas.

O microrganismo *Lactobacillus reuteri* é uma espécie heterofermentativa que reside no trato gastrointestinal (TGI), vaginal e oral do homem e outros animais de sangue quente (HAMMES & HERTEL, 2006). A sua ação probiótica é atribuída a sua capacidade de exercer um efeito inibitório sobre microrganismos patogênicos com uma combinação de diversos mecanismos, incluindo a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas. *L. reuteri*, como todas as BAL, é capaz de converter açúcares em ácido láctico com produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, *L. reuteri* fermenta carboidratos e ácidos graxos de cadeia curta (CASAS & DOBROGOSZ, 2000).

Um composto primário produzido por *L. reuteri*, reuterina, não apresenta componentes protéicos e é produzido durante a fermentação do glicerol. Reuterina,  $\beta$ -

hydroxypropionaldeído (3-HPA), derivado do glicerol, é produzida em condições anaeróbicas apresenta efeitos de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, bem como fungos, leveduras e protozoários (SPINLER *et al.*, 2008). Reuterina é uma substância solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas (EL-ZINEY *et al.*, 1999).

### **3.2.Objetivos**

Avaliar o controle da microbiota psicrófila do camarão *Litopenaeus vannamei* por uma cultura de *Lactobacillus reuteri* e seu extrato estéril.

#### **3.2.1. Objetivos específicos**

- Avaliar a ação inibitória da cultura de *Lactobacillus reuteri* contra a microbiota psicrófila do camarão *Litopenaeus vannamei* descascado mantido sob refrigeração;
- Avaliar a ação inibitória do extrato estéril de *Lactobacillus reuteri* produzido por fermentação do glicerol contra a microbiota psicrófila do camarão *Litopenaeus vannamei* descascado mantido sob refrigeração;

### **3.3.Material e Métodos**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos I do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **3.3.1. Microrganismos e condições de cultivo**

O microrganismo *Lactobacillus reuteri* ATCC 1428, isolado de fezes humanas, foi adquirido da Coleção de Cepas Tropicais da Fundação André Tosello e foi mantido em Caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) com 20% de glicerol a -20 °C. Para reativação 1 mL da cultura em temperatura ambiente foi transferida para 10mL de caldo MRS e incubada a 37 °C por 24 horas.

### 3.3.2. Produção da Cultura de *Lactobacillus reuteri*

A partir da cultura pré reativada, 1 mL foi transferido para um novo tubo contendo 10mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 6 horas. Após a incubação, o volume total foi transferido para um frasco contendo 250 mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 horas. Este caldo foi usado como cultura de *Lactobacillus reuteri*.

### 3.3.3. Produção do extrato de *Lactobacillus reuteri* produzido por fermentação do glicerol

A produção do extrato seguiu a metodologia descrita por CLEUSIX (2008) com algumas modificações. A partir da cultura de *Lactobacillus reuteri* pré reativada, 1 mL foi transferido para um novo tubo contendo 10mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 6 horas. Após a incubação, o volume total foi transferido para um frasco contendo 50 mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 12 horas. Todo o volume foi transferido para um frasco contendo 500 ML de caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 horas. As células foram colhidas por centrifugação em 1500 x g por 10 minutos a 20 °C, lavadas com tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), ressuspensas em 300 mL de solução estéril aquosa de glicerol (200 mm) e incubadas por 3 horas a 37 ° C em anaerobiose (Anaerogen®). As células foram removidas por centrifugação (8000 x g, 10 minutos) e 150 mL do sobrenadante foram esterilizados por filtração em membrana 0,22 µm (Millipore).

### 3.3.4. Amostra: camarão

Amostras de 1000 g de camarão-branco-do-pacífico (camarão laguna) fresco descascado foram compradas no Mercado Público de Florianópolis. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e levadas até o Laboratório de Microbiologia de alimentos para serem tratadas e analisadas.

