

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Desenvolvimento de nanovesículas fosfolipídicas com incorporação de polissacarídeos para encapsulação de peptídeos antimicrobianos

Indjara Mallmann da Silva

Porto Alegre

2013

Indjara Mallmann da Silva

Desenvolvimento de nanovesículas fosfolipídicas com incorporação de polissacarídeos para encapsulação de peptídeos antimicrobianos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Adriano Brandelli

Co-Orientador: Dra. Nadya Pesce da Silveira

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Mallmann da Silva, Indjara

Desenvolvimento de nanovesículas fosfolipídicas com incorporação de polissacarídeos para encapsulação de peptídeos antimicrobianos / Indjara Mallmann da Silva. -- 2013.

62 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Coorientador: Nadya Pesce da Silveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Lipossomas. 2. Bacteriocinas. 3. Quitosana. 4. Sulfato de condroitina. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Pesce da Silveira, Nadya, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Brandelli pela confiança, exemplo profissional e apoio dado.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Nadya Pesce pelo apoio.

À Paula, Ana Paula, Roberta, Juliana, Stela e Volt por tudo que me ensinaram e me ajudaram nesse tempo no lab 218, e lógico que pelas nossas saídas regadas a cervejas, que incrível que pareça ajudaram a resolver muitos problemas laboratoriais.

Ao Márcio por toda a ajuda e explicações dadas para a estruturação da dissertação.

À todos colegas do mestrado pelas conversas, pelo companheirismo e ajuda dada, principalmente à Tenisa e Marcela por me aguentarem no lab 116.

À Andiará e Karla pela companhia em casa e pelas conversas e apoio durante todo mestrado.

À Maíra e Camila, minhas queridas primas que sempre estiveram ao meu lado.

À minha família por todo apoio e por nunca me deixarem desistir nos momentos difíceis.

A todos os professores, funcionários do ICTA e demais amigos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“This is ourselves under pressure”. (Queen)

RESUMO

O uso da nisina como conservante natural tem aumentado cada vez mais, assim como os estudos para aprimorar o uso desta. Este trabalho visa o aumento da eficiência da nisina na inibição de microorganismos, como a *Listeria*, através da encapsulação da mesma na forma de nanolipossomas com incorporação de polissacarídeos. Foram testados nanolipossomas de nisina e nanolipossomas de nisina com incorporação de quitosana e incorporação de sulfato de condroitina. As análises mostraram que estes lipossomas tiveram a mesma eficiência que a nisina livre na inibição da *L. monocytogenes 4b** e da *Listeria sp.** e uma maior eficiência na inibição da *L. monocytogenes 4b ATCC 6477*. As análises de potencial zeta indicaram que os lipossomas de nisina com e sem incorporação de polissacarídeos possuem carga em torno de -20mV e estes apresentaram estruturas esféricas e não esféricas quando observados através de TEM. Apesar dos nanolipossomas de nisina com incorporação de quitosana apresentarem uma eficiência de encapsulações mais baixa, em torno de 10%, estes tiveram maior estabilidade e também maior eficiência na inibição da *Listeria monocytogenes ATCC 7644*, quando comparados aos nanolipossomas de nisina com e sem incorporação de sulfato de condroitina, no tempo final de 24h a redução obtida foi de 2 log comparando-se com os demais tratamentos e de 7 log comparando-se aos controles.

Palavras-chave: Lipossomas. Bacteriocina. Quitosana. Sulfato de condroitina.

ABSTRACT

The use of nisin, as a natural preservative, has increased, as well as studies to enhance the use of that. The aim of this study is to increase the efficiency of nisin in inhibition of microorganisms such as *Listeria*, by encapsulating as nanoliposomes incorporated with polysaccharides. Nisin nanoliposomes and nisin nanoliposomes with incorporation of chitosan and chondroitin sulfate were analysed. The analyzes showed that these liposomes had the same efficiency as free nisin in inhibiting *L. monocytogenes* 4b and *Listeria sp.*, both isolated from bovine carcass, and greater efficiency in inhibiting *L. monocytogenes* 4b ATCC 6477. The zeta potential analyzes indicated that nisin liposomes with and without incorporation of polysaccharides have a load around -20mV and these showed spherical and non-spherical structures when observed through TEM. Despite of the efficiency of nisin nanoliposomes incorporating chitosan present lower values of encapsulation efficiency, around 10%, they were more stable and also more efficient in inhibiting *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 compared to nisin nanoliposomes with and without incorporation of chondroitin sulfate. In the final time of 24 hours the reduction obtained was 2 log compared with the other treatments and 7 log comparing to the controls.

Keywords: Liposomes. Bacteriocin. Chitosan. Chondroitin sulfate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural do lipossoma.....	21
Figura 2. Estrutura da quitosana	23
Figura 3. Estrutura do sulfato de condroitina.....	24
Figura 4. Eficiência de encapsulação.....	42
Figura 5. Efeito dos lipossomas contendo nisina no crescimento da <i>Listeria monocytogenes</i>	45
Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos lipossomas de nisina com incorporação de quitosana	46
Figura 7 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos lipossomas de nisina com incorporação de sulfato de condroitina.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de potencial zeta, tamanho e PDI dos experimentos preliminares realizados com os lipossomas	37
Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos lipossomas	38
Tabela 3. Resultados de tamanho e polidispersividade obtidos através do DLS	39
Tabela 4. Potencial Zeta dos lipossomas	40
Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos lipossomas	41
Tabela 6. Atividade antimicrobiana em ágar-leite contra diferentes cepas de <i>Listeria</i>	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Definição e classificação das bacteriocinas	12
1.2. Mecanismo de ação das bacteriocinas	15
1.3. A nisina e o peptídeo antimicrobiano P34.....	16
1.4. Aplicações de bacteriocinas em alimentos	18
1.5. Lipossomas.....	21
1.6. Quitosana	22
1.7. Sulfato de Condroitina	23
1.8. Lipossomas contendo peptídeos antimicrobianos	24
1.9. Aplicações em alimentos e sistemas modelo de bacteriocinas	27
encapsuladas em lipossomas.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1. Peptídeos antimicrobianos.....	30
2.2. Obtenção da fosfatidilcolina.....	30
2.3. Desenvolvimento das nanovesículas.....	31
2.4. Experimentos preliminares	32
2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	32
2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	33
2.7. Potencial Zeta.....	33
2.8. Medidas de espalhamento de luz (DLS).....	34
2.9. Teste em Ágar-leite	34
2.10. Eficiência de encapsulação	35
2.11. Curva de inibição da <i>Listeria monocytogenes</i>	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1. Experimentos Preliminares	36
3.2. DLS	38
3.3. Potencial Zeta	39
3.4. Atividade Antimicrobiana.....	40
3.5. Eficiência de Encapsulação	41
3.6. Teste em agar leite.....	43
3.7. Curva de inibição da <i>Listeria monocytogenes</i>	44

3.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	46
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais à procura de alimentos minimamente processados, que possuam longo tempo de prateleira, porém preparados sem a adição de conservantes químicos, o que leva as indústrias e instituições de pesquisa à busca de novas tecnologias de conservação (Gálvez et al., 2008; García et al., 2010).

Uma das alternativas para aumentar a segurança e o tempo de prateleira dos alimentos é a bioconservação, na qual uma microbiota protetora e/ou seus compostos antimicrobianos são aplicados. Entre os antimicrobianos produzidos por bactérias estão as bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos que são sintetizados ribossomicamente, inibindo na maioria dos casos as cepas estreitamente relacionadas à cepa produtora (Papagianni, 2003). A nisina, primeira bacteriocina aprovada para uso em alimentos, é produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e é, atualmente, o bioconservante natural mais utilizado no mundo. No Brasil permite-se o uso da nisina somente na indústria de laticínios, principalmente visando a inibição da *Listeria monocytogenes* e micro-organismos esporulados.

As bacteriocinas ou substâncias semelhante à bacteriocina (*bacteriocin-like substances*) são produzidas por várias bactérias, como por exemplo a cepa P34 de *Bacillus* sp. Esta bactéria produz substância semelhante à bacteriocina, a qual já foi estudada e caracterizada, mostrando-se eficaz na inibição de diversos micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Em experimentos *in vitro*, essa se apresentou não tóxica, possibilitando sua utilização como bioconservante em produtos alimentícios (Malheiros, 2011).

Um dos problemas que ocorre na aplicação direta das bacteriocinas nos produtos alimentícios é a diminuição ou perda da atividade antimicrobiana, devido as possíveis interações da bacteriocina com os componentes do alimento (Jung et al., 1992; Branen e Davison, 2004; Chollet et al., 2008). Para proteger as bacteriocinas dessas interações indesejáveis pode-se fazer a encapsulação destas em lipossomas. Os lipossomas são estruturas coloidais constituídas de um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto-associação de moléculas fosfolipídicas em bicamadas (Jesorka e Orwar, 2008). Sendo assim, podem ser

utilizados para encapsulação de substâncias hidrofílicas no seu núcleo aquoso, e compostos hidrofóbicos na camada lipídica, tendo, portanto, ampla aplicação na área alimentícia (Malheiros, 2011).

O presente projeto teve como objetivo desenvolver nanovesículas fosfolipídicas com incorporação de polissacarídeos para a encapsulação de peptídeos antimicrobianos, realizar sua caracterização e avaliar a eficácia destas no controle de *Listeria monocytogenes*.

Tendo como objetivos específicos:

- Desenvolver nanovesículas fosfolipídicas contendo o peptídeo antimicrobiano nisina;
- Desenvolver lipossomas contendo a bacteriocina parcialmente purificada produzida por *Bacillus* sp. linhagem P34 (BLS P34);
- Incorporar polissacarídeos (quitosana e sulfato de condroitina) à superfície dos lipossomas ;
- Visualizar a estrutura das nanovesículas por microscopia eletrônica de transmissão;
- Caracterizar os lipossomas através de:
 - a. Tamanho e polidispersidade, por espalhamento dinâmico de luz
 - b. Morfologia, por microscopia
 - c. Eficiência de encapsulação
 - d. Carga de superfície, por determinação de potencial zeta
 - e. Efeito *in vitro* sobre *Listeria monocytogenes*, por difusão em agar.

1.1. Definição e classificação das bacteriocinas

As bacteriocinas são definidas como substâncias antimicrobianas de natureza protéica, sintetizadas ribossomicamente, sem apresentar letalidade à cepa produtora (Montville e Kaiser, 1993; Jack et al., 1995; Cotter et al., 2005). As bacteriocinas são produzidas por vários grupos de bactérias, sendo que dentre as diferentes espécies, diferentes tipos de bacteriocinas são produzidas (Klaenhammer, 1993; Zouhir et al., 2010). Estas diferem no modo de ação, espectro de atividade, massa molecular, propriedades bioquímicas e origem genética (Diep e Nes, 2002).

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas foram divididas em quatro classes distintas: (I) lantibióticos, (II) pequenos peptídeos termoestáveis, (III) grandes proteínas termolábeis, (IV) grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura (Klaenhammer, 1993). Uma modificação nesta classificação foi proposta por Cotter et al. (2005) classificando as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas em duas categorias: os lantibióticos contendo lantionina (classe I) e os não lantibióticos (classe II), sendo os peptídeos de alto peso molecular termolábeis denominados 'bacteriolisinas' (classe III), sugerindo também a extinção da classe IV.

Uma nova organização foi proposta por Drider et al. (2006), distribuindo as bacteriocinas, de acordo com suas características bioquímicas e genéticas, em três classes. A classe I (lantibióticos) que é composta pelos peptídeos contendo lantionina ou β -lantionina e foi dividida em duas subcategorias: subcategoria A, englobando as moléculas lineares e tendo como principais exemplos a nisina e a subtilina, e a subcategoria B, que engloba as moléculas globulares, sendo a mersacidina e a mutacina os principais exemplos. Já a classe II é composta por peptídeos de até 10 kDa heterogêneos e estáveis, enquanto que a classe III é composta por proteínas maiores que 30 kDa termolábeis. Estas últimas possuem mecanismo de ação diferente das demais bacteriocinas, elas promovem a lise da parede celular do micro-organismo alvo, e possuem uma porção N-terminal homóloga a uma endopeptidase, que é a responsável pela catálise da parede celular, enquanto que o domínio C-terminal é responsável pelo reconhecimento da célula alvo (Lai et al., 2002). A classe II descrita foi subdividida por Nes et al. (2007) em quatro subclasses: IIa composta por bacteriocinas com atividade contra *Listeria*, como a pediocina; IIb englobando as bacteriocinas que requerem atividade combinada de dois peptídeos; IIc compreendendo as bacteriocinas que não apresentam peptídeo guia; e por último a classe II d apresentando as bacteriocinas circulares.

A mais recente classificação de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas foi proposta por Zouhir et al. (2010). Essa classificação é baseada nas sequências consenso dos aminoácidos que fazem parte da composição das bacteriocinas, dando origem a 12 grupos.

