

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CÂMPUS MEDIANEIRA/ CAMPO MOURÃO**

REGIANE RAMALHO

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ENTEROCINA EM SORO DE LEITE VISANDO
APLICAÇÃO CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES**

DISSERTAÇÃO

**CAMPO MOURÃO
2020**

REGIANE RAMALHO

**MICROENCAPSULAÇÃO DE ENTEROCINA EM SORO DE LEITE VISANDO
APLICAÇÃO CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES**

**ENTEROCIN MICROENCAPSULATION IN WHEY AIMING THE APPLICATION
AGAINST FOOD PATHOGENS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Vitória Leimann.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Furlaneto Maia.

CAMPO MOURÃO

2020



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira



REGIANE RAMALHO

MICROENCAPSULAÇÃO DE ENTEROCINA EM SORO DE LEITE VISANDO APLICAÇÃO CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 25 de Setembro de 2020

Prof.a Fernanda Vitoria Leimann, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Leila Larisa Medeiros Marques, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Suelen Pereira Ruiz Herrig, Doutorado - Universidade Paranaense (Unipar)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 14/12/2020.

Primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado, ser tão presente e pelo dom da vida.

Ao meu esposo Eder que me deu tanto apoio me incentivou nas horas difíceis de desânimo e cansaço, quando mais precisei.

A minha mãe, mulher forte guerreira, pessoa admirável, que mesmo com as tribulações que enfrenta, sempre me incentivou, me apoiou para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai, que sempre me ensinou que o que ele poderia deixar de mais valioso para mim é o estudo (conhecimento).

A Minha irmã e minhas sobrinhas por acreditarem sempre em mim e no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Fernanda Vitória Leimann, por ter aceitado me orientar diante das circunstâncias, por todo conhecimento, paciência e compreensão.

A minha coorientadora Luciana Furlaneto Maia por me orientar, por ter sido mais que uma orientadora para mim. Obrigada por todo conhecimento adquirido, incentivo, compreensão, conselhos, ideias e paciência.

Aos professores do PPGTA, por todo conhecimento adquirido durante o mestrado, me auxiliando na minha formação profissional.

A banca examinadora, professoras Marly, Leila, Suelen por terem aceitado esse convite, pelas sugestões e correções apresentadas. Por contribuírem para essa realização em minha vida.

A Talita, por me auxiliar nas análises, por toda parceria até mesmo nos finais de semana.

Ao pessoal do laboratório de microbiologia da UEL e UTFPR de Londrina, por me auxiliarem nas análises.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente fazendo parte da minha vida, muito obrigada.

RAMALHO, R. **Microencapsulação de Enterocina em Soro de Leite Visando Aplicação Contra Patógenos Alimentares**. 51 f. 2020. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2020.

RESUMO

Enterocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos pelo gênero *Enterococcus*, e apresentam grande espectro de inibição contra bactérias potencialmente patogênicas, incluindo as veiculadas por alimentos. Entretanto, a inter-relação entre enterocina e matriz alimentar pode interferir na ação bactericida do peptídeo, assim, a microencapsulação tem sido uma alternativa para este propósito. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi microencapsular a enterocina produzida por *Enterococcus durans* MF5 usando soro de leite como agente encapsulante. Para a microencapsulação, soro de leite foi preparado na concentração de 10% acrescido de 10%p/p (E10) e 50%p/p (E50) de enterocina liofilizada. O material foi submetido ao processo de *spray drying* e foram realizados ensaios para determinar a atividade antimicrobiana do material encapsulado contra as bactérias *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovi*. O rendimento da microencapsulação foi de 31,66% e 34,16% para as concentrações E10 e E50, respectivamente. Não houve diferença significativa entre a ação antagônica das concentrações E10 e E50, sendo que a enterocina encapsulada apresentou-se eficiente por até 12 horas de cocultivo com células de *Listeria* sp. Enterocina encapsulada apresentou valores de 6.000 UA.mL⁻¹, sendo superior aos valores de enterocina pura. O dano causado na parede celular das bactérias alvo foi analisado pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A caracterização das partículas obtidas realizou-se por meio das análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Os resultados de FTIR mostraram a interação entre enterocina e soro de leite pela redução da intensidade da banda correspondente à estrutura β -pregueada da proteína do soro, que a encapsulação levou a uma modificação da estrutura proteica. Na análise térmica foi observada maior estabilidade térmica da enterocina encapsulada. Em conclusão constatou-se que a

microencapsulação de enterocina teve um rendimento satisfatório, e que a encapsulação potencializa o seu poder antimicrobiano, sendo assim a microencapsulação da enterocina é uma técnica totalmente aplicável em indústrias.