### 3.3.5. Tratamento das amostras com *L. reuteri*

Cada amostra foi dividida em porções de 300g que receberam as seguintes identificações e tratamentos: Tratamento 1, amostra com adição de 0,1 mL/g da cultura de *L. reuteri*, Tratamento 2, amostra com adição de 0,1 mL/g do Extrato de *L. reuteri* e Controle, amostra com adição de 0,1 mL/g de água destilada estéril. Cada amostra foi analisada quanto a contagem de microrganismos psicrófilos, 7 °C: imediatamente após o tratamento (Tempo zero), três horas após o tratamento (T3 h), seis horas após o tratamento (T6 h), 24 horas após o tratamento (T24 h) e 48 horas após o tratamento (T48 h). As amostras foram mantidas em refrigeração por 7 °C até o momento de serem analisadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.3.6. Contagem Padrão em placas de microrganismos psicrófilos

A contagem em placas foi realizada seguindo-se a metodologia da contagem padrão proposta pela APHA (2001). Foram feitas contagens em duplicata, para cada diluição. Dessa forma, 0,1mL de cada diluição da amostra foi transferido para placas de Petri contendo o meio Agar Padrão para Contagem (PCA) e espalhado com auxílio de alça de Drigalsky até que o líquido fosse absorvido. Em seguida, as placas foram incubadas por sete dias a temperatura de 7 °C.

### 3.3.7. Análise Estatística

Os resultados da contagem de microrganismos psicrófilos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias do controle e dos tratamentos foram submetidos ao teste de Tukey para verificar a existência de diferença estatística entre os tratamentos. O nível de confiança usado nas análises foi de 95%. Os testes foram realizados usando o programa STATISTICA® 9.0 (StaSoft).

## **3.4. Resultados e Discussão**

A contagem padrão de microrganismos psicrófilos realizada no tempo zero demonstrou que as amostras de camarão descascado adquiridas no Mercado Público de

Florianópolis já apresentavam uma contaminação inicial com média geral em torno de  $10^6$  UFC/g como apresentado na Figura 1 e na Figura 2.

Segundo VANDERZANT *et al.* (19701) o camarão capturado em águas tropicais apresenta em média contagens entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/g. Esse resultado foi confirmado por JEYASEKARAN *et al.* (2006), que avaliou em seu estudo a evolução da microbiota de camarão-branco-do-pacífico armazenado sob diferentes condições de refrigeração e embalagens com atmosfera modificada.

MOURA *et al.* (2003) avaliaram a qualidade microbiológica de camarão-rosa comercializado em São Paulo e encontraram contagens que variavam entre  $1,1 \times 10^4$  e  $3,0 \times 10^7$  UFC/g.

Os critérios microbiológicos para a contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios, segundo a ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Food (1998), estabelecem o limite máximo de  $10^7$  UFC/g para crustáceos crus congelados, sendo que não são observados limites para a contagem de microrganismos psicrófilos. A legislação brasileira (Portaria n° 185 de 1997, MAPA, RDC n°12 de 2 de janeiro de 2001, ANVISA) não prevê limites para a contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas em pescado porém sabe-se que populações elevadas podem reduzir a vida útil do pescado (KIRSCHINK & VIEGAS, 2004).

As médias de contagem de microrganismos psicrófilos do controle variaram entre 6 e 7 ciclos Log durante o armazenamento do camarão a  $\pm 7$  °C. Pode-se, então, observar que a temperatura de refrigeração foi eficiente para impedir a multiplicação dos microrganismos durante as 48 horas de experimento, já que as médias ao longo do tempo não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

O camarão pode apresentar diferentes contagens microbianas em função do local de captura e da época do ano, que parecem estar relacionadas com alterações nas características da água, tais como oscilações de temperatura, salinidade, atividade do fitoplâncton, níveis de oxigenação e pH (VANDERZANT *et al.*, 1971). Após a captura, o crustáceo torna-se exposto à contaminação em maior ou menor grau, pela transferência de microrganismos presentes no barco e durante o manuseio nas operações de bordo e de terra. A higiene insatisfatória dos porões dos barcos pesqueiros, onde o camarão é armazenado, a qualidade inapropriada da água utilizada na fabricação do gelo, bem como da água de lavagem e o transporte em condições de refrigeração

inadequadas, têm sido indicados como fatores preponderantes na contaminação pós-captura. O que ocorre, então, é a substituição da microbiota aquática original marinha pela de origem terrestre. O crescimento microbiano durante a estocagem, a bordo ou em terra, principalmente de microrganismos psicotróficos, e a atuação das enzimas musculares levam aos processos deteriorativos (FRANCO & LANDGRAF, 2007). A manutenção do camarão a baixas temperaturas durante o armazenamento e transporte é sem dúvida essencial, principalmente quando se considera que nestas condições o crescimento microbiano ainda continua acontecendo.