- Grupo 1: composto por 13 bacteriocinas, sendo elas peptídeos com 20 a 30 aminoácidos, incluindo a mutacina 2, lacticina 481 e 3147, mersacidina, plantaricina W alpha, mutacina H29B, streptococcina AFF22 e AM49, entre outras;
- Grupo 2: Formado por duramycina C, ancovenina e cinnamycina;
- Grupo 3: Composto por peptídeos contendo de 36 a 50 aminoácidos, sendo representado por 29 bacteriocinas com atividade *antilisterial*. Este grupo é dividido em subgrupo 3a, representado pela enterocina A, bavaricina MN, sakacina A, entre outras, e subgrupo 3b, representado pela bavaricina A, sakacina P, pediocina PA1, entre outras;
- Grupo 4: Composto por 8 bacteriocinas, entre elas a subtilina, nisina A e nisina Z;
- Grupo 5: Formado pela pep 5 e epicidina 280, antes classificados como lantibióticos tipo A (classe I);
- Grupo 6: Formado pela citolisina, plantaricina W beta e lacticina 3147 A2;
- Grupo 7: Composto pela acidocina J 1132 beta e plantaricina 1.25 beta, antes classificadas como classe IIb e IIc;
- Grupo 8: Composto pela carnobacteriocina A e enterocina B;
- Grupo 9: Formado pela plantaricina S alpha, gassericina T e lacticina F;
- Grupo 10: Composto pela lacticina F lafX, acidocina LF 221B e lactobina A;
- Grupo 11: Composto pela 705 e divergicina 750;
- Grupo 12: Formado pela lactococcina G beta, sublancina 168 e PlnJ.

Modificações nas classificações das bacteriocinas têm sido feitas de acordo com novas descobertas, levando um certo tempo até que um sistema definitivo seja obtido (De Martinis et al., 2002; Heng et al., 2007).

As substâncias semelhantes à bacteriocinas (*bacteriocin-like substances*) compreendem os compostos antimicrobianos cuja natureza protéica não é completamente definida ou que não apresentam todas as características de uma bacteriocina. Geralmente apresentam um amplo espectro de ação, atuando sobre diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando às vezes

atividade antifúngica, antiviral e amebicida (De Vuyst e Vandamme, 1994; Messens e De Vuyst, 2002, Benitez et al., 2010a; Todorov et al., 2010, Benitez et al., 2010b).

1.2. Mecanismo de ação das bacteriocinas

As bacteriocinas são divididas de acordo com seu mecanismo de ação, podendo ser bactericidas ou bacteriostáticas. O efeito bactericida é observado quando o micro-organismo alvo apresenta sensibilidade ao antimicrobiano, que provoca a morte celular rapidamente, mesmo quando em baixas concentrações. A sensibilidade à bacteriocinas está baseada na composição química da parede celular, sendo portanto diferente para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que as últimas geralmente necessitam sofrer uma desestabilização por estresse físico e/ou químico (Ennhar et al., 2000; Cotter et al, 2005; Nes et al., 2007).

Devido à grande variedade de suas estruturas químicas, as bacteriocinas afetam diferentes funções essenciais da célula alvo, mas a maioria atua através da formação de canais ou poros na membrana, levando a destruição do potencial energético das células sensíveis (Oscáriz e Pisabarro, 2001).

As bacteriocinas necessitam interagir com a membrana citoplasmática da célula alvo para que consiga formar os poros. Duas fases estão envolvidas nesta formação de poros, a primeira envolve as interações eletrostáticas entre a carga positiva e os resíduos polares da bacteriocina com os fosfolipídios aniônicos presentes na bicamada lipídica da membrana alvo (Abee et al.,1995). A segunda fase envolve mudanças letais em cepas sensíveis à bacteriocina, sendo por isso irreversível (Desmazeaud, 1997).

Para a descrição detalhada da permeabilidade dos peptídeos líticos com características anfipáticas na membrana foram propostos dois mecanismos.

- Modelo *barrel-stave*: a bacteriocina se liga como monômero na membrana citoplasmática e então insere-se na bicamada lipídica, os monômeros já inseridos agregam-se lateralmente formando assim o poro. Estudos têm demonstrado que o domínio C-terminal da nisina penetra na porção hidrofóbica da membrana (Martin et al., 1996). Porém outros estudos indicam que o domínio C-terminal é o responsável pela ligação da bacteriocina na membrana da célula sensível, enquanto que a

penetração na camada lipídica ocorre através do domínio N-terminal (Malheiros, 2011a).

- Modelo *Wedge*: a bacteriocina se liga a camada lipídica e é puxada para dentro da membrana através da força protônica. Neste caso o peptídeo não entra em contato com a porção hidrofóbica da membrana, fazendo com que não haja alteração de sua orientação em relação à bicamada lipídica (BRUNO E MONTVILLE, 1993).

Estudos mais detalhados sobre as bacteriocinas da classe I afirmam que os lantibióticos agem na membrana citoplasmática das bactérias sensíveis, e sabe-se que estes compostos utilizam o lipídeo II como receptor na membrana celular. Entretanto, um mecanismo de ação para todos lantibióticos ainda não está completamente elucidado. A ligação da bacteriocina ao lipídeo II facilita um mecanismo de ação duplo, que envolve a prevenção da síntese de peptídeoglicano e a formação dos poros (COTTER ET AL., 2005).

As bacteriocinas pertencentes a classe II não possuem aminoácidos modificados e dependendo do gradiente elétrico elas interagem com receptores para então se inserirem na membrana citoplasmática. Tais bacteriocinas possuem uma sequência comum de aminoácidos (Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina), possivelmente responsáveis pela aderência destas bacteriocinas nas células sensíveis (Ennahar et al., 2000). Os peptídeos desta classe geralmente possuem estrutura helicoidal anfifílica, permitindo que estes se insiram na membrana da célula alvo, acarretando na despolarização e morte desta (COTTER ET AL., 2005).

O mecanismo de ação das bacteriocinas pertencentes às classes III e IV (bacteriocinas de maior massa molecular) é pouco estudado (Hécharde e Sahl, 2002). Porém, sugere-se que as bacteriocinas pertencentes à classe III (Klaenhammer, 1993), também chamadas bacteriolisinas, atuam diretamente na parede celular das bactérias Gram-positivas, acarretando na lise e morte da célula alvo (Cotter et al., 2005).

1.3. A nisina e o peptídeo antimicrobiano P34

A nisina é um peptídeo antimicrobiano anfifílico e catiônico de 3,5 kDa, composto por 34 aminoácidos (Breukink e Kruijff, 1999), produzido por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Em 1969 esta bacteriocina foi considerada segura,

para utilização em alimentos, pelo *Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO), sendo assim utilizada como conservante em muitos países (Cotter et al., 2005). A nisina é aceita como aditivo alimentar para queijos processados, na concentração de 12,5 mg de nisina pura por kg de produto, pela FAO/WHO (Ross et al., 2002). Esta bacteriocina tem recebido grande atenção por causa do seu amplo espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas (*Listeria* e *Staphylococcus*), assim como pela inibição efetiva de esporos das espécies de *Bacillus* e *Clostridium* (Arauz et al., 2009).

A nisina possui duas principais variantes naturais, suas estruturas são semelhantes diferindo apenas no aminoácido de posição 27 (histidina na nisina A e asparagina na nisina Z). A nisina Z possui melhores propriedades de difusão no ágar, quando comparada à nisina A, característica esta importante para aplicação em alimentos (De Vos et al., 1993). Porém apenas a nisina A é comercializada estando disponível na forma de pó, como produto comercial (Nisaplin®), que apresenta 2,5% de nisina, sendo o restante constituído por leite e derivados sólidos do leite, provenientes da fermentação de meio de leite modificado por cepas de *L. lactis*, produtoras de nisina (Delves- Broughton, 2013). As proteínas do leite se ligam à nisina e diminuem sua atividade antimicrobiana, quando comparada a uma preparação purificada ou parcialmente purificada (Scott e Taylor, 1981; Cleveland et al., 2002).

Algumas limitações foram relatadas sobre a utilização da nisina, como o desenvolvimento de resistência em alguns micro-organismos. Outro problema bastante relevante é o fato de algumas bactérias produzirem substâncias proteolíticas, inibindo assim a ação da nisina. Já foi relatado em alguns trabalhos a expressão de nisinase, uma enzima responsável pela degradação da nisina (Lee et al., 2002; Garde et al., 2004; Liang et al., 2010).

As bacteriocinas produzidas por *Bacillus* possuem amplo espectro de ação, quando comparadas às produzidas por bactérias ácido lácticas, o qual engloba bactérias Gram-negativas, fungos ou leveduras, e espécies de bactérias Gram-positivas (Abriouel et al., 2011). Várias espécies, dentro do gênero *Bacillus*, produzem peptídeos antimicrobianos de diferentes estruturas químicas e que apresentam histórico de uso seguro em alimentos (Pedersen et al., 2002; Gebhardt et al., 2002). Em 1977 já haviam sido descritos 167 peptídeos, dentre estes 66

estavam associados a linhagens da espécie *Bacillus subtilis* e 23 eram referentes a espécie *Bacillus brevis* (Katz e Demain, 1977). Algumas outras espécies do gênero *Bacillus* produtoras de bacteriocinas são: *Bacillus polyfermenticus* (Lee et al., 2001), *Bacillus thuringiensis* (Ahern et al., 2003), *Bacillus licheniformis* (Cladera-Oliveira et al., 2004), *Bacillus cereus* (Bizani et al., 2005), *Bacillus amyloliquefaciens* (Lisboa et al., 2006), entre outros.

O *Bacillus* sp. linhagem P34 foi isolado do intestino do peixe Piau-com-pinta, originário da bacia amazônica brasileira. Este micro-organismo produz substância semelhante à bacteriocina (BLS - bacteriocin-like substance) que possui atividade contra bactérias patogênicas Gram-positivas, como *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (Motta et al., 2004). Esta BLS possui massa molecular de 1456 Da, é sensível às enzimas proteolíticas e relativamente estável ao calor. Possui atividade em uma ampla variação de pH (3,0 a 10) e caráter aniônico (Motta et al., 2007a; Motta et al., 2007b). Através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão foi observado que tal peptídeo age no envelope celular da bactéria alvo, levando a perda de protoplasma (Motta et al., 2008). De acordo com essas características a BLS P34 poderia estar associada com as bacteriocinas ativas contra *Listeria* da classe I (Klaenhamer, 1993).

O peptídeo antimicrobiano P34 apresenta baixa citotoxicidade *in vitro* e possui efeito similar a nisina, o que é um indicativo de que este é seguro no sentido toxicológico, indicando a possibilidade de aplicação dessa BLS em alimentos (Vaucher et al., 2010).

1.4. Aplicações de bacteriocinas em alimentos

A procura dos consumidores por alimentos minimamente processados ou “alimentos frescos” sem a adição de conservantes químicos tem estimulado a pesquisa por antimicrobianos naturais como as bacteriocinas (Gálvez et al., 2008; García et al., 2010). As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) são as mais estudadas atualmente, devido a tradicional associação destas a alimentos considerados seguros (Abriouel et al., 2011).

Vários trabalhos já foram desenvolvidos sobre bacteriocinas provenientes de BAL e suas aplicações em alimentos, principalmente em produtos lácteos, desde o início da utilização da nisina na década de 50 (García et al., 2010). A ação antimicrobiana da nisina sobre a *L. monocytogenes* em leite desnatado durante aquecimento foi estudada por Maisnier-Patin et al. (1995). Sendo que o uso de 25 ou 50 UI/mL de nisina reduziu significativamente o tempo necessário para a eliminação do patógeno. A eficiência da nisina comercial (Nisaplin®) foi avaliada por Davies et al. (1997) no controle de *L. monocytogenes* em ricota armazenada a 6-8°C durante 70 dias, onde a adição de 2,5 mg/mL de nisina inibiu o crescimento do patógeno por 8 semanas.

Ao se estudar o efeito inibitório da enterocina CCM 4231 sobre o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em leite verificou-se que após 24h ocorreu um decréscimo do número de células do patógeno, diminuindo de 10 log UFC/mL para 2 log UFC/mL na amostra contendo enterocina (Lauková et al., 1999). Ao aplicar a mesma bacteriocina em queijo *Saint-Paulin* observou-se uma redução de 3,6 log UFC/g na contagem de *L. monocytogenes*, em comparação ao queijo controle, após o armazenamento a 14°C por uma semana (Lauková et al., 2001).

O efeito da combinação de nisina e plantaricina UGI sobre a multiplicação de *L. monocytogenes* resistente a plantaricina UGI foi avaliado por Enan (2006). A mistura das bacteriocinas preveniu, tanto *in vitro* como em alimentos, a recuperação e multiplicação do patógeno resistente, sugerindo, portanto que o efeito sinérgico pode estender a vida útil de produtos cárneos e lácteos.

O uso da nisina como tratamento antimicrobiano, tendo em vista o aumento da vida útil do queijo *Galotyri*, demonstra que a adição de 50 UI/g e 150 UI/g de nisina aumentou a vida útil do mesmo, armazenado a 4°C durante 7 e 12 dias respectivamente. O queijo manteve as características sensoriais e a contagem de leveduras ficou dentro do limite aceitável (5 log UFC/g) (Kykkidou et al., 2007).

Diferentes concentrações de nisina foram avaliadas contra *S. aureus* em queijo Minas Serro, sendo obtido diferenças de 1,2 e 2 log UFC/g na contagem do patógeno após 7 dias de maturação, para queijos contendo 100 e 500 UI/mL de nisina respectivamente, em relação ao controle (Pinto et al., 2011).

Além das bacteriocinas produzidas por BAL, as bacteriocinas e substâncias semelhantes à bacteriocina (BLS) produzidas pelo gênero *Bacillus* podem ser

consideradas entre as mais importantes (Abriouel et al., 2011). Porém, apesar da grande diversidade de bacteriocinas produzidas por este gênero, que possuem propriedades tecnológicas e industriais interessantes, há poucos relatos sobre a aplicação das mesmas em alimentos. Dois exemplos da aplicação de bacteriocinas de *Bacillus* em produtos lácteos são bacillocin 490 e cereína 8A (Malheiros, 2011). Um estudo sobre o efeito do bacillocin 490, uma bacteriocina produzida por *Bacillus licheniformis* termofílico, contra *Bacillus smithii* em leite de búfala demonstrou 50% de redução do patógeno, após uma incubação de 5 horas a 25°C (Martirani et al., 2002).