Palavras-chave: *Enterococcus E. durans*. Bacteriocina. *Spray dryer*. Patógenos alimentares.

RAMALHO, R. **Enterocin Microencapsulation in Whey Aiming the Application Against Food Pathogens**. 51 p. 2020. Master thesis (Post-Graduation Program of Food Technology – PPGTA). Federal University of Technology – Paraná. Campo Mourão, 2020.

ABSTRACT

Enterocins are antimicrobial peptides produced by the genus *Enterococcus* and have a wide spectrum of inhibition against potentially pathogenic bacteria, including those carried by food. However, the interrelationship between enterocin and the food matrix can interfere with the bactericidal action of the peptide. Thus, microencapsulation has been an alternative for this purpose. Given the above, the objective of this work was to microencapsulate the enterocin produced by *Enterococcus durans* MF5 using whey as an encapsulating agent. For the microencapsulation, whey was prepared at a concentration of 10% with the addition of 10%wt/wt and 50%wt/wt of lyophilized enterocin. The material was subjected to the *spray drying* process, and tests were performed to determine the antimicrobial activity of the encapsulated material against the bacteria *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria ivanovi*. The microencapsulation yield was 31.66% and 34.16% for enterocin concentrations of E10 and E50, respectively. There was no significant difference between the antagonistic action of the enterocin concentrations E10 and E50, and the encapsulated enterocin was efficient for up to 12 hours of co-culture with *Listeria* sp cells. It is also noteworthy that the encapsulated enterocin showed values of 6,000 UA.mL⁻¹, being higher than the values of pure enterocin. The damage caused to the cell wall of the target bacteria was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM). The characterization of the particles obtained was carried out employing Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The FTIR results showed the interaction between enterocin and whey by reducing the intensity of the band corresponding to the β -pleated structure of whey protein, which encapsulation led to a modification of the protein structure. In the thermal analysis, greater thermal stability of the encapsulated enterocin was observed. In conclusion, it was found that enterocin microencapsulation had a satisfactory yield, and that

encapsulation potentiates its antimicrobial power, thus enterocin microencapsulation is a fully applicable technique.

Keywords: *Enterococcus E durans*. Bacteriocin. *Spray dryer*. Food pathogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação bacteriocinas produzidas por BAL.....	18
Figura 2- Modo de ação de bacteriocinas de BAL.....	19
Figura 3 - Esquema de morfologia de cápsulas formadas após o processo de microencapsulação.....	24
Figura 4 - Imagens dos halos de inibição frente à <i>Listeria innocua</i> : (a) soro do leite em pó (controle); (b) E10; (c) E50.....	33
Figura 4 (d) - Unidade Arbitrária de enterocina e enterocina encapsulada (E50)	33
Figura 4 (e) zona de inibição da Enterocina, E10 e E50 frente à <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> e <i>Listeria ivanovii</i>	33
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura.....	35
Figura 6 - Densidade Óptica.....	37
Figura 7- Espectros de FTIR das amostras de enterocina pura (A); Enterocina encapsulada (B); Soro do leite (C).....	38
Figura 8 - Espectros de FTIR com região ampliada de 1200 a 1350 cm ⁻¹ das amostras de: (A) Enterocina encapsulada; (B) Soro do leite.....	41
Figura 9- Termogramas de DSC das amostras de Enterocina, Soro do leite e Enterocina encapsulada em soro do leite.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina trifosfato;

AU: Unidade arbitrária de atividade;

BAL: Bactérias ácidas lácticas;

BHI: Meio *Brain Heart Infusion*;

BSA: *Bovine Serum Albumin*;

CFS: *Cell Free Supernatant* (Sobrenadante livre de células);

DSC: *Differential Scanning Calorimetry* (Calorímetro Diferencial de Varredura);

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier);

MEV: Microscopia eletrônica de varredura;

MRS: Meio Man Rogosa;

NaOH: Hidróxido de sódio;

PBS: Tampão fosfato;

pH: Potencial de hidrogênio iônico;

p/p: Peso por peso;

rpm: Rotações por minuto;