Segundo JEYASEKARAN *et al.* (2004) o armazenamento sob refrigeração em temperaturas abaixo de 6 °C é eficiente para controlar o crescimento microbiano por até 72 horas. Após este período, bactérias psicotróficas multiplicam-se rapidamente, levando a deterioração do produto. No camarão, essa microbiota psicotrófica inclui bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas*.

Ao analisar o efeito da cultura de *L. reuteri* sobre a microbiota psicrófila do camarão, identificado como Tratamento 1, observa-se que houve um aumento da contagem de microrganismos psicrófilos logo no tempo de 3 horas de tratamento. A cultura de *L. reuteri* adicionada a amostra pode ter influenciado o resultado dessa contagem. Também foi possível observar uma leve redução da microbiota psicrófila após 6 horas de tratamento, embora os resultados não tenham apresentado diferença estatística ( $p > 0,05$ ) quando comparadas as médias da contagem da amostra teste e o do controle. Com 48 horas de tratamento a contagem bacteriana assemelhou-se ao número observado para o controle. Isso pode ser devido a incapacidade de *L. reuteri* multiplicar-se e produzir de antimicrobianos em temperatura abaixo de 10 °C. Dessa forma o efeito observado nos tempos de 6 e 24 horas pode ser devido a uma pequena quantidade de antimicrobiano produzido durante o crescimento, já que o microrganismo produz a reuterina em baixas quantidades durante o crescimento aeróbico, além de outras substâncias como ácido lático e reuterina (RUCH *et al.*, 1974; 1975). O efeito do Tratamento 1 ao longo do tempo de exposição em comparação com o controle é apresentado na Figura 1.

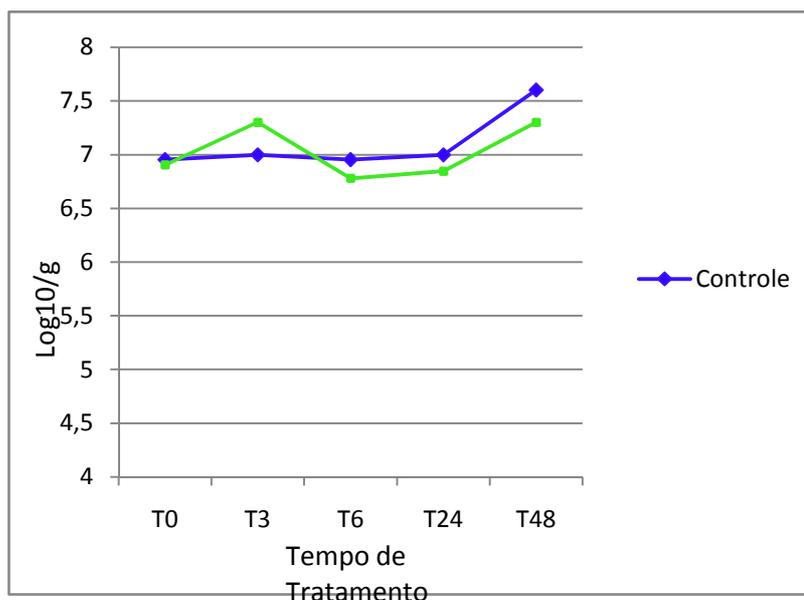


Figura 1. Contagem de microrganismos psicrófilos (Log 10..) em amostras de camarão tratadas com uma cultura de *L. reuteri* (tratamento 1) por 48 horas a 7 °C.