Uma avaliação sobre inibição de *L. monocytogenes* em leite e queijo pela cereína 8A, uma bacteriocina produzida por *B. cereus* isolado de solo brasileiro, demonstrou que no leite UHT a bacteriocina reduziu a contagem do patógeno em 3 log UFC/mL, por 14 dias a 4°C. Porém quando a mesma foi aplicada durante produção do queijo Minas Frescal houve apenas um retardamento do início da fase exponencial. Quando a cereína 8A foi aplicada na superfície do queijo houve uma redução de 2 ciclos logarítmicos na contagem de *L. monocytogenes* durante 30 dias a 4°C. Tal efeito foi atribuído à inativação da 8A durante o processo de fabricação do queijo, devido enzimas endógenas ou à ligação a componentes da matriz alimentar (Bizani et al., 2008).

As bacteriocinas podem ser incorporadas nos alimentos por diferentes formas (Deegan et al., 2006; Gálvez et al., 2008):

- Através da utilização direta no alimento de bactérias produtoras de bacteriocinas;
- Por meio do uso de ingredientes preparados através da fermentação com bactérias produtoras de bacteriocinas;
- Através do uso de uma preparação purificada (ou semi-purificada) de bacteriocina como ingrediente.

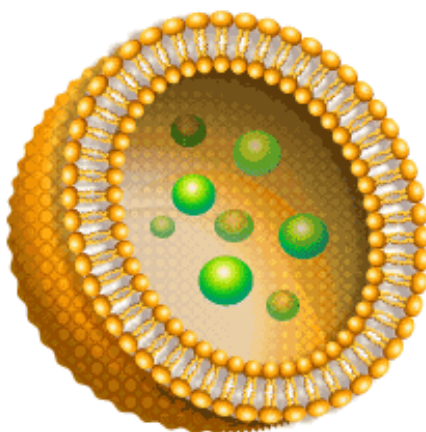
Porém muitos trabalhos indicam que a aplicação direta de bacteriocinas em alimentos pode resultar na diminuição ou perda da atividade antimicrobiana da mesma, devido a interação com os componentes dos alimentos (Jung et al., 1992; Branen e Davison, 2004; Chollet et al., 2008). Sendo assim a encapsulação das bacteriocinas em lipossomas pode representar alternativa tecnológica promissora.

1.5. Lipossomas

Lipossomas, ou suas versões nanométricas (nanolipossomas), são estruturas coloidais formadas pela absorção de energia para uma combinação adequada de moléculas constituintes (principalmente fosfolipídios) em uma solução aquosa (Mozafari et al., 2008a). Porém deve-se notar que nem todas as nanoestruturas compostas de fosfolipídios são lipossomas. Certas misturas de lipídios e/ou moléculas de fosfolipídios também podem resultar em estruturas como lamelar, micelar, hexagonal, ou fases cúbicas (Siegel e Tenchov, 2008).

Quando as moléculas anfifílicas, como fosfolipídios, são colocadas em um ambiente aquoso, formam complexos agregados em uma tentativa de proteger suas seções hidrofóbicas das moléculas de água, mantendo contato com a fase aquosa através de grupos hidrofílicos. Se uma quantidade suficiente de energia é fornecida aos fosfolipídeos agregados, eles podem arranjar-se de forma organizada, como bicamadas vesiculares fechadas (lipossomas ou nanolipossomas). Durante esse processo, os lipossomas podem “aprisionar” solutos hidrofílicos que estão presentes nos meios de hidratação (Mozafari et al., 2008a). Portanto, devido à presença de fases aquosa e lipídica na estrutura das vesículas, estas podem ser utilizadas na encapsulação e liberação de substâncias hidrossolúveis, lipossolúveis e anfifílicas (Khosravi-Darani et al., 2007; Mozafari et al., 2008a).

Figura 1. Representação estrutural do lipossoma.



Fonte: DDS (2013)

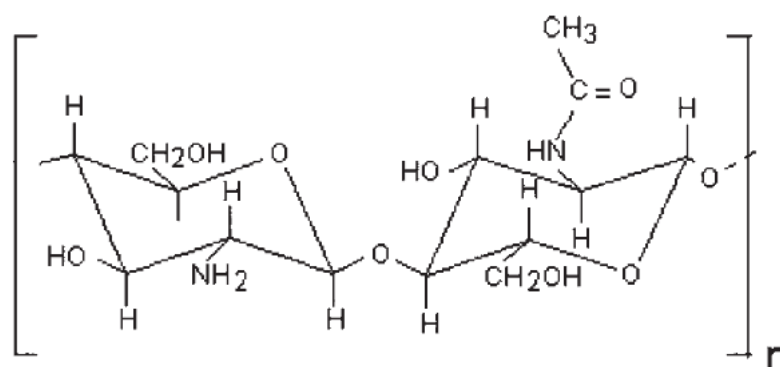
Os lipossomas têm sido testados como carreadores de agentes terapêuticos, como ferramenta analítica, assim como modelo de membranas biológicas (Sharma e Sharma, 1997; Frézard, 1999; Gómez-Hens e Fernández-Romero, 2005, Edwards e Baeumner, 2006; Date et al., 2007; Jesorka e Orwar, 2008). Já na indústria de alimentos, os mesmos têm sido investigados para promover a liberação controlada de proteínas, enzimas, vitaminas, antioxidantes e *flavors* (Taylor et al., 2005; Mozafari et al., 2006; Mozafari et al., 2008b).

Mais recentemente, os lipossomas foram investigados devido a sua capacidade de incorporar compostos bioativos, visto que estes podem proteger as substâncias encapsulada contra várias mudanças ambientais e químicas, como alterações de pH e temperatura (Mozafari et al., 2008a; Mozafari et al., 2008b). As barreiras reguladoras, que podem impedir a aplicação dos lipossomas em produtos alimentícios, são potencialmente reduzidas e até mesmo eliminadas ao visar que os mesmos podem ser preparados a partir de componentes naturais. Assim, novas formulações seriam implementadas rapidamente (Taylor et al., 2005; Mozafari et al., 2008).

1.6. Quitosana

A quitosana é derivada da quitina, encontrada na carapaça de crustáceos e insetos ou nas paredes celulares de fungos (Brugnerotto et al., 2001). A quitosana é obtida pela desacetilação, parcial ou total, da quitina, originando um polímero amino-substituído solúvel em soluções aquosas ácidas. Como a quitosana forma um sal nessas soluções, produzindo cadeias de polieletrólitos com cargas positivas nos átomos de nitrogênio dos grupos amino, suas interações com as regiões polares dos lipossomas são favorecidas, levando à sua deposição sobre os mesmos (Filho et al., 2000).

Figura 2. Estrutura da quitosana



Fonte: Janegitz et AL. (2007)

Visando a estabilização das membranas lipossômicas e, portanto, uma ação mais eficaz destas em diferentes ambientes e um aumento do tempo de retenção do material encapsulado, assim como do tempo de meia vida (permanência) destes no meio de aplicação, várias modificações têm sido propostas (MERTINS, 2004). Modificações na superfície dos lipossomas através do revestimento com polímeros como poli(etilenoglicol) ou copolímeros em bloco estão bem estabelecidas (Polozova et al., 1999; Johnsson et al., 1999; Johnsson et al., 2001). Nos últimos anos o interesse pelo uso de produtos naturais e alternativos tem aumentado. O conhecimento da existência de polissacarídeos nas superfícies celulares deu início ao estudo das interações entre lipossomas e diferentes grupos de polissacarídeos (Henriksen et al., 1994). Desta forma, o polissacarídeo catiônico quitosana foi descoberto como um bom candidato para estabilização e modificação do potencial de superfície de lipossomas, os quais a fosfatidilcolina é o principal lipídio que estrutura a membrana (Perugini et al., 2000; Guo et al., 2003).

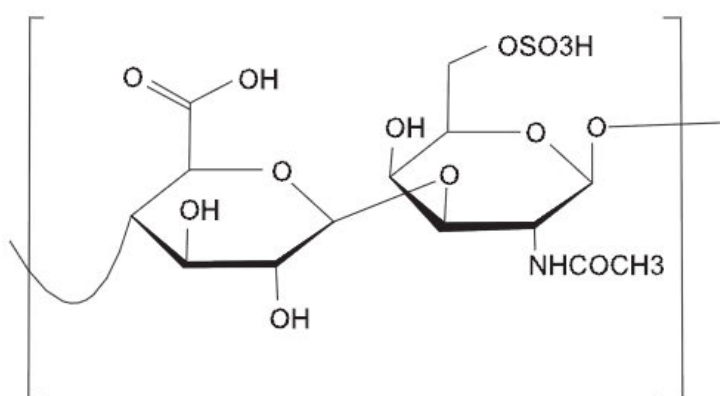
1.7. Sulfato de Condroitina

O sulfato de condroitina pertence a uma classe de moléculas muito grandes chamadas glucosaminoglicanos (GAGs), que são compostos de ácido glucurônico e galactosamina. A condroitina é fabricada a partir de fontes naturais, tais como cartilagem bovina e de tubarão. A condroitina pura é uma molécula relativamente

grande, com cerca de 16.900 Da. A espécie ou tecido de origem, assim como o método de extração utilizado, pode afetar o tamanho da molécula (FDA, 2013).

O sulfato de condroitina é um polieletrólito aniônico composto por unidades alternadas de ácido glucorônico e N-acetil-galactosamina e é sulfatado na posição 4 - ou 6- do resíduo N-acetil-galactosamina. Ele acelera a cicatrização de feridas através do aumento do influxo de fibroblasto dentro da ferida, porém o papel exato dos GAGs na cicatrização de feridas ainda precisa ser investigado (ANISHA, 2013).

Figura 3. Estrutura do sulfato de condroitina



Fonte: Rossignoli et al. (2008)

Assim como no caso da quitosana, o sulfato de condroitina será utilizado para incorporação do mesmo na superfície dos lipossomas, objetivando a obtenção de lipossomas com uma maior estabilidade através da mudança do potencial de superfície destes.

1.8. Lipossomas contendo peptídeos antimicrobianos

Há diversos métodos para preparação de lipossomas descritos na literatura (Mozafari, 2005; Mertins et al., 2005; Teixeira et al., 2008). Porém o mais utilizado na encapsulação de peptídeos antimicrobianos em nanovesículas lipossômicas é o de hidratação do filme fosfolipídico (Were et al., 2003; Taylor et al., 2005; Brandelli, 2012). Este método consiste na solubilização do lipídio em solvente e evaporação do mesmo, dando origem a um filme lipídico na superfície interna de um balão de fundo redondo. Adiciona-se a este filme a bacteriocina em solução tampão, facilitando-se a

dispersão dos fosfolipídios através de ultra-agitação. O filme se desprende da superfície do balão na forma de vesículas com diâmetros elevados e multilamelares (MLV). Para diminuir e homogeneizar o tamanho dos lipossomas deve-se fornecer energia, como ultra-som, extrusão e/ou microfluidificação (Sharma e Sharma, 1997; Jesorka e Orwar, 2008). O objetivo é a obtenção de vesículas com tamanho adequado, polidispersidade aceitável e alta eficiência de encapsulação (Mozafari et al., 2008a).

A concentração de composto que pode ser encapsulado é uma função da estrutura lipídica, e também dependente das interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os peptídeos antimicrobianos e os fosfolipídios (Were et al., 2003). A nisina, por exemplo, é um peptídeo antimicrobiano anfifílico catiônico (Breukink e Kruijff, 1999), e portanto, pode ser encapsulada tanto no interior da fase aquosa quanto ser imobilizada nas membranas dos lipossomas (Laridi et al., 2003). Uma maior eficiência de encapsulação da nisina é geralmente obtida com a utilização de fosfolipídios neutros (*zwitterionicos*), como a fosfatidilcolina (FC), quando comparada com lipossomas contendo lipídios aniônicos, como o fosfatidilglicerol (FG) (Were et al., 2003, Were et al., 2004; Taylor et al., 2008).

O potencial zeta é normalmente utilizado como um indicador de cargas na superfície dos lipossomas. Por exemplo, lipossomas de FC vazios possuem um potencial zeta de -8,3 mV a 25°C, enquanto que FC:FG (8:2) e FC:FG (6:4) têm potencial zeta de -52,28 e -72,60 mV, respectivamente (Taylor et al., 2007). Os lipossomas contendo cargas elétricas elevadas podem ser mais estáveis que os neutros, visto que quanto maior o potencial zeta, tanto positivo quanto negativamente, maior também será as interações repulsivas, reduzindo portanto a frequência das colisões (MALHEIROS, 2011a).

A carga do lipossoma também pode interferir na interação entre o peptídeo encapsulado e a bactéria. A célula bacteriana tem carga negativa e, portanto uma repulsão pode ocorrer, por exemplo, entre os lipossomas contendo FG e a superfície da célula, impedindo assim o contato direto entre o lipossoma e o patógeno (Were et al., 2004). Sendo assim poderia não ocorrer a fusão com a membrana, sendo este o principal mecanismo sugerido para interação entre os lipossomas e as bactérias (Mugabe et al., 2006; Colas et al., 2007).