UFC: Unidade formadora de colônia;

v/v: Volume por volume.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 BACTERIOCINA.....	16
3.1.2 Características gerais das bacteriocinas.....	16
3.1.3 Classificação e Mecanismo de ação das bacteriocinas.....	17
3.1.4 Aplicação de enterocina na indústria de alimentos.....	20
3.2 <i>Enterococcus</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	21
3.3 MICROENCAPSULAÇÃO DE BACTERIOCINAS.....	23
4 METODOLOGIA	28
4.1 LINHAGENS BACTERIANAS	28
4.2 MATERIAIS.....	28
4.3 PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ENTEROCINA.....	28
4.4 ENCAPSULAÇÃO DA ENTEROCINA.....	29
4.5 RENDIMENTO DO PROCESSO.....	29
4.6 ATIVIDADE ANTAGÔNICA DA ENTEROCINA SOBRE OS ISOLADOS ALVO.....	30
4.7 TESTE DA DILUIÇÃO SERIADA QUANTITATIVA.....	30
4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	30
4.9 MODO DE AÇÃO DA ENTEROCINA MICROENCAPSULADA	31
4.10 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O uso empírico de microrganismos e/ou seus produtos para a conservação de alimentos tem sido prática comum na história da humanidade (PAUL ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Dentre os produtos biológicos destacam-se os peptídeos com propriedades antimicrobianas, que são produzidos por muitos organismos vivos desde procariotos até eucariotos superiores (PAPAGIANNI, 2003).

As Bactérias do Ácido Lático são conhecidas pelo potencial em produzir compostos antimicrobianos, amplamente aplicados na indústria de alimentos, tais como as bacteriocinas (GARCI; GUERRERO-LEGARRETA; REGALADO, 2008; WIEDEMANN et al., 2006). Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos ativos contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, diferindo dos antibióticos em modo de ação e síntese (RODRÍGUEZ et al., 2000) Enterocinas são bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp (FURTADO et al., 2015), e afetam primariamente a membrana citoplasmática através da atração eletrostática, causando a liberação de íons, ácido nucleico intracelular e proteínas, levando à lise celular (VIDHYALAKSHMI, 2009) Enterocinas demonstraram atividade contra vários patógenos de origem alimentar, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium* sp, *Escherichia coli* e *Myxococcus* sp (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Diversos autores descreveram a aplicação de enterocina em alimentos como conservante natural, em carne bovina processada (MTIBAA et al., 2019), queijo cheddar (LEROY; FOULQUIÉ MORENO; DE VUYST, 2003), vegetais crus (BELLEI et al., 2011) embutidos (ANANOU et al., 2005), sucos de frutas (GRANDE et al., 2005), presunto cozido (ANANOU et al., 2010), leite em pó (IWASE TADASHI, 2017) e outros produtos lácteos (MUÑOZ et al., 2007).

Entretanto, inter-relações entre peptídeos antimicrobianos e componentes da matriz alimentar, como proteínas, lipídios, íons e surfactantes, podem reduzir a ação antimicrobiana. Ainda, o pH do meio em que a enterocina se encontra, baixa solubilidade, distribuição desigual no alimento e presença de proteases, podem interferir na ação do peptídeo e conseqüentemente sua eficácia (GÁLVEZ et al., 2007). Portanto, é necessário o desenvolvimento de alternativas que permitam a proteção dessas enterocinas mantendo sua eficácia e segurança na matriz alimentar.

A técnica de microencapsulação de bacteriocinas tem sido uma das abordagens para manter a eficiência dos peptídeos em matriz alimentar. Este

processo consiste na imobilização de substâncias no interior de uma matriz encapsulante, formando uma cápsula que deverá ser capaz de manter a sua integridade em ambientes adversos como temperatura, umidade, pressão osmótica, tensão mecânica, atividade enzimática, componentes químicos e alterações de pH (MADZIVA; KAILASAPATHY; PHILLIPS, 2005).

Durante o processo de microencapsulação, o revestimento criado no composto encapsulado pode ocorrer pelas técnicas de coacervação, co-cristalização, inclusão molecular, secagem por pulverização (ou *spray drying*), *spray chilling*, extrusão e secagem em leite fluidizado; sendo que a escolha da técnica dependerá do tipo de material a ser microencapsulado, aplicação final e mecanismo de liberação (LE et al., 2019). A técnica por *spray dryer* tem sido uma alternativa de baixo custo operacional além do baixo teor de umidade do material encapsulado (CORCORAN et al., 2004; GARDINER et al., 2000)

Diferentes materiais podem ser utilizados como material de revestimento, incluindo gelatina (LI et al., 2009), alginato de sódio (MANDAL; PUNIYA; SINGH, 2006), amidos (YING et al., 2010), maltodextrina (REDDY; ISHWARYA; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2019) e proteínas de soro de leite (YING et al., 2010), sendo este um material de baixo custo e de segurança em alimentos (GBASSI et al., 2009; WANG et al., 2017). Embora a proteína de soro de leite tem sido utilizada como agente encapsulante, não há relatos na literatura sobre a microencapsulação de enterocinas com este substrato. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi microencapsular enterocina em matriz soro de leite visando garantir a atividade deste peptídeo contra patógenos alimentares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Microencapsular enterocina em soro de leite pelo método *spray drying* e verificar a ação antagônica em patógenos alimentares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter enterocina a partir do isolado *E. durans* MF5;
- Microencapsular a enterocina em soro de leite por *spray drying*;
- Determinar a atividade antagônica da enterocina pura e encapsulada contra *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *Pseudomonas* sp, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovi*;
- Verificar alterações na morfologia de parede das bactérias alvo após contato com enterocina pura e encapsulada;
- Verificar interações entre a enterocina e o soro de leite após a microencapsulação, por meio da caracterização das partículas por FTIR;
- Caracterizar a estabilidade térmica das micropartículas obtidas por Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bacteriocinas