A atividade do extrato de *L. reuteri* sobre a microbiota do camarão, identificado como Tratamento 2, apresentou resultados positivos, sendo que a análise estatística demonstrou diferença entre as médias do tratamento e do controle nos tempos: 6 horas ( $p = 0,002$ ), 24 horas ( $p = 0,0002$ ) e 48 horas ( $p = 0,0009$ ). Esse resultado mostrou a eficiência do extrato na redução e manutenção da baixa contagem de microrganismos psicrófilos sugerindo uma extensão da vida útil do produto. O resultado da atividade do extrato é apresentado na Figura 2.

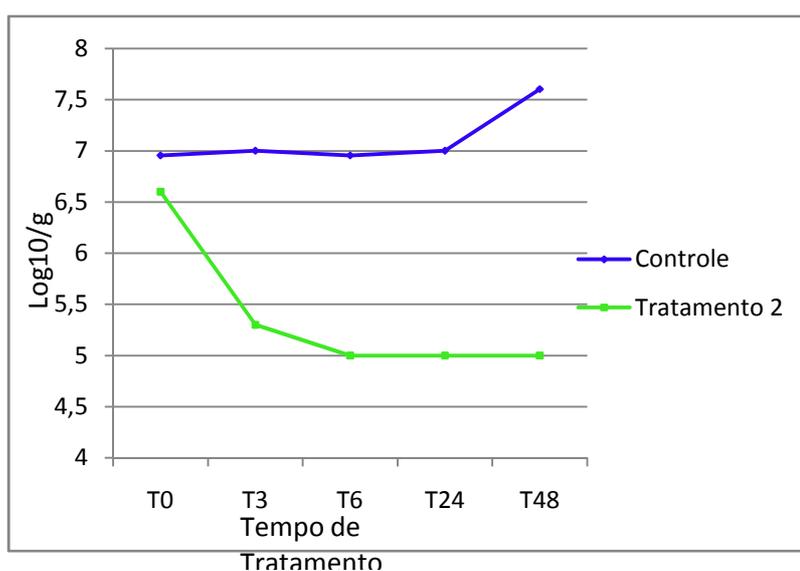


Figura 2. Contagem de microrganismos psicrófilos (Log 10..) em amostras de camarão tratadas com o extrato estéril de *L. reuteri* (tratamento 2) por 48 horas a 7 °C.

Diferentes autores destacam as espécies do gênero *Lactobacillus* como os principais antagonistas de microrganismos patogênicos e deterioradores em produtos de pescado (TOMÉ *et al.*, 2006; LYHS *et al.*, 2001).

SUAREZ *et al.* (2008) avaliaram o efeito da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* sob as populações de bactérias mesófilas, psicrotróficas, coliformes a 35 °C e coliformes termotolerantes presentes em filés de *Piaractus brachypomus*. Os autores verificaram que a população inicial de microrganismos psicrotróficos estava em torno de 4,6 ciclos log, e que apresentou uma diminuição de 1,2 ciclos log com relação ao controle. SOUZA *et al.* (2006) avaliaram a redução da contagem de microrganismos mesófilos totais durante a fermentação de bonito-da-barriga-listrada usando *L. sakei* como cultura *starter*. Os autores relatam uma redução de  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> para  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> na microbiota mesófila total.

O efeito inibitório da reuterina produzida por *Lactobacillus reuteri* vem sendo investigada em diversos estudos *in vitro*, e em alguns aplicando o antimicrobiano em alimentos. EL-ZINEY E DEBEVERE (1998) relataram o efeito inibitório da reuterina contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, em leite e queijo tipo *cottage* artificialmente contaminados.

ARQUES *et al.* (2007) em seu estudo relatam que a reuterina adicionada ao leite em 8 UA/mL exibe efeito bacteriostático sobre *L. monocytogenes* em leite a 37°C, o que também já havia sido observado em estudo anterior (2004). *Listeria monocytogenes* foi completamente inativada no prazo de 5 dias a 7°C no leite com reuterina a 150 UA/mL (EL ZINEY & DEBEVERE, 1998). Segundo esses autores, a taxa de inativação é dependente da concentração de reuterina. Além disso, RASCH *et al.* (2007) observaram que a porcentagem de células em divisão de *Listeria innocua* diminuiu com concentrações crescentes de reuterina.