Uma significativa redução no tamanho dos lipossomas é notada ao se fazer a encapsulação da nisina Z e comparar com lipossomas vazios (Laridi et al., 2003), isso pode ser atribuído ao efeito da nisina sobre a organização da membrana lipídica e/ou hidrofobicidade do lipídio, visto que a inserção da nisina pode levar a alteração da permeabilidade e estrutura da bicamada da membrana (El Jastimi e Lafleur, 1999; El Jastimi et al., 1999). Estudos mostraram que a encapsulação da nisina em lipossomas de FC resultou em um aumento no tamanho das vesículas, enquanto que a encapsulação em lipossomas de FC:FG (8:2, 6:4) acarretou numa diminuição no tamanho dos mesmos (Taylor et al., 2007). Os lipossomas de FC:FG podem ter atingido um nível de estruturação mais ideal, através da neutralização da carga do lipídio aniônico pela nisina e realinhamento dos fosfolipídios, o que poderia então explicar as reduções nos diâmetros (El Jastimi et al., 1999; Bonev et al., 2000; Taylor et al., 2007).

Estudos demonstraram que a incorporação de um peptídeo sintético contendo resíduos de lisina (carregadas positivamente), distribuídas ao longo da sequência do peptídeo, resultou em lipossomas com “aspecto amorfo”, sendo que a adição de um peptídeo contendo a carga positiva C-terminal resultou em lipossomas com morfologia de vareta. A incorporação de diferentes peptídeos em lipossomas pode resultar em diferenças no diâmetro (tamanho), potencial zeta e na morfologia dos lipossomas (Silva et al., 2008).

A incorporação de colesterol na composição do lipossoma geralmente resulta no aumento no diâmetro médio e diminuição da capacidade de encapsulação da nisina (Laridi et al., 2003; Were et al., 2003). O colesterol provoca o aumento da ordenação das cadeias lipídicas e estreitamento da parede do lipossoma, o que pode acarretar na redução da afinidade e capacidade de inserção da nisina na membrana lipídica (El Jastimi e Lafleur, 1999; El Jastimi et al., 1999). Porém o colesterol pode agir como um componente estabilizante do lipossoma, pela diminuição da permeabilidade na membrana lipídica e aumento das interações coesivas (Deo e Somasundaran, 2003). Resultados semelhantes foram obtidos para diferentes peptídeos antimicrobianos (Choi et al., 2004; Zhao et al. 2006; Verly et al., 2008).

Um outro fator importante para a eficiência de encapsulação é a concentração da nisina. Sendo que a capacidade de encapsulação da nisina aumenta com o

aumento da concentração do antimicrobiano. A maior capacidade de encapsulação pode indicar que parte da nisina é inserida ou imobilizada na membrana lipídica, sugerindo assim que a área da membrana lipídica disponível por unidade de massa de nisina não seria um fator limitante para adsorção do peptídeo sobre a membrana lipossômica (Laridi et al., 2003).

Fatores como pH da solução de nisina também poderiam ter um impacto significativo na quantidade de nisina encapsulada no lipossoma. Foi demonstrado que a diminuição do pH da solução de nisina gerou um aumento na quantidade da bacteriocina encapsulada em lipossomas preparados com diferentes pro-lipossomas (Pro-lipo H e Pro-lipo S). Isso pode ser devido a maior solubilidade da nisina em baixo pH e/ou aumento na ionização de certos grupos do peptídeo e certos constituintes dos lipídeos (Larid et al., 2003).

1.9. Aplicações em alimentos e sistemas modelo de bacteriocinas encapsuladas em lipossomas

Apesar de diversos estudos terem demonstrado a produção de lipossomas estáveis contendo peptídeos antimicrobianos, há poucos estudos sobre a aplicação destas bacteriocinas encapsuladas em alimentos ou sistemas modelo.

Um estudo mostrou que a encapsulação da pediocina AcH em lipossomas de FC resultou no aumento de 27,5% e 28,9% na recuperação da atividade da pediocina nas suspensões de músculo bovino e gordura, respectivamente, comparado com as mesmas suspensões contendo pediocina livre (Degnan e Luchansky, 1992). Em um estudo similar foi avaliada a atividade da pediocina AcH, encapsulada em lipossomas, em suspensões de leite em pó desnatado, nata, músculo bovino e gordura bovina (preparada em água deionizada, na concentração final de 10%). Foi observado um aumento na recuperação de 29-62% da pediocina encapsulada, em relação ao antimicrobiano livre (Degnan et al., 1993). Esses resultados mostram a eficácia dos lipossomas em manter a atividade das bacteriocinas, minimizando os efeitos negativos observados para a pediocina não encapsulada, tais como a associação da bacteriocina com proteína e/ou gordura presente nas suspensões e proteólise (Degnan e Luchansky, 1992; Degnan et al., 1993).

A maior parte das pesquisas dos últimos anos, avaliando a aplicação das bacteriocinas encapsuladas em sistemas modelos ou alimentos, vem sendo desenvolvidas com a nisina Z, visto que é um peptídeo aprovado para uso em alimentos e também devido suas propriedades de difusão em agar (Malheiros et al., 2010). Normalmente utiliza-se a *Listeria monocytogenes* como micro-organismo indicador, já que se trata de um importante patógeno de origem alimentar (Malheiros, 2011).

A estabilidade e os efeitos da nisina Z encapsulada em lipossomas, preparados com fosfatidilcolina hidrogenada de grau alimentício (pro-lipo H) e colesterol (20%, m/m), na fabricação de queijo *Cheddar* foram estudados por Laridi et al. (2003). A nisina Z encapsulada reduziu a população de *Lactococcus* viáveis sem interferir na fermentação do queijo *Cheddar*, e permaneceu estável durante todo o processo de produção deste. A liberação da nisina Z encapsulada, em diferentes meios, durante o armazenamento refrigerado (4°C) por 27 dias também foi avaliada pelos autores. Após 18 dias de armazenamento, a quantidade de nisina Z liberada no soro, tampão fosfato salino (PBS), leites contendo 3,25, 2,0 e 1,0% de gordura, e leite desnatado representaram, respectivamente, 78,2, 71,5, 63,7, 53,9, 45,5 e 39,2% da quantidade inicial de nisina Z encapsulada. Já no dia 27, a quantidade de nisina Z encontrada foi aproximadamente 40-50% menor do que no décimo oitavo dia de armazenamento. Portanto, a estabilidade das vesículas lipossômicas foi influenciada por fatores do ambiente externo, tais como cátions bivalentes no soro e o teor de gordura no leite (Laridi et al., 2003).

Os efeitos da nisina Z, encapsulada em lipossomas produzidos com pro-lipo H, na atividade antimicrobiana e nos atributos físico-químicos e sensoriais durante a maturação de queijo *Cheddar* foram avaliados por Benech et al. (2002a,b, 2003). Após seis meses os queijos acrescidos de nisina encapsulada apresentaram uma redução de 3,0 log UFC/g na população de *L. innocua* e 90% de recuperação da atividade antimicrobiana inicial. Já os queijos com adição de uma cepa produtora de nisina apresentaram uma redução de 1,5 log UFC/g na população de *L. innocua*, e tiveram uma diminuição progressiva da atividade nisinogênica inicial, o que correspondeu a apenas 12% em relação à atividade antimicrobiana apresentada no dia zero. Isso foi correlacionado com uma maior atividade e estabilidade da nisina encapsulada em relação à linhagem produtora de nisina (Benech et al., 2002a,b).

Foi observado que durante a maturação do queijo a nisina encapsulada e/ou nisina imobilizada na sua estrutura, estavam localizadas principalmente na interface gordura/caseína e/ou soro, sendo que a nisina produzida pela linhagem nisinogênica estava uniformemente distribuída na matriz do queijo fresco, mas concentrou-se na área de gordura com o passar do tempo. Sendo assim, a encapsulação ou imobilização nas membranas dos lipossomas pode representar uma forma alternativa para a liberação da nisina, melhorando a estabilidade, disponibilidade e distribuição da mesma na matriz do queijo, além de proteger a cultura *starter* da ação da nisina (Benech et al., 2002a; Benech et al., 2002b). Foi reportado também que a nisina encapsulada não afetou a proteólise nem as características sensoriais do queijo, enquanto que a adição da cepa nisinogênica junto com a cultura *starter* levou ao aumento da proteólise e lipólise, mas sem alterar significativamente as características reológicas (Benech et al., 2003).

O uso de lipossomas de FC e de FC:FG (6:4) contendo 5,0 ou 10,0 µg/mL de nisina, com ou sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), mostraram efeito inibitório quase equivalente contra *Listeria monocytogenes*, quando comparado à nisina livre junto ao EDTA. Apesar da multiplicação de *Listeria monocytogenes* não ter sido inibido durante o experimento (48 h) utilizando tanto a nisina livre quanto a encapsulada, houve uma inibição considerável do patógeno em comparação ao controle positivo. Entretanto a *Escherichia coli* O157:H7 apresentou inibição máxima quando nisina e EDTA foram co-encapsulados (TAYLOR et al., 2008).

Sendo assim a encapsulação de peptídeos antimicrobianos em lipossomas pode representar uma alternativa para superar alguns problemas relacionados com a aplicação direta de peptídeos antimicrobianos em alimentos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), nos seguintes laboratórios: Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e Laboratório de Secagem e Engenharia de Processos em Alimentos (Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA), Laboratório de

Instrumentação e Dinâmica Molecular (LINDIN) do Instituto de Química e Centro de Microscopia Eletrônica.

O peptídeo P34 foi utilizado apenas na realização dos experimentos preliminares, devido a grande dificuldade em obter estes com uma boa atividade antimicrobiana. Sendo os demais experimentos realizados apenas com a nisina comercial.

As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS 9.3 usando o teste Tukey com nível de significância de 0,05.

2.1. Peptídeos antimicrobianos

A nisina foi obtida a partir da preparação comercial Nisaplin™, onde a solução mãe foi resultante da dissolução de 1 g de Nisaplin em 10 mL de HCl 0,1M, e filtrada em membranas com poros de 0,22 µm, passando para um tubo esterilizado para ser armazenada. Para produção dos lipossomas a solução mãe era diluída em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 na proporção 1:4.

O peptídeo antimicrobiano P34 foi produzido a partir do *Bacillus* sp. P34. O *Bacillus* sp. P34 foi cultivado em meio BHI (Oxoid, Basingstoke, UK) em um agitador rotativo por 24 horas a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação, e o sobrenadante tratado com 20% (w/v) de sulfato de amônio e para precipitação do peptídeo, a purificação foi feita por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100. As frações ativas foram reunidas e armazenadas a 4°C (MOTTA et al., 2007a).

2.2. Obtenção da fosfatidilcolina

A fosfatidilcolina (PC) para produção de lipossomas foi obtida a partir de lecitina de soja, um subproduto na fabricação de óleo de soja. A lecitina de soja bruta (10 g) foi dissolvida em 50 mL de acetato de etila. Em seguida, lentamente e sob agitação, foram adicionados 2 mL de água destilada, levando a formação de duas fases. O sobrenadante foi separado da fase inferior e descartado. A fase inferior, com aspecto de gel, foi dispersa em 30 mL de acetona, levando a formação de aglomerados que foram triturados utilizando-se um bastão de vidro. Em seguida, a acetona foi separada por decantação e uma nova porção de 30 mL de acetona foi

adicionada, repetindo-se o processo de trituração. O precipitado foi então filtrado sob vácuo e seco em dessecador (Mertins et al., 2008a).

2.3. Desenvolvimento das nanovesículas

A metodologia utilizada para o desenvolvimento dos lipossomas contendo peptídeos antimicrobianos foi adaptada de Malheiros et al. (2010) a qual se deu da seguinte forma: primeiramente foi realizada a dispersão de 7,6 mg da fosfatidilcolina parcialmente purificada em 15 mL de clorofórmio (em um balão de fundo redondo). A evaporação para obtenção do filme de PC foi realizada com a utilização de rotaevaporador, e o balão contendo o filme foi armazenado *overnight* em um dessecador. Para a diluição do filme e formação dos lipossomas, primeiramente a solução do peptídeo antimicrobiano (nisina ou P34) foi aquecida a 60°C por 1 minuto sendo em seguida adicionada ao balão, o qual foi tampado com Parafilm® e agitado vigorosamente, o balão foi então aquecido por 2 minutos sobre uma leve agitação, seguido por um repouso de 2 minutos, esse processo foi repetido mais uma vez e então a solução foi transferida para um tubo de ensaio. O tubo foi aquecido por 2 minutos e levado ao vortex por 1 minuto seguido por um repouso de 5 minutos, este processo foi repetido 5 vezes. A diminuição e uniformização do tamanho dos lipossomas foi realizada com a utilização de um sonicador de ponta (Unique DE S500, frequência de 20 KHz), com 5 repetições de um 1 minuto a uma potência de 50%, seguido por 1 minuto de descanso entre cada repetição. A incorporação da quitosana e do sulfato de condroitina foi feita antes do processo de sonicação: adicionou-se 400 µL de cada polissacarídeo, ambos numa concentração de 1 mg mL⁻¹, deixando sob agitação por 30 min. Após o preparo os lipossomas foram filtrados utilizando-se membranas de 0,22 µm, para então ser realizada as análises (MALHEIROS et al., 2010).

Os controles foram preparados utilizando a mesma metodologia, porém a hidratação do filme foi feita utilizando-se apenas tampão fosfato 10 mM, pH 7,0.

2.4. Experimentos preliminares

Foram realizados alguns experimentos preliminares para testar o melhor método para adição da quitosana e do sulfato de condroitina. Os lipossomas foram preparados como descrito no item 2.3, porém para uniformização e redução de tamanho destes utilizou-se um banho de ultrassom (40 kHz, Unique USC 700) com uma temperatura de 45°C por 30 minutos. A adição da quitosana e do sulfato de condroitina foi realizada de duas maneiras: adicionando junto com o tampão/nisina no processo de hidratação do filme, e durante o processo de aquecimento e agitação, sendo realizada a adição depois da terceira repetição.