Bacteriocinas são proteínas ou peptídeos antimicrobianos com ação bactericida e/ou bacteriostática (SILVA et al., 2015). A ação bactericida ocasiona a lise celular e/ou inibição da síntese de alguns compostos importantes para a sobrevivência da célula. Já a ação bacteriostática inibe a multiplicação celular, inibição da síntese de alguns compostos importantes para a sobrevivência da célula (CARVALHO, 2015).

3.1.2 Características gerais das bacteriocinas

André Gratia, em 1925, descreveu pela primeira vez a presença de um agente antibiótico em meio líquido produzido por uma amostra virulenta de *Escherichia coli*. Esta substância termoestável foi denominada como princípio V, mais tarde chamada de colicina V. Anos após sua descoberta, este autor estabeleceu a natureza proteica dessa colicina, notando também a existência de substâncias similares produzidas por outras amostras de *E. coli* (GILLOR; VRIEZEN; RILEY, 2008). Recentemente, o termo bacteriocinas, refere-se a peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos que atuam contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MATHUR et al., 2017).

Muitas bacteriocinas são especialmente ativas contra bactérias gram-positivas, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, além de células vegetativas e esporos de *C. botulinum* (GARCI; GUERRERO-LEGARRETA; REGALADO, 2008) e diferem dos antibióticos em dois aspectos: em primeiro lugar, as bacteriocinas são peptídeos sintetizados nos ribossomos, enquanto os antibióticos são sintetizados por enzimas. Em segundo lugar, as bacteriocinas possuem um espectro estreito de bactérias alvo, enquanto os antibióticos são ativos contra uma vasta gama de bactérias. Outra diferença é a concentração inibitória de bacteriocinas sendo mais baixas quando comparadas aos antibióticos (PARADA et al., 2007).

A biossíntese das bacteriocinas ocorre nos ribossomos durante ou no final da fase exponencial de crescimento bacteriano, e são liberados no meio extracelular, sendo influenciada pela biomassa bacteriana e o meio de cultivo de crescimento, principalmente pela fonte de carbono (LEROY; DE VUYST, 2002). A expressão das

bacteriocinas envolve quatro tipos de genes: (1) o gene responsável pela produção do pré-peptídeo, (2) o gene de imunidade específica que confere a produção de uma proteína de imunidade à célula hospedeira, (3) o gene que codifica proteínas do transportador ABC, responsável por exteriorizar a bacteriocina, e (4) o gene que codifica uma proteína acessória essencial para a exteriorização da bacteriocina. Esses genes estão organizados em um ou dois *operons*, localizados no cromossomo, plasmídeos ou transposons (NES; DIEP; HOLO, 2007).

As bacteriocinas são geralmente inativadas por enzimas proteolíticas, incluindo as enzimas presentes no trato digestório, a exemplo tripsina e a α -quimiotripsina; essa característica as torna bastante interessantes quanto ao uso como bioconservantes em alimentos visto que não alteram a microbiota (HERMANN, 2013). Ainda, são frequentemente ativas em uma faixa de valores de pH e resistentes a altas temperaturas (AHMAD et al., 2017; SCHITTLER et al., 2019)