Em um novo estudo realizado por AQUES *et al.* (2007), estes relatam que a presença de reuterina no leite levou a uma redução das contagens de *S. enterica* e *Y. enterocolitica* após 12 dias, enquanto que *C. jejuni* e *A. hydrophila* foram completamente inativados pela reuterina após 7 e 12 dias, respectivamente. Neste trabalho os autores afirmam que a reuterina é bastante efetiva quando aplicada em alimentos armazenados sob refrigeração.

Segundo SPINLER *et al.* (2008) a reuterina é produzida durante a fermentação do glicerol. Dessa forma, pode-se sugerir que a ação inibitória do extrato de *L. reuteri* produzido por fermentação do glicerol (Tratamento2) seja atribuída à presença de reuterina.

Assim, o uso desse antimicrobiano em alimentos pode ser explorado, considerando-se o fato de sua eficiência aliado a segurança para a saúde humana, já que *Lactobacillus reuteri* é uma bactéria autóctone do trato gastrointestinal humano e sabidamente seguro para a ingestão como probiótico pelo homem (SPINLER *et al.*, 2008; CASAS *et al.*, 2000; ANUKAN *et al.*, 2006; JONES & VERSALOVIC, 2009).

### 3.5. Conclusões

- A cultura de *L. reuteri* não se mostrou eficiente na redução do número de microrganismos psicrófilos do camarão refrigerado.
- O extrato de *L. reuteri* produzido por fermentação do glicerol mostrou-se eficiente na redução de microrganismos psicrófilos no camarão refrigerado.
- O microrganismo *Lactobacillus reuteri* exibiu a capacidade de reduzir a microbiota psicrófila em camarão-branco-do-pacífico armazenado sob refrigeração e pode vir a ser utilizado como bioconservador neste alimento.

### 3.6. Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Agronegócio do camarão marinho cultivado**. 2002.

ADAMS, M.R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v. 8, p. 227-239, 1997.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 12 de 02 Janeiro de 2001**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em 15 abr 2010.

ANUKAM, K.C., OSAZUWA, E., OSEMENE, G.I., EHIGIAGBE, F., BRUCE, A.W., REID, G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v. 8 (12-13), p. 2772-2776, 2006.

APHA. In: Downes, P.F., Ito, K. (Eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, Washington, DC, pp. 25–35, 2001.

ARQUES, J.L., FERNANDEZ, J., GAYA, P., NUNEZ, M., RODRIGUEZ, E., MEDINA, M. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against foodborne pathogens in milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.95, p.225–229, 2004.

ARQUES, J.L., NUNEZ, M., RODRIGUEZ, E., MEDINA, M. Antimicrobial Activity of Nisin, Reuterin, and the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada, a Semisolid Dairy Product Manufactured in Spain. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.70–75, 2007.

ARQUES, J.L., NUNEZ, M., RODRIGUEZ, E., MEDINA, M. Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated Milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. **European Food Research and Technology**, v.227, p.77–82, 2008.

BEIRÃO, L.H., TEIXEIRA, E., MEINERT, E.M. Processamento e industrialização de moluscos. In: **Seminário e Workshop “Tecnologia para Aproveitamento Industrial de Pescado”**, Campinas, Resumos, Campinas, ITAL, p.38-84, 2000.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL-BRDE. Agência de Florianópolis. Gerência de Planejamento. **Cultivo do camarão em Santa Catarina : panorama geral, reprodução e larvicultura**. Florianópolis : BRDE, 2004. 101 p.

BRUEL, S., COOTE, P., Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.1-17,1999.

CASAS, I.A., DOBROGOSZ, W.J.. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.12, p.257–85, 2000.

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

CLEUSIX, V., LACROIX, C., VOLLENWEIDER, S., LE BLAY, G. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. **FEMS Microbiology Ecology**, v.63, p.56–64, 2008.

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

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 191-166, 2001.. V. 21 (6), p.703–714, 2004.

EL-ZINEY, M.G., AND J.M. DEBEVERE. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. **Journal of Food Protection**, v.61, p.1275–1280, 1998.