Utilizaram-se dois tipos de quitosana para os testes, Q1: Quitosana de massa molecular média (150 kDa) da Aldrich, e Q2: Quitosana de carapaça de caranguejo de grau técnico, mínimo 85% desacetilado, da Sigma-Aldrich. O sulfato de condroitina (MM de $2,2 \times 10^4$ g mol⁻¹) e a Quitosana 1 utilizados foram doados pela Prof. Dra. Nadya Pesce, do Instituto de Química da UFRGS.

Ambas quitosanas foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 0,02 mol L⁻¹ pH 4,5 com adição de NaCl 0,1 mol L⁻¹ em uma concentração de 1 mg mL⁻¹, sob agitação por 3 horas. Já o sulfato de condroitina foi dissolvido em água MilliQ também na concentração de 1 mg mL⁻¹. As 3 soluções foram filtradas em membranas de 0,22 µm antes de serem utilizadas.

Analizou-se também a utilização do ultrassom de ponta (Unique DE S500, frequência de 20 kHz) para homogeneização e redução de tamanho dos lipossomas, sendo feito testes com a potencia máxima (P99) e 50% da potência (P50) do equipamento. Este processo foi realizado com 5 repetições de 1 minuto com intervalos de 1 minuto de descanso.

2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi detectada através do teste de difusão em ágar, onde uma alíquota de 100 µL da nisina livre e da nisina encapsulada foram diluídas e aplicadas (10 µL) em placas de ágar BHI previamente inoculadas com um *swab* submerso em uma suspensão do microrganismo indicador (*L. monocytogenes* ATCC 7644), correspondendo a um padrão de turvação de 0,5 na Escala McFarland,

(aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. O valor proveniente da maior diluição que produziu uma zona de inibição foi tomada como unidade de atividade (UA) por ml (Motta e Brandelli, 2002).

Para analisar a estabilidade dos lipossomas ao longo do tempo foi retirada uma alíquota destes para o teste de atividade logo após preparação, e uma amostra de cada tratamento foi armazenada a 4°C e também a temperatura ambiente (25°C), e nas semanas seguintes testou-se a atividade dos lipossomas armazenados.

2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para visualização da estrutura das nanovesículas contendo os peptídeos antimicrobianos. Para a realização das análises foi utilizado o protocolo padrão para MET fornecido pelo Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que consiste na deposição da amostra sobre um *grid* e então feita a coloração negativa da mesma com acetato de uranila (2% w/v). Os lipossomas foram observados utilizando o Microscópio de Transmissão Eletrônica JEOL JEM 1200 ExII operado a 120 kV.

2.7. Potencial Zeta

Os sistemas coloidais como os lipossomas em suspensão aquosa podem apresentar comportamentos diferentes em relação aos fenômenos de agregação. Uma das maneiras de se investigar a estabilidade relativa coloidal dessas partículas é através da determinação do potencial zeta (ζ) destas, o qual dependendo da intensidade pode ter uma contribuição significativa nos processos de agregação ou não agregação dos lipossomas.

A determinação da magnitude do potencial zeta permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão, considerando que se todas as partículas apresentam um valor altamente positivo ou altamente negativo deste potencial, elas irão repelir umas às outras evitando assim a agregação. No caso de valores de potencial zeta muito baixos, próximos a zero, a ausência de carga superficial pode

favorecer, em alguns casos, interações entre as partículas, o que leva a processos de floculação ou agregação (MALVERN INSTRUMENTS, 2004).

O cálculo do potencial zeta é realizado através da determinação da mobilidade eletroforética e depois aplicando a equação Henry. A mobilidade eletroforética é obtida através da realização de um ensaio de eletroforese sobre a amostra e medindo a velocidade das partículas utilizando *Laser Doppler Velocimetry* (LDV) (NBTC, 2013).

Para as análises de Potencial Zeta os lipossomas foram filtrados e então diluídos em tampão fosfato, 10 mmol L⁻¹ pH 7,0. A medição foi realizada no Instituto de Química da UFRGS, no equipamento Zeta PALS da Brookhaven.

2.8. Medidas de espalhamento de luz (DLS)

O tamanho e polidispersividade (PDI) das partículas foi determinado no equipamento de espalhamento de luz dinâmico (DLS) Brookhaven, com configurações padrões (BI-200 M goniômetro, correlator digital BI-9000AT) e um laser He-Ne de 35 mV com λ de 632,8nm como fonte de luz. O valor aparente do raio hidrodinâmico R_h (relacionado com a difusão dinâmica das vesículas) foi determinado pelo DLS no ângulo de 90° através da relação Stokes-Einstein utilizando o coeficiente de difusão D_{app} dado pela Equação 1:

$$D_{app} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_h} \quad \text{Equação (1)}$$

onde, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η_0 é a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico (PECORA and BERNE, 2000).

2.9. Teste em Ágar-leite

Para simular um sistema modelo utilizou-se placas de ágar-leite para testar a eficácia dos lipossomas perante diferentes cepas de *Listeria*, sendo estas: *L. monocytogenes* 4B ATCC 6477, *Listeria sp.* Isolada de carcaça bovina, *L. innocua* 6a, *L. monocytogenes* 4b também isolada de carcaça bovina e *Listeria sp.* isolada de

queijo. As quatro primeiras cepas foram cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Tondo do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Controle de Qualidade em Alimentos do ICTA/UFRGS.

A atividade antimicrobiana contra estas cepas foi detectada através do teste de difusão em ágar, onde uma alíquota de 10 µL dos lipossomas foi aplicada nas placas de ágar-leite previamente inoculadas com um *swab* submerso em uma suspensão do microrganismo indicador, correspondendo a um padrão de turvação de 0,5 na Escala McFarland, (aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e então mediu-se o diâmetro dos halos formados.

2.10. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada por cromatografia líquida, adaptando-se a técnica utilizada por Yang (2012) e se deu da seguinte maneira: A amostra foi eluída em uma coluna de exclusão molecular Sephadex G100 para separação dos lipossomas contendo o peptídeo e da nisina não encapsulada. As alíquotas coletadas foram analisadas pelo método de Lowry (Lowry, 1951) visando determinar a quantidade do peptídeo em cada uma destas frações. Fez-se em seguida uma curva com os resultados obtidos, e calculou-se a eficiência de encapsulação pela equação 2, onde a área 1 refere-se ao pico dos lipossomas (quantidade de peptídeo encapsulado) e a área 2 ao pico da nisina livre (quantidade de peptídeo livre).

$$EE(\%) = \frac{Área1}{Área1 + Área2} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

2.11. Curva de inibição da *Listeria monocytogenes*

Para analisar o desempenho dos lipossomas em um sistema modelo, realizou-se uma curva de inibição do crescimento da *L. monocytogenes* com diferentes tratamentos. A metodologia foi adaptada de Motta e Brandelli (2002) e se deu da seguinte maneira: primeiramente a *L. monocytogenes* foi inoculada em caldo

TSB e incubada *overnight* em um shaker a 37°C, 100 µL desse caldo foi inoculado em Erlenmeyers contendo 9 mL de caldo TSB e 1 mL do tratamento. Foram utilizados 2 controles, um contendo apenas tampão fosfato e outro lipossomas em tampão fosfato, foram utilizados como tratamentos nisina livre, lipossomas de nisina, lipossomas de nisina com quitosana incorporada e lipossomas de nisina com incorporação de sulfato de condroitina. Todos tratamentos e controles foram preparados em triplicata e os Erlenmeyers colocados em um *shaker* a 37°C. Para realizar a contagem de células viáveis uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada tratamento em 0, 0,5, 1, 2, 4, 6 e 24 horas. Foram realizadas diluições seriadas até 10^{-5} e uma alíquota de 20 µL de cada diluição foi aplicada em placas com meio TSB. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, e então foi realizada a contagem de colônias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimentos Preliminares

Na tabela 1 estão apresentados os resultados de tamanho, potencial zeta e polidispersividade dos experimentos preliminares. É possível observar que os lipossomas de fosfatidilcolina mantêm-se numa faixa de 90 a 300 nm, com valores de potencial zeta variando de -10 a -40 mV. Os lipossomas contendo o peptídeo antimicrobiano P34 apresentaram bons resultados de tamanho, potencial zeta e uma excelente polidispersividade, porém a atividade antimicrobiana destes foi muito baixa nas análises realizadas, como pode ser observada na tabela 2. A atividade foi baixa inclusive nos testes com o peptídeo livre (dado não apresentado). Provavelmente essa baixa atividade antimicrobiana ocorreu por causa da baixa produtividade, além das perdas durante o processo de purificação do peptídeo, levando a uma atividade final muito baixa e insuficiente para encapsulação.

Deu-se continuidade ao trabalho utilizando apenas o peptídeo antimicrobiano nisina, que foi preparada conforme o item 2.1 e apresentou atividade antimicrobiana de 3200 UA mL⁻¹. Durante a produção dos lipossomas ocorreu a precipitação de diversas preparações quando a nisina foi colocada em contato com a fosfatidilcolina. As análises de tamanho, polidispersividade e potencial zeta também foram

realizadas para estes lipossomas, porém a variação entre as repetições foi muito grande, chegando a 500 nm para os lipossomas de nisina com adição posterior de quitosana.

Tabela 1. Resultados de potencial zeta, tamanho e PDI dos experimentos preliminares realizados com os lipossomas

Lipossomas contendo	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mv)	Polidispersividade
Tampão	172,4 ± 54,5	-16,98 ± 25,7	0,201 ± 0,101
Tampão + Q1	139,3 ± 10,1	-33,1 ± 6,2	0,141 ± 0,039
Tampão + Q1 *	177,75 ± 36,7	-16,76 ± 29,1	0,216 ± 0,016
Tampão + Q2	144,45 ± 45,2	-26,49 ± 5,1	0,223 ± 0,012
Tampão + Q2 *	224,4 ± 106,2	-34,24 ± 3,9	0,248 ± 0,101
Tampão + SC	108,7 ± 46,0	-39,69 ± 21,6	0,126 ± 0,110
Tampão + SC P99	87,2 ± 44,4	-21,915 ± 1,0	0,183 ± 0,027
Tampão + SC P50	94,05 ± 19,2	-11,5 ± 4,9	0,203 ± 0,019
Nisina	131,45 ± 48,3	-36,355 ± 9,5	0,246 ± 0,021
Nisina + Q1	235,2 ± 10,0	-37,35 ± 21,6	0,318 ± 0,085
Nisina + Q1*	182,1	-15,105 ± 14,0	0,202
Nisina + Q2	203,45 ± 39,5	-29,87 ± 10,0	0,251 ± 0,071
Nisina + Q2*	468,55 ± 505,2	-25,54 ± 11,3	0,097 ± 0,131
Nisina + SC P50	183,5 ± 18,0	-25,18 ± 19,4	0,182 ± 0,005
P34	459,15 ± 453,3	-44,48 ± 7,9	0,156 ± 0,072
P34 + Q1	103,35 ± 4,7	-34,505 ± 3,8	0,366 ± 0,181
P34 + Q1*	246	-43,68	0,281

*Quitosana adicionada durante o processo de aquecimento e agitação.

Q1=Quitosana 1, Q2=Quitosana 2, SC=Sulfato de Condroitina

P99 = Potência máxima no Sonicador de ponta; P50 = 50% da potência no sonicador de ponta;

Obs: Os lipossomas sem indicativo de P99 ou P50 foram homogeneizados e tiveram tamanho reduzido utilizando-se o banho de ultrassom.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos lipossomas

	Atividade contra <i>L. monocytogenes</i> (UA mL ⁻¹)
Nisina	3200/800
Nisina + Q1	3200/200
Nisina + Q1*	200
Nisina + Q2	400/1600
Nisina + Q2*	3200/400
Nisina + SC P50	0/0/400
P34	0/0
P34 + Q1	0/0
P34 + Q1*	1

*Quitossana adicionada durante o processo de aquecimento e agitação.
Q1=Quitossana 1, Q2=Quitossana 2, SC=Sulfato de Condroitina

Após alguns testes alterou-se o protocolo, no qual a nisina comercial foi dissolvida no próprio tampão fosfato e uma diluição na proporção 1:1 foi utilizada, obtendo-se assim a nisina com a mesma atividade antimicrobiana de 3200 UA mL⁻¹ contra a *L. monocytogenes* ATCC 7644, porém com um pH mais elevado do que a nisina dissolvida em HCl 0,1 molL⁻¹ e diluída em tampão fosfato. Essa diferença de pH foi o suficiente para evitar a precipitação que ocorria no processo de hidratação do filme de fosfatidilcolina.

Testou-se também a utilização de um ultrassom de ponta em vez do ultrassom de banho para o processo de homogeneização e redução de tamanho dos lipossomas. O resultado apresentado pelos dois foi semelhante, e o ultrassom com ponteira foi escolhido para dar continuidade ao trabalho, pois o processo de uniformização e redução de tamanho com este foi mais rápido.

Como nenhuma das quitosanas apresentou-se melhor ou pior a quitossana 1 foi escolhida para realização dos experimentos seguintes, sendo indicada apenas por quitossana.

3.2. DLS

Utilizando o equipamento de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi possível fazer as análises de tamanho e polidispersividade (PDI) dos lipossomas. Na tabela 3

é possível verificar os valores encontrados para os lipossomas de nisina, lipossomas nisina com incorporação de quitosana e lipossomas nisina com incorporação de sulfato de condroitina.

Tabela 3. Resultados de tamanho e polidispersividade obtidos através do DLS

	Tamanho (nm)	Polidispersividade
Nisina	147,7	0,400
Nisina + Quitosana	257,0	0,403
Nisina + Sulfato de Condroitina	345,0	0,589

Nota-se que os valores de PDI apresentados foram elevados quando comparados com os valores encontrados nos experimentos preliminares, e em trabalhos como o de Malheiros et al. (2010), onde a média de PDI foi de 0,346 para lipossomas de nisina sem incorporação de polissacarídeos. Já o tamanho está foi bastante semelhante, visto que o valor encontrado por Malheiros et al. (2010) foi de 137,7 nm e neste trabalho foi de 147,7 nm.