3.1.3 Classificação e Mecanismo de ação das bacteriocinas

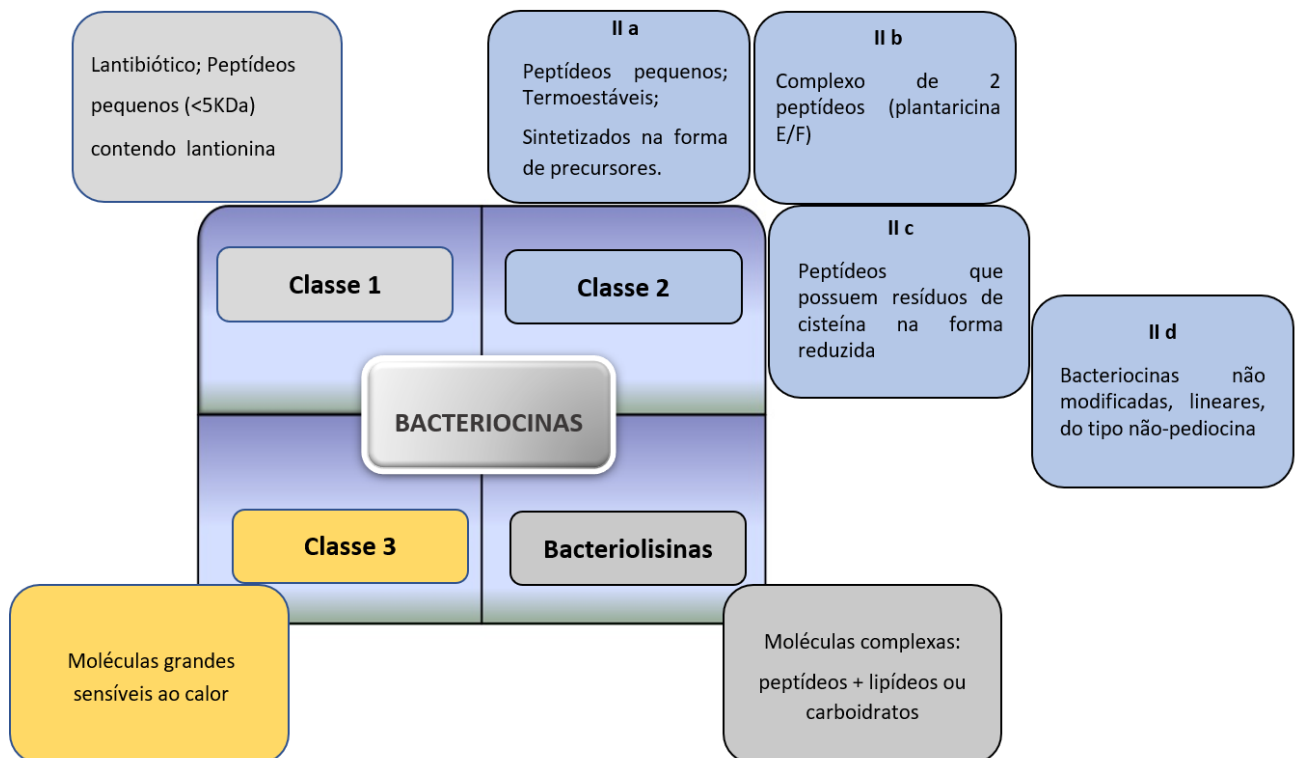
As bacteriocinas são classificadas majoritariamente em três classes com subclasses (ALVAREZ-SIEIRO et al., 2016). No entanto, existe ainda a classe denominada de bacteriolisinas, sendo constituída por grandes complexos de peptídeos com porções de carboidratos ou lipídios (GÜLLÜCE; KARADAYI; BARIŞ, 2013) (Figura 1).

Bacteriocinas de classe I compreendem de 19 a 50 aminoácidos e são extensivamente modificadas após a tradução, resultando em aminoácidos não padronizados, como lantionina, β -metilantionina, desidrobutirina, desidroalanina e labirintina. Ainda, a classe I é subdividida em classe Ia (lantibióticos), classe Ib (labirintopeptinas) e classe Ic (sanctibióticos). A nisina é uma bacteriocina classe I mais popular (LE et al., 2019). A Classe II contém pequenos peptídeos estáveis ao calor, não modificados, e pode ser subdividida em classe IIa (bacteriocinas do tipo pediocina), classe IIb (bacteriocinas não modificadas com dois peptídeos), classe IIc (bacteriocinas circulares) e classe IIId (bacteriocinas não modificadas, lineares, do tipo não-pediocina) (KUMARIYA et al., 2019). As bacteriocinas da classe III compreendem peptídeos grandes e lábeis ao calor.

As bacteriolisinas compreendem proteínas complexas conjugadas a lipídeos ou carboidratos hidrofóbicos e estáveis ao calor. Geralmente são bacteriocinas circulares, sendo a enterocina AS-48 seu representante (O'BRYAN et al., 2018).

Essas classificações das bacteriocinas em grupos estão evoluindo continuamente à medida que mais informações sobre suas especificidades individuais são coletadas, descrevendo sua complexidade e diversidade.

Figura 1- Classificação bacteriocinas produzidas por BAL.