EL-ZINEY, M.G.; VAN DEN TEMPEL, T.; DEBEVERE, J.M.; JAKOBSEN, M. Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. **Journal Food Protection**, v. 62, p.257–261, 1999.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia do alimentos**. São Paulo:

Atheneu, 182p. 2007.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p. 51-64, 1996.

HAMMES, W. & HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: **The Prokaryotes**. p. 320-403, 2006.

HAMMES, W. & HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: **The Prokaryotes**. p. 320-403, 2006.

HELANDER, I.M.; NURMIAHO-LASSILA, E.L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *International Journal Food Microbiology*, v. 71, p. 235–244, 2001.

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

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; MONFORT, J.M. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494. *Journal Applied Bacteriology*, v. 79 (3), p. 322–330, 1995.

ICMSF. Pescados y productos derivados. In:\_\_\_\_\_. **Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentares**. Zaragoza: Acribia, 1998; 121-66.

JEYASEKARAN, G., GANESAN, P., JEYA SHAKILA, R., MAHESWARI, K., SUKUMAR, D. Dry ice as a novel chilling medium along with water ice for short-term preservation of fish emperor breams, lethrinus (*Lethrinus miniatus*). *Journal Innovative Food Science and Emerging Technology*, v. 5, p. 485–493, 2004.

JEYASEKARAN, G., GANESAN, P., JEYA SHAKILA, R., MAHESWARI, K., SUKUMAR, D. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of

Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. **Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 526–533, 2006.

JONES SE, VERSALOVIC J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. **BMC Microbiology**, 9:35, 2009.

KIRSCHINK, P.G., VIEGAS, E.M.M. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 24(3), p.407-12, 2004.

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

LYHS, U., LAHTINEN, J., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HYYTIA-TREES, E., ELFING, K., KORKEALA, H. Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged gravad rainbow trout stored at 3 and 8°C. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.221–230, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n° 185 de 1997 da Secretaria de Defesa Agropecuária.. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal RIISPOA. Pescados e Derivados**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 mai.1997. C.7, seção 1.

MOURA, A.F.P., MAYER, M.D., LANDGRAF, M.,TENUTA A.F. Qualidade química e microbiológica de camarão-rosa comercializado em São Paulo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 39, p. 203-208, 2003.

NIKU-PAAVOLA, M.L., LAITILA, A., MATTILA-SANDHOLM, T., HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 29-35, 1999.

PRANOTO, Y., RAKSHIT, S.K., SALOKHE, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.38, p. 859-865, 2005.

RASCH, M., METRIS, A., BARANYI, J., BJØRN BUDDE, D.B. The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.35–40, 2007.

ROBERTS, C.M.; HOOVER, D.G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. **Journal Applied Bacteriology**, v. 81 (4), p.363–368, 1996.

ROLLER, S. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on a European Research project. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 36, p. 333-345, 1995.

RUCH, F.E., LENGELER, J., LIN, E.C.C. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.119, p.50-56, 1974.

RUCH, F.E., LENGELER, J., LIN, E.C.C. Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.124, p.348-352, 1975.

SOUZA, J.; RODRIGUES, L.G.G.; GONZALEZ, P.N.M.; TORTATO, R.; CARBONEA, N.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P. Atividade antimicrobiana do *Lactobacillus sakei* na fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*). **Vetor**, v. 16, p. 25-36, 2006.

SPINLER, J.K., TAWEECHOTIPATR, M., ROGNERUD, C.I.L., CHING, N.O., TUMWASORN, S., VERSALOVIC, J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe**, v. 14, p. 166-171, 2008.

SUÁREZ, H.M., FRANCISCO, A., BEIRÃO, L.H. Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 15, p. 32-40, 2008.

TOMÉ, E., TEIXEIRA, P., GIBBS, P.A. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.399–405, 2006.

VANDERZANT, C., COBB, B.F., THOMPSON, C.A., PARKER, J.C. Microbial flora, chemical characteristics and shelf life of four species of pond reared shrimp. **Journal of Milk and Food Technology**, v.36, p. 443–449, 1971.