Devido a problemas com o equipamento de DLS será necessário realizar repetição dessas análises para obtenção de dados mais confiáveis.

3.3. Potencial Zeta

A análise do potencial zeta foi realizada para se verificar a carga superficial dos lipossomas e avaliar a influencia da incorporação dos polissacarídeos nessa propriedade. Cargas entre +20 e -20 mV indicam lipossomas mais instáveis, enquanto valores fora desta faixa são condizentes com lipossomas com maior estabilidade.

Ao realizar a análise de potencial zeta esperava-se um potencial mais positivo para os lipossomas contendo quitosana, visto que este é um polissacarídeo catiônico, e um potencial mais negativo para os lipossomas contendo sulfato de condroitina (aniônico) em relação aos lipossomas sem incorporação de polissacarpideos. Nota-se na tabela 4 que foi isso que aconteceu, porém, a diferença entre os resultados foi muito pequena, indicando que não houve diferença significativa entre esses lipossomas.

Tabela 4. Potencial Zeta dos lipossomas

	Potencial Zeta (mV)
Nisina	-22,46 ^a ± 1,75
Nisina + Quitosana	-17,60 ^a ± 6,40
Nisina + Sulfato de Condroitina	-26,98 ^a ± 5,81

^a Resultado apresentado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), indicando que não há diferença significativa entre os lipossomas.

Apesar dos lipossomas de nisina com incorporação de sulfato de condroitina (NSC) apresentarem um valor mais negativo, as análises estatísticas demonstraram que para um nível de significância de 0,05 não houve diferença significativa entre os valores obtidos para os diferentes lipossomas. Portanto não foi possível definir qual dos lipossomas apresentou maior estabilidade. Taylor et al. (2007) obteve valores de potencial zeta em torno de -7 mV, enquanto que Malheiros et al. (2010) obteve valores em torno de -50 mV.

3.4. Atividade Antimicrobiana

A nisina foi encapsulada conforme descrito em 2.3 e então, após filtrar o encapsulado em membrana estéril de 0,22 μ m, analisou-se a atividade antimicrobiana destes de acordo com o item 2.4. Os lipossomas foram armazenados em geladeira e temperatura ambiente (25°C), e a atividade testada ao longo dos dias. O resultado pode ser visualizado na tabela 5.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos lipossomas

		Atividade contra <i>L. monocytogenes</i> (UA mL ⁻¹)		
		1 dia	7 dias	14 dias
Armazenamento a 25°C	N	3200	400	1
	NQ	3200	800	200
	NSC	3200	400	0
Armazenamento a 4°C	N	3200	1600	200
	NQ	3200	1600	400
	NSC	3200	1600	200

N = Lipossomas de nisina, NQ = lipossomas de nisina com incorporação de quitosana, NSC = lipossomas de nisina com incorporação de sulfato de condroitina.

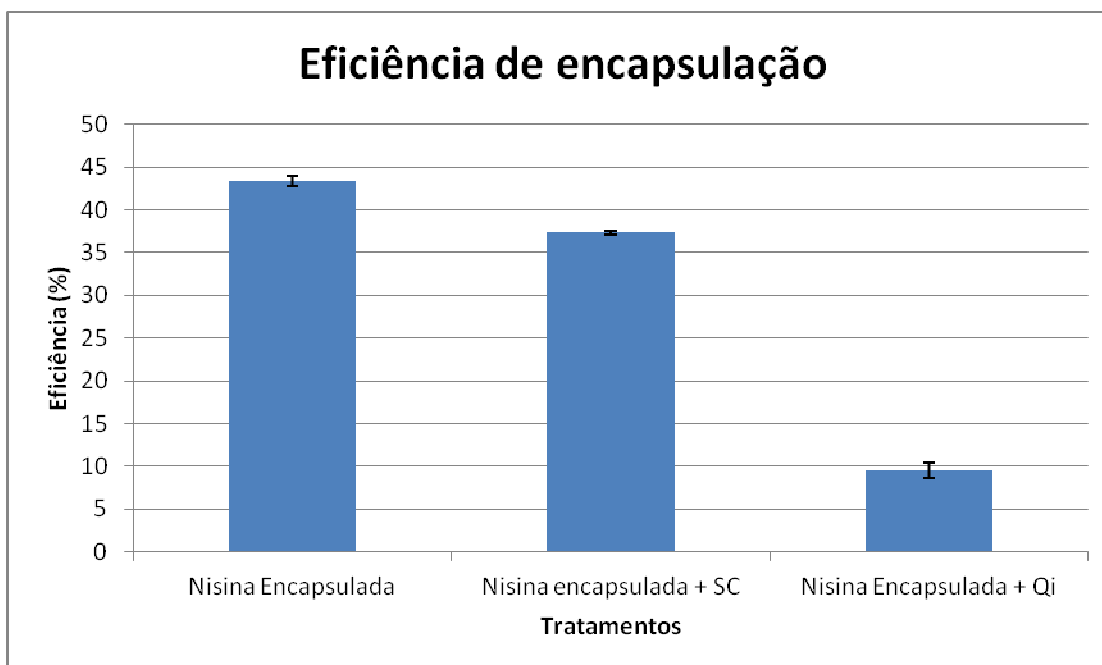
No primeiro dia a atividade apresentada por todos lipossomas foi a mesma da nisina livre, de 3200 UA mL⁻¹. Nota-se que no decorrer do tempo todos lipossomas foram perdendo a atividade, porém isso ocorreu mais lentamente para aqueles armazenados a 4°C, e dentre estes os lipossomas com incorporação de quitosana foram os que apresentaram maior estabilidade, visto que mantiveram uma atividade maior que os demais. No trabalho de Malheiros (2010) a atividade antimicrobiana foi monitorada por 24 dias, sendo esta mantida 100% pela nisina livre (1600 UA mL⁻¹), sendo observada uma queda na atividade dos lipossomas de nisina, que mantiveram apenas 25% (400 UA mL⁻¹) da atividade depois de 10 dias, mantendo este valor até o fim dos 24 dias.

3.5. Eficiência de Encapsulação

O cálculo da eficiência de encapsulação foi realizado como descrito no item 2.9, e está apresentado na figura 4. Como se pode verificar uma eficiência mais alta é observada para os lipossomas de nisina sem incorporação de polissacarídeos, em torno de 42%. A eficiência mais baixa é dos lipossomas com incorporação de quitosana, que é de aproximadamente 10%, apesar destes apresentarem uma menor eficiência de encapsulação a atividade antimicrobiana deles foi igual aos demais logo após a preparação, e ao longo do tempo de armazenamento estes foram os lipossomas que perderam a atividade mais lentamente. Uma das hipóteses para justificar essa eficiência de encapsulação tão baixa é que os lipossomas teriam

se rompido após a incorporação da quitosana, elevando assim a porcentagem de nisina livre, porém análises seriam necessárias para confirmar essa hipótese.

Figura 4. Eficiência de encapsulação



A eficiência obtida por Malheiros et al. (2010) foi de 94,12%, porém a separação da nisina livre da encapsulada foi realizada através da filtração por membranas. Em Were (2003) a eficiência de encapsulação foi determinada utilizando-se espectrofotometria de fluorescência, sendo que para isso os lipossomas foram preparados encapsulando apenas calceína ou juntamente com a nisina, a separação dos lipossomas da calceína e/ou nisina livre foi realizada através de cromatografia de exclusão molecular, os resultados indicaram uma eficiência de encapsulação para lipossomas de PC (fosfatidilcolina) foi de 71% para calceína e 63% para a co-encapsulação da calceína e nisina.

Apesar de todos os métodos se basearem no mesmo tipo de cálculo, as metodologias utilizadas para separação dos lipossomas e averiguação da quantidade de peptídeo encapsulado são diferentes, o que dificulta uma comparação entre esses resultados.

3.6. Teste em agar leite

A atividade antimicrobiana dos lipossomas foi testada contra 5 diferentes linhagens de *Listeria* em ágar-leite. O grau de inibição foi determinado pelo diâmetro do halo formado ao se colocar 10 µL dos lipossomas na placa previamente inoculada com *Listeria*.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana em ágar-leite contra diferentes cepas de *Listeria*

	Halo de inibição (cm)			
	Nisina Livre	Nisina	Nisina + Q	Nisina + SC
<i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 6477	1,1 ^{bA} ± 0,1	1,4 ^{aA} ± 0,1	1,5 ^{aA} ± 0,06	1,4 ^{aA} ± 0,1
<i>L. monocytogenes</i> 4b*	1,0 ^{aB} ± 0,1	0,9 ^{aB} ± 0,06	1,0 ^{aB} ± 0	0,9 ^{aB} ± 0,06
<i>Listeria</i> sp.*	1,0 ^{aB} ± 0,1	1,0 ^{aB} ± 0,06	0,9 ^{aB} ± 0,06	0,9 ^{aB} ± 0,11
<i>L. innocua</i> 6a*	1,0 ^{aB} ± 0,1	0 ^{bC} ± 0	0 ^{bC} ± 0	0 ^{bC} ± 0
<i>Listeria</i> sp.**	1,1 ^{aA} ± 0,1	0 ^{bC} ± 0	0 ^{bC} ± 0	0 ^{bC} ± 0

* Isoladas de carcaça bovina; ** Isolada de queijo.

^{a,b} Letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Letras distintas nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pelos resultados apresentados na tabela 6 é possível verificar que os lipossomas apresentaram comportamento similar entre si, todos apresentaram melhor eficiência contra a *L. monocytogenes* 4b ATCC 6477, e não conseguiram inibir a *L. innocua* 6 e a *Listeria* sp. isolada de queijo. No trabalho de Malheiros et al. (2012) foi observada uma inibição similar dos nanolipossomas de nisina e da nisina livre entre as diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* testadas.

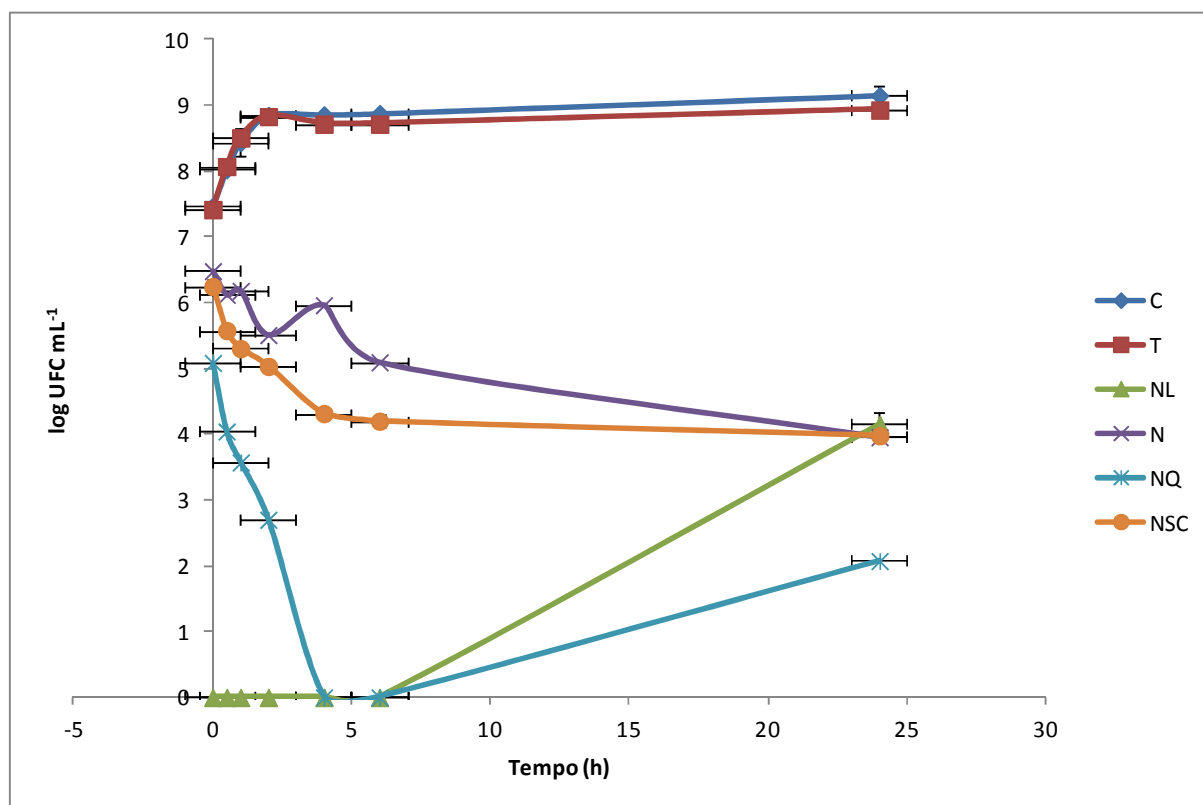
No presente trabalho os lipossomas foram mais eficientes que a nisina livre na inibição da *L. monocytogenes* 4b ATCC 6477, e apresentaram a mesma eficiência que a nisina livre na inibição da *L. monocytogenes* 4b e da *Listeria* sp*, os lipossomas só apresentaram eficiência inferior a nisina livre na inibição da *Listeria* sp.** e *L. innocua* 6a.