Fonte: adaptado de Alvarez-Sieiro et al. (2016)

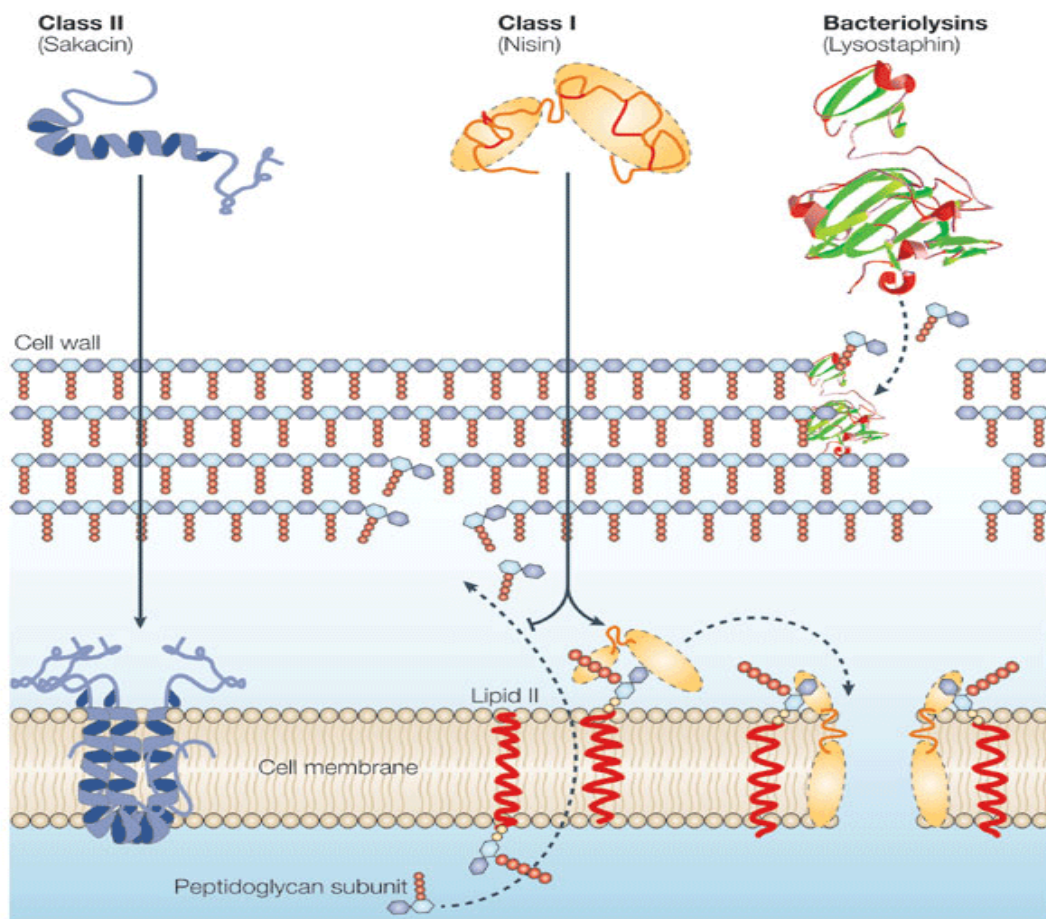
Os mecanismos de ação das bacteriocinas podem ser divididos entre os que agem na membrana celular e aqueles que são ativos no interior da célula, que afetam diretamente a expressão de genes e a produção das proteínas (COTTER; ROSS; HILL, 2012; WIEDEMANN et al., 2006). Por exemplo, microcina B17 (MccB17) inibe a DNA-girase, a MccJ25 inibe a RNA polimerase, e MccC7-C51 inibe a aspartil-RNAt sintase (COTTER; ROSS; HILL, 2012).

Contudo, a ação mais comum das bacteriocinas é a destruição da membrana citoplasmática da célula alvo, levando ao extravasamento celular. A destruição da membrana é causada pela permeabilização por meio da formação de poros resultando

em efluxo de íons, dissipação da força-protomotiva, hidrólise de ATP e eventual perda de viabilidade e lise celular (CARVALHO, 2015; ENNAHAR et al., 2000).

Para formar os poros, as bacteriocinas precisam interagir com a membrana citoplasmática da célula-alvo. A primeira fase na formação de poros pela bacteriocina envolve as interações eletrostáticas entre a carga positiva e os resíduos polares da bacteriocina com os fosfolípidios aniônicos presentes na bicamada lipídica da membrana alvo. Já a segunda fase envolve mudanças irreversíveis e letais em cepas sensíveis à bacteriocina (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015) (Figura 2).

Figura 2 – Modo de ação de bacteriocinas de Bactérias Ácido Láticas.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Fonte: Cotter; Hill; Ross (2005)

3.1.4 Aplicação de enterocina na indústria de alimentos

Grande tem sido o interesse do uso de bacteriocinas na indústria de alimentos como biopreservantes, pois sua ação pode eliminar bactérias patogênicas e deteriorantes (CUI; KONG; ZHANG, 2012). As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; pela utilização de um produto que foi previamente fermentado com uma cepa produtora como um ingrediente no processamento de alimentos; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas ou semipurificadas (CHEN; DAVIDSON; ZHONG, 2014).

Entre as BAL, o gênero *Enterococcus* é conhecido há tempos por ser capaz de produzir substâncias antimicrobianas, algumas das quais exibem um amplo espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como as enterocinas (HAJIKHANI; BEYATLI; ASLIM, 2007). Diversos estudos mostraram o controle de bactérias patogênicas ou deteriorantes de origem alimentar por enterocina, em diferentes sistemas alimentares (Tabela 1).

Tabela 1 – Uso de enterocinas no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes em matrizes alimentares

Bactéria alvo	Substrato de Alimentos	Referências
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Brotos, aspargos verdes	Cobo Molinos et al. (2008)
<i>Bacillus coagulans</i>	Comida enlatada	Lucas et al. (2006)
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Massa de trigo	Martínez Viedma et al. (2011)
<i>Paenibacillus</i> spp.	Sopas de legumes	Grande et al. (2007)
<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Salsichas de carne, presunto cozido, salsicha fermentada, leite desnatado, couve, aspargos verdes, pedaços de frutas inteiras e frutas fatiadas, saladas prontas para comer, bebidas energéticas, sobremesas	Burgos et al. (2014)
<i>Lactobacillus collinoides</i> <i>Lactobacillus diolivorans</i> <i>Pediococcus parvulus</i>	Cidra de maçã	Martínez Viedma et al. (2008)

Bactéria alvo	Substrato de Alimentos	Referências
<i>Salmonella enterica</i>	Enchidos fermentados, brotos de soja, saladas prontas para comer, suco de maçã	Burgos et al. (2014)
<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> ; <i>Yersinia enterocolitica</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Brotos de soja	Cobo Molinos et al. (2008)

Fonte: Autoria própria.

É sabido que enterocinas apresentam elevada atividade anti-listerial, diminuindo e/ou eliminando a presença dessas bactérias (ACHEMCHAM et al., 2005; ROCHA et al., 2019) comprovaram a ação da enterocina produzida por *E. faecium* F58 contra *L. monocytogenes* em queijo fresco marroquino, observando um declínio considerável da contagem de células listeriais viáveis, e após uma semana de armazenamento a 22°C não foi detectada a presença de contaminação, mostrando a eficácia da enterocina e sua viável aplicação em alimentos. A enterocina 1146 apresentou efeito bactericida contra *L. monocytogenes* em leite (KHAN; VIPIN MADHAVAN; MUNIYAPPA, 2010), e a enterocina de *E. faecium* RZSC5 em queijo (LEROY; FOULQUIÉ MORENO; DE VUYST, 2003), Rocha et al. (2019) também demonstraram a ação anti-listerial de enterocinas contra células planctônicas e biofilme de *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovi*.

3.2 *Enterococcus*: características gerais

O gênero *Enterococcus* constitui uma grande proporção das bactérias da microbiota do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos, aves, répteis e insetos. São ubiqüitários e podem ser encontrados amplamente distribuídos no meio ambiente, em solos, na água, em plantas e alimentos, devido à sua robustez biológica, sendo resistentes à dessecação, ao aquecimento, aos agentes sanitizantes e ainda pode competir eficientemente por nutrientes e espaço físico nas mais diferentes situações (FRANZ et al., 2001; GIRAFFA, 2003; NISHIYAMA; IGUCHI; SUZUKI, 2015).

São cocos Gram-positivos, isolados, aos pares ou em pequenas cadeias, podendo apresentar formas ovoides ou cocobacilares, dependendo do meio em que

crecem. São anaeróbios facultativos com necessidades nutricionais complexas e um metabolismo fermentativo que resulta em ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose, sem produção de gás, sendo consideradas bactérias ácido lácticas (BAL). Apresentam capacidade de crescimento entre 10 °C a 45 °C sendo que a temperatura ótima é 37 °C; também conseguem crescer em meios hipersalínicos (6,5% NaCl). São considerados quimiorganotróficos, catalase negativa e apresentam usualmente a capacidade de provocar a beta (β) hemólise de eritrócitos humanos em ágar sangue (LEROY; FOULQUIÉ MORENO; DE VUYST, 2003).

São conhecidas atualmente 68 espécies do gênero *Enterococcus* e duas subespécies *E. saccharolyticus* subsp. *saccharolyticuse* *E. saccharolyticus* subsp. *taiwanensis* (PARTE, 2018).