3.7. Curva de inibição da *Listeria monocytogenes*

Na figura 5 é possível observar a variação no cultivo da *L. monocytogenes* de acordo com o tratamento aplicado. Para verificar se o lipossoma em si apresentariam alguma influência sobre a multiplicação foi realizado um controle contendo tampão (C) e outro contendo lipossomas com tampão (T). Observando a figura 5, notou-se que o comportamento das curvas referente aos controles foi muito semelhante, e pela análise estatística foi possível verificar que, para um nível de significância de 0,05, não houve diferença significativa entre os controles.

Para poder comparar a inibição foi realizado um tratamento com a nisina livre e os demais com nisina encapsulada, com e sem incorporação dos polissacarídeos. Observou-se que a nisina livre (NL) inibiu a *L. monocytogenes* imediatamente, porém depois de um tempo (em torno de 6h) ela se esgotou e a *Listeria* voltou a se multiplicar. Já na presença dos lipossomas o comportamento foi inverso, no início a inibição destes é pequena e posteriormente ela aumentou.

Figura 5. Efeito dos lipossomas contendo nisina no crescimento da *Listeria monocytogenes*



(C) Controle com tampão fosfato, (T) Controle com lipossomas de tampão, (NL) Nisina livre, (N) lipossomas de nisina, (NQ) lipossomas de nisina com incorporação de quitosana e (NSC) lipossomas de nisina com incorporação de sulfato de condroitina.

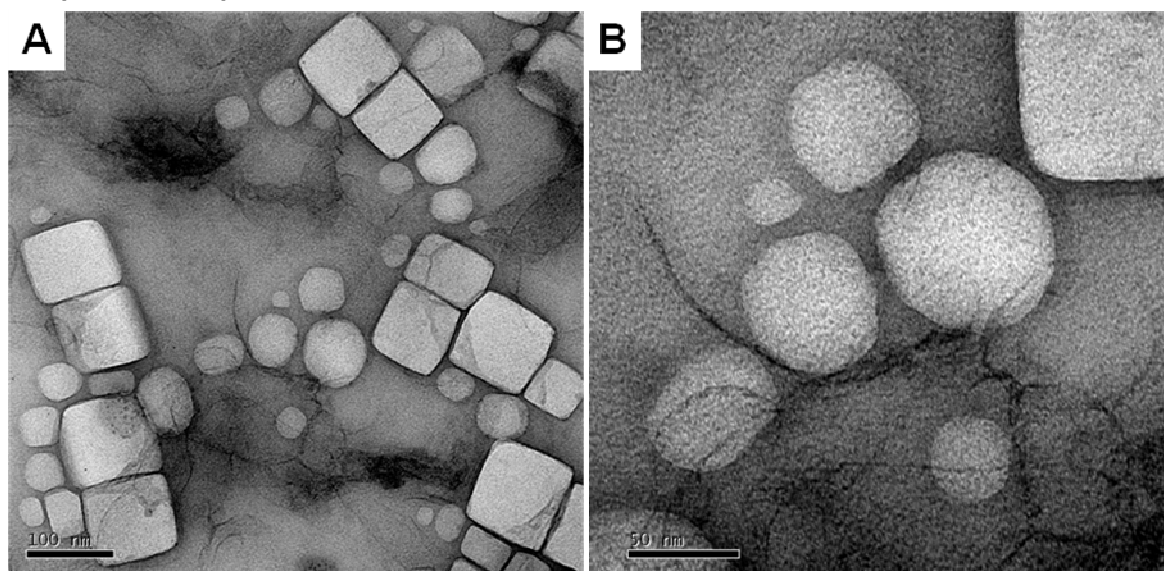
Nos estudos de Taylor (2008) a inibição da *Listeria monocytogenes* foi equivalente entre a nisina encapsulada, livre e EDTA para os tempos de 24 e 48h. Notou-se que neste o mesmo ocorre entre a nisina livre e a encapsulada (sem incorporação de polissacarídeos) para o tempo de 24h, porém uma inibição maior é notada na presença dos lipossomas de nisina com incorporação de quitosana, sendo que nos tempos de 4 e 6 horas estes lipossomas reduziram a população de *Listeria* quase a zero, e em 24h a redução foi de 2 log quando comparado com o multiplicação da *Listeria* na presença dos demais tratamentos, e uma redução de quase 7 log quando comparado ao controle. Esse comportamento indicou que ocorreu a liberação controlada da nisina, a redução nas primeiras horas ocorreu provavelmente pela presença da nisina livre, enquanto a nisina encapsulada foi sendo liberada aos poucos, impedindo que a *Listeria* tivesse um grande aumento. Sendo assim, foi possível observar a importância de se ter tanto a nisina livre, quanto a encapsulada presente no meio, para garantir uma maior eficiência na inibição da *Listeria*.

3.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para a análise de microscopia eletrônica de transmissão as amostras foram preparadas como descrito no item 2.6. Na figura 3 é possível observar a estrutura dos lipossomas de nisina com incorporação de quitosana. Nota-se que estes apresentam estruturas esféricas e não esféricas. O mesmo ocorre nas imagens obtidas para os lipossomas de nisina com incorporação de sulfato de condroitina (figura 4).

Kuntsche et al. (2011) aborda em seu trabalho os problemas ligados aos métodos de preparação das amostras para visualização por TEM, sendo que no caso da coloração negativa (utilizada neste trabalho), tanto o processo de coloração quanto o de secagem podem resultar em alterações estruturais, que devem ser levadas em consideração ao interpretar as imagens. Sendo assim as estruturas não esféricas visualizadas nas Figuras 6 e 7, podem ser decorrentes de alterações estruturais durante o processo de preparação.

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos lipossomas de nisina com incorporação de quitosana

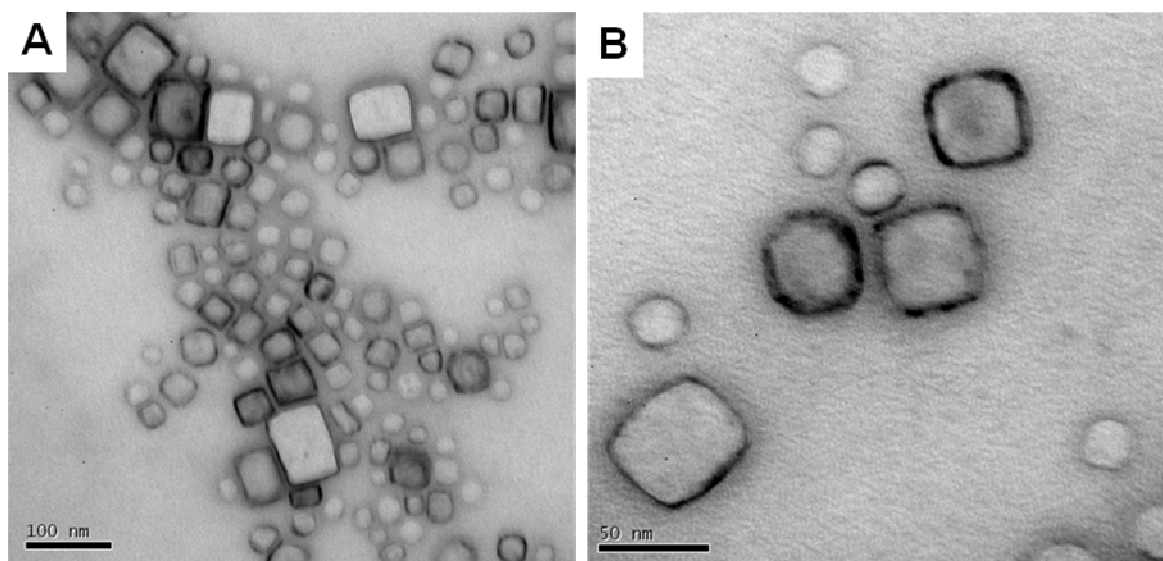


A: Escala de 100nm, B: Escala de 50nm

Para confirmar se as estruturas não esféricas são decorrentes de alterações no processo de preparação ou se realmente possuem essa estrutura seria necessária fazer uma microscopia eletrônica de transmissão criogênica (cryo-TEM) que em contraste com a TEM tradicional permite a investigação direta dos coloides

no estado vitrificado (estado congelado-hidratado), ou seja, muito próximo do estado nativo destes. Tal como ocorre na *freeze-fracture* TEM, informações sobre a estrutura interna dos coloides podem ser obtidas, por exemplo, vesículas multilamelares e nanopartículas com base em fases cúbicas ou hexagonal (Kuntsche et al., 2011).

Figura 7 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos lipossomas de nisina com incorporação de sulfato de condroitina



A: Escala de 100nm, B: Escala de 50nm

4. CONCLUSÃO

As análises de DLS e potencial zeta indicaram que os lipossomas de fosfatidilcolina com nisina, com ou sem incorporação de quitosana ou sulfato de condroitina se encontravam em tamanho nano e possuíam carga superficial em torno de -20 mV. Estes lipossomas apresentaram a mesma eficiência que a nisina livre na inibição da *L. monocytogenes* 4b e da *Listeria* sp. e uma maior eficiência na inibição da *L. monocytogenes* 4b ATCC 6477, porém os mesmos não foram capazes de inibir a multiplicação da *Listeria* sp. e *L. innocua* 6a. Apesar dos nanolipossomas de nisina com incorporação de quitosana apresentarem uma eficiência de encapsulações mais baixa, em torno de 10%, estes tiveram maior estabilidade e também maior eficiência na inibição da *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, quando comparados aos nanolipossomas de nisina com e sem incorporação de sulfato de

condroitina, sendo que no tempo final (24h) a redução obtida foi de 2 log comparando-se com os demais tratamentos e de 7 log comparando-se aos controles. É importante ressaltar que nem a alta polidispersividade e a presença de lipossomas não esféricos influenciou a eficácia dos lipossomas na inibição da *Listeria monocytogenes*. Pelos resultados apresentados foi possível observar que a incorporação de peptídeos antimicrobianos em nanoestruturas mostra-se uma excelente opção para a liberação controlada de bacteriocina, levando a um aumento da vida útil de produtos alimentícios.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, Amsterdam, v.28, p.169-85, 1995.
- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.M.A.P.; OMAR, N.B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiological Review**, Amsterdam, v.35, p.201–232, 2011.
- AHERN, P.; VERSCHUEREN, S.; VAN SINDEREN, D. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.22, p.127-131, 2003.
- ANISHA, B. S.; SANKAR, D.; MOHANDAS, A.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, A. V.; JAYAKUMAR, R. Chitosan–hyaluronan/nano chondroitin sulfate ternary composite sponges for medical use. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.92, p. 1470-1476, 2013.
- ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; VESSONI PENNA, T.C. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.20, p.146-154, 2009.
- BENECH, R.-O.; KHEADR, E.E.; LARIDI, R.; LACROIX, C.; FLISS, I. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.3683-3690, 2002a.
- BENECH, R.-O.; KHEADR, E.E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.5607-5619, 2002b.
- BENECH, R.-O.; KHEADR, E.E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Impact of nisin producing culture and liposome-encapsulated nisin on ripening of *Lactobacillus* added-cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.1895-1909, 2003.
- BIZANI, D.; MOTTA, A.S.; MORRISSY, J.A.C.; TERRA, R.M.; SOUTO, A.A. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **International Microbiology**, Barcelona, v.8, p.125-131, 2005.
- BIZANI, D.; MORRISSY, J.A.C.; DOMINGUEZ, A.P.M.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.121, p.229-233, 2008.

BONEV, B.B.; CHAN, W.C.; BYCROFT, B.W.; ROBERTS, G.C.; WATTS, A. Interaction of the lantibiotic nisin with mixed lipid bilayers: a ³¹P and ²H NMR study. **Biochemistry**, Washington, v.39, p.11425-11433, 2000.

BRANEN, J.K.; DAVIDSON, P.M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, p.63-74, 2004.

BENITEZ, L.B.; VELHO, R.V.; LISBOA, M.P.; MEDINA, L.F.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v.48, p.791-197, 2010a.

BENITEZ, L.B.; CAUMO, K.; ROTT, M.B.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*. Berlin, v.108, p.687-691, 2010b.

BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.12, p.731-741, 2012.

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

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUELLES-MONAL, W.; DESIBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

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

CHOI, M.J.; KANG, S.H.; KIM, S.; CHANG, J.S.; KIM, S.S.; CHO, H.; LEE, K.H. The interaction of an antimicrobial decapeptide with phospholipid vesicles. **Peptides**, New York, v.25, p.675-683, 2004.

CHOLLET, E.; SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, Oxford, v.19, p.982-989, 2008.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, p.251-256, 2004.

CLEVELAND, J.; CHIKINDAS, M.; MONTVILLE, T.J. Multimethod assessment of commercial nisin preparations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.29, p.228-232, 2002.

COLAS, J.C.; SHI, W.; RAO, V.S.N.M.; OMRI, A.; MOZAFARI, M.R.; SINGH, H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. **Micron**, New York, v.38, p.841-847, 2007.

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

DATE, A.A.; JOSHI, M.D.; PATRAVALE, V.B. Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.59, p.505-521, 2007.

DAVIES, E.A.; BEVIS, H.E.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.24, p.343-346, 1997.

DDS. **Doctor D. Schwab**. Liposomes. Disponível em: <<http://www.doctorschwabca.com/blog/tag/liposomes/>> Acesso em: 10 de Abr. 2013.

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

DELVES-BROUGHTON, J. **Feature Paper - Nisin as a food preservative.**

Disponível em:

<http://www.danisco.com/uploads/tx_tcdaniscofiles/Nissin_Danisco_uk.pdf>. Acesso em: 22 Jan. 2013.

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**, New York, v.18, p.191-208, 2002.

DEGNAN, A.J.; LUCHANSKY, J.B. Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome-encapsulated pediocin AcH. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, p.552-554, 1992.

DEGNAN, A.J.; BUYONG, N.; LUCHANSKY, J.B. Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.18, p.127-138, 1993.

DEO, N.; SOMASUNDARAN, P. Disintegration of liposomes by surfactants: mechanism of protein and cholesterol effects. **Langmuir**, Washington, v.19, p.2007-2012, 2003.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. **Cerela**, n.8, p.38-43, 1997.

DE VOS, W.M.; MULDER, J.W.; SIEZEN, R.J.; HUGENHOLTZ, J.; KUIPERS, O.P. Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.213-218, 1993.

DE VUYST, L.D.; VANDAMME E.J. **Bacteriocins of lactic-acid bacteria: Microbiology, genetics and applications**. London: Blackie Academic & Professional, 540p., 1994.

DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. **Current drug targets**, Illinois, v.3, p.107-122, 2002.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L.M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.70, p.564–582, 2006.

EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J. Liposomes in analyses. **Talanta**, London, v.68, p.1421-1431, 2006.

EL JASTIMI, R.; LAFLEUR, M. Nisin promotes the formation of non-lamellar inverted phases in unsaturated phosphatidylethanolamines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v.1418, p.97-105, 1999.

EL JASTIMI, R.; EDWARDS, K.; LAFLEUR, M. Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membranes. **Biophysical Journal**, New York, v.77, p.842-852, 1999.

ENAN, G. Control of the regrowing bacteriocin resistant variants of *Listeria monocytogenes* LMG 10470 in vitro and in food by nisin-plantaricin UG1 mixture. **Biotechnology**, Frankfurt, v.5, p.143-147, 2006.

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

FDA. **U.S. Food and Drug administration**. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/4045b1_04_Summary%20GCSOA%20FAC.htm>. Acesso em: 8 de Jan. de 2013.

Filho, S. P. C.; DESIBRIÈRES, J. **Chitin, Chitosan and Derivatives**. In: **Natural Polymers and Agrofibras Based Composites**. São Carlos: Suprema Gráfica, p. 41-71, 2000.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.32, p.181-189, 1999.

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N.B.

Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.28, p.125-152, 2008.

GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, A. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.141, p.151-155, 2010.

GARDE, S.; ÁVILA, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.96, p.165-172, 2004.

GEBHARDT, A.; SCHIMANA, J.; MÜLLER, J.; FIEDLER, H.P.; KALLENBORN, H.G.; HOLZENKÄMPFER, M.; KRASTEL, P.; ZEECK, A.; VATER, J.; HÖLTZEL, A.; SCHMID, D.G.; RHEINHEIMER, J.; DETTNER, K. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.217, p.199-205, 2002.

GÓMEZ-HENS, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J.M. The role of liposomes in analytical processes. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.24, p.9-19, 2005.

GUO, J.; PING, Q.; JIANG, G.; HUANG, L.; TONG, Y. Chitosan-coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 167-173, 2003.

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

HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. **The diversity of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria**. In: RILEY, M.A.; CHAVAN, M.A. Bacteriocins – Ecology and Evolution. Springer, Heidelberg, pp. 45–92, 2007.

HENRIKSEN, I; SMISTAD, G.; KARLSEN, J. Interactions between liposomes and chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 101, p. 227–236, 1994.

JANEGITZ, B. C.; LORENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons Metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, São Paulo, v.30, p.879-884, 2007.

JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiology Review**, Washington, v.59, p.171-200, 1995.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and analytical applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v.1, p.801-832, 2008.

JOHNSON, M.; SILVANDER; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. **Langmuir**. v.15, p. 6314, 1999.

JOHNSON, M.; BERGSTRAND, N; EDWARDS, K.; STALGREN, J. J. R. **Langmuir**. v.17, p.3902, 2001.

JUNG, D.; BODYFELT, F.W.; DAESCHEL, M.A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p.387–393, 1992.

KATZ, E.; DEMAIN, A.; The peptides antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis and possible functions. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v.41, p.449-474, 1977.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, Amsterdam, v.12, p.39-85, 1993.

KHOSRAVI-DARANI, K.; PARDAKHTY, A.; HONARPISHEH, H.; RAO, V.S.N. M.; MOZAFARI, M.R The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanovesicles for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy. **Micron**, New York, v.38, p.804-818, 2007.

KUNTSCHER, J.; HORSTB, J. C.; BUNJESB, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.417. p.120-137, 2011.

KYKKIDOU, S.; POURNIS, N.; KOSTOULA, O.K.; SAVVAIDIS, I.N. Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4 °C. **International Dairy Journal**, Barking, v.17, p.1254-1258, 2007.

LAI, A.C.; TRAN, S.; SIMMONDS, R.S. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.215, p.133-138, 2002.

LARIDI, R.; KHEADR, E.E.; BENECH, R.O.; VUILLEMARD, J.C.; LACROIX, C.; FLISS, I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. **International Dairy Journal**, Barking, v.13, p.325-336, 2003.

LAUKOVÁ, A.; CZIKKOVÁ, S.; DOBRANSKY, T.; BURDOVA, O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiology**, London, v.16, p.93-99, 1999.

LAUKOVA, A.; VLAEMYNCK, G.; CZIKKOVA, S. Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. **Folia Microbiologica**,

Praha, v.46, p.157-160, 2001.

LEE, K.L.; JUN, K.D.; KIM, W.S.; PAIK, H.D. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocina of *Bacillus polyfermenticus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, p.146-157, 2001.

LEE, S.S.; MANTOVANI, H.C.; RUSSELL, J.B. The binding and degradation of nisin by mixed ruminal bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v.42, p.339-345, 2002.

LIANG, X.; SUN, Z.; ZHONG, J.; ZHANG, Q.; HUAN, L. Adverse effect of nisin resistance protein on nisin-induced expression system in *Lactococcus lactis*. **Microbiological Research**, Jena, v.165, p.458-465, 2010.

LISBOA, M.P.; BONATTO, D.; BIZANI, D.; HENRIQUES, J.A.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.9, p.111-118, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

MALHEIROS, P. S.; MICHELETTO, Y. M. S.; DA SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, Barking, v. 43, p. 1198-1203, 2010.

MALHEIROS, P. **Desenvolvimento de Lipossomas Contendo Peptídeos Antimicrobianos para o controle de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.138, 2011a.

MALHEIROS, P. S.; SANT'ANNA, V.; MICHELETTO, Y. M. S.; DA SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 3545-3552, 2011b.

MALHEIROS, P. S.; SANT'ANNA, V.; BARBOSA, M. S.; BRANDELLI, A.; FRANCO, B. D. G. M. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 156, p. 272-277, 2012.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nano series**: User manual. England: Malvern Instruments, 2004.

MARTIRANI, L.; VARCAMONTI, M.; NACLERIO, G.; DE FELICE, M. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbiology Cell Factories**, v.1, p.1-5, 2002.

MARTIN, I.; RUYSSCHAERT, J.M.; SANDERS, D.; GIFFARD, C.J. Interaction of the lantibiotic nisin with membrane revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.239, p.156-164, 1996.

MERTINS, O. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina de Lecitina da Soja e Quitosana**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 63, 2004.

MERTINS, O.; SEBBEN, M.; POHLMANN, A.R.; SILVEIRA, N.P. Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v.138, p.29-37, 2005.

MERTINS, O.; SEBBEN, M.; Schneider, P.H.; ; POHLMANN, A.R.; SILVEIRA, N.P. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ¹H e de ³¹P. **Química Nova**, Vol. 31, No. 7, p. 1856-1859, 2008a.

MERTINS, O. **Estudos Físico-Químicos e Estruturais de Lipossomas Compósitos de Fosfatidilcolina e Quitosana**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 186, 2008b.

MESSENS, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.72, p.31-43, 2002.

MONTVILLE, T.J.; KAISER, A.L. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. (Eds) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. New York: Academic Press, p.1-22, 1993.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v.92, p.63–70, 2002.

MOTTA, A.S.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the amazon basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.307–310, 2004.

MOTTA, A.S.; CANNAVAN, F.S.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. **Archives of Microbiology**, New York, v.188, p.367-375,

2007a.

MOTTA, A.S.; LORENZINI, D.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a Novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon basin. **Current Microbiology**, New York, v.54, p.282-286, 2007b.

MOTTA, A.S.; FLORES, F.S.; SOUTO, A.A.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.93, p.275–284, 2008.

MOZAFARI, M.R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Warsaw, v.10, p.711-719, 2005.

MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A., OMRI, A.; SUNTRES, Z.E; SINGH, H. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.86, p.2038-2045, 2006.

MOZAFARI, M.R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, New York, v.18, p.309-327, 2008a.

MOZAFARI, M.R.; KHOSRAVI-DARANI, K.; BORAZAN, G.G.; CUI, J.; PARDAKHTY, A.; YURDUGUL, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v.11, p.833-844, 2008b.

MUGABE, C.; HALWANI, M.; AZGHANI, A.O.; LAFRENIE, R.M.; OMRI, A. Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.50, p.2016-2022, 2006.

NBTC. **Nanobiotechnology Center**. Zeta Potential Theory. Disponível em: <<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>>. Acesso em: 24 Jan. 2013.

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

OSCÁRIS J.C.; PISABARRO, A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **International Microbiology**, Barcelona, v.4, p.13-19, 2001.

PAPAGIANNI, M. Ribossomally synthesised peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications, **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 465-499, 2003.

PECORA, R.; BERNE, B. J. **Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics**. New York: Dover Publications, 2000.

PEDERSEN, P.B.; BJØRNVAD, M.E.; RASMUSSEN, M.D.; PETERSEN, J.N. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* spp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Washington, v.36, p.155–161, 2002.

PERUGINI, P.; GENTA, I.; PAVANETTO, F.; CONTI, B; SCALIA, S.; BARUFFINI, A. Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 51-61, 2000.

PINTO, M.S.; CARVALHO, A.F.; PIRES, A.C.S.; SOUZA, A.A.C.; SILVA, P.H.F.; SOBRAL, D.; PAULA, J.C.J.; SANTOS, A.L. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v.21, p.90-96, 2011.

POLOZOVA, A.; YAMAZAKI, A.; BRASH, J. L.; WINNIK, F. M. Effect of polymer architecture on the interactions of hydrophobically-modified poly-(*N*-isopropylacrylamides) and liposomes. **Colloids and Surfaces A**, v.147, p.17-25, 1999.

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

ROSSIGNOLI, P.; PONTAROLO, R.; CORRER, C. J.; CORDEIRO, G.; PERALTA-ZAMORA, P. Determinação espectroscópica multivariada de glucosamina e condroitina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1285-1289, 2008.

SCOTT, V.N.; TAYLOR, S.L. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, p.121-126, 1981.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.154, p.123-140, 1997.

SIEGEL, D. P.; TENCHOV, B. G. Influence of the lamellar phase unbinding energy on the relative stability of lamellar and inverted cubic phases. **Biophysical Journal**, Ohio, v.94, p.3987–3995, 2008.

SILVA, R.; LITTLE, C.; FERREIRA, H.; CAVACO-PAULO, A. Incorporation of peptides in phospholipid aggregates using ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v.15, p.1026-1032, 2008.

TAYLOR, T.M.; DAVIDSON, P.M.; BRUCE, B.D.; WEISS, J. Ultrasonic spectroscopy and differential scanning calorimetry of liposomal-encapsulated nisin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, p.8722-

8728, 2005.

TAYLOR, T.M. GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, P.M.; BRUCE, B.D.; WEISS, J. Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by zeta-potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. **Food Biophysics**, New York, v, 2, p.1-9, 2007.

TAYLOR, T.M.; BRUCE, B.D.; WEISS, J.; DAVIDSON, P.M. *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition *in vitro* by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. **Journal of Food Safety**, Westport, v.28, p.183-197, 2008.

TEIXEIRA, M.L.; SANTOS, J.; SILVEIRA, N.P.; BRANDELLI, A.. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Oxford, v.9, p.49-53, 2008.

TODOROV, S.D.; WACHSMAN, M.; TOME, E.; DOUSSET, X.; DICKS, L.M.T.; DESTRO, M.T.; VAZ-VELHO, M.; DRIDER, D.; FRANCO, B.D.G.M. Characterization of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, London, v.27, p.869-879, 2010.

VAUCHER, R.A.; MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. **Cell Biology International**, London, v.34, p.317-323, 2010.

VERLY, R.M.; RODRIGUES, M.A.; DAGHASTANLI, K.R.P.; DENADAI, A.M.L.; CUCCOVIA, I.M., BLOCH JR., C., FRÉZARD, F.; SANTORO, M.M.; PILÓ-VELOSO, D.; BEMQUERER, M.P. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. **Peptides**, New York, v.29, p.15-24, 2008.

WERE, L.M.; BRUCE, B.D.; DAVIDSON, P.M.; WEISS, J. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, p.8073-8079, 2003.

WERE, L.M.; BRUCE, B.D.; DAVIDSON, P.M.; WEISS, J. Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, p.922-927, 2004.

YANG, S.; CHEN, J.; ZHAO, D.; HAN, D.; CHEN, X. Comparative study on preparative methods of DC-Chol/DOPE liposomes and formulation optimization by determining encapsulation efficiency. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 434, p. 155-160, 2012.

ZHAO, H.; SOOD, R.; JUTILA, A.; BOSE, S.; FIMLAND, G.; NISSEN-MEYER, J.; KINNUNEN P.K. Interaction of the antimicrobial peptide pheromone plantaricin A with model membranes: implications for a novel mechanism of

action. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1758, p.1464-1474, 2006.

ZOUHIR, A.; HAMMAMI, R.; FLISS, I.; HAMIDA, J.B. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. **Protein Journal**, New York, v.29, p.432-439, 2010.