As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são os mais importantes e são isolados principalmente em alimentos, incluindo produtos cárneos processados, carne bovina e suína (CINTAS et al., 2000; FRANZ; SCHILLINGER; HOLZAPFEL, 1996)

Este gênero constitui o grupo das bactérias ácido-láticas mais controverso pois, mesmo tendo grande potencial biotecnológico, tem associação com doenças graves envolvendo seres humanos. Ademais, têm-se revelado cada vez mais como microrganismos que apresentam cepas com perfil de multirresistência à fármacos de uso terapêutico (LEROY; FOULQUIÉ MORENO; DE VUYST, 2003).

Os enterococos apresentam diversos fatores de virulência sendo que os mais conhecidos são a citolisina e enzimas proteolíticas (gelatinase e serina protease), que atacam a célula do hospedeiro; adesinas enterocócicas, tais como substância de agregação, proteína de superfície enterocócica (Esp), adesina ao colágeno de *E. faecalis* (Ace), adesina de colágeno de *E. faecium* (Acm e Scm), antígeno A de *E. faecalis* (EfaAfs) e *E. faecium* (EfaAfm), contribuem com a agregação bacteriana e aderência ao tecido do hospedeiro (FISHER; PHILLIPS, 2009; LEROY; FOULQUIÉ MORENO; DE VUYST, 2003). Há também os polissacarídeos capsulares e de parede celular, que contribuem para evasão do sistema imune do hospedeiro (HUFNAGEL; BROCKMANN; GEISEL, 2004), tornando algumas espécies deste gênero apresentem potencial patogênico.

Em contrapartida, algumas espécies são considerados importantes na indústria alimentícia devido à sua capacidade para produzir ácido láctico, lipases, proteases e os compostos voláteis que asseguram características organolépticas desejáveis em alguns tipos específicos de alimentos, além de serem usados como probióticos

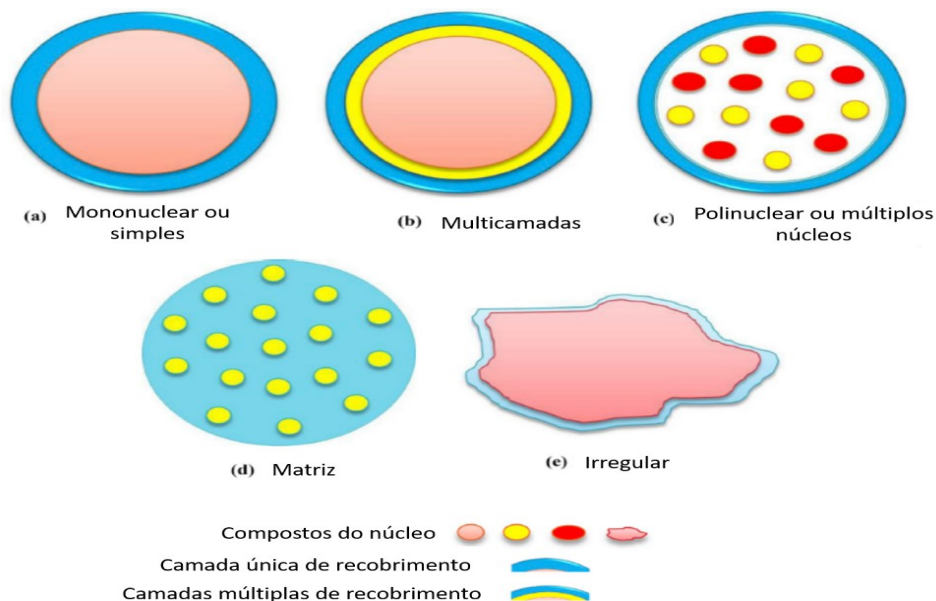
humanos, uma vez que conseguem sobreviver e competir no trato gastrointestinal promovendo o equilíbrio da microbiota (CAMARGO et al., 2014; FONSECA, 2010).

3.3 Microencapsulação de bacteriocinas

A microencapsulação é uma técnica que surgiu há muitas décadas, mas ainda apresenta grande aplicação, e vem ganhando espaço em aplicações nas áreas farmacêuticas, alimentar, cosmética e dos agroquímicos (PEZZIN, 2015). Esta técnica consiste em criar um revestimento de proteção de compostos químicos contra adversidades do meio externo. A morfologia da microcápsula obtida, depende de como é o material do núcleo, e do processo de deposição do material de revestimento (SAIFULLAH et al., 2019). O material a ser encapsulado pode ser puro ou uma mistura, sendo denominado como material ativo ou núcleo, enquanto que o material que forma a cápsula é chamado de material de revestimento ou de parede, carreador ou agente encapsulante (FANG; BHANDARI, 2010). Normalmente, as microcápsulas apresentam forma esférica, com diâmetro compreendido entre 1,0 e 5000 μm , porém o tamanho, a forma, e a estrutura das microcápsulas dependem dos materiais empregados como agentes encapsulantes e do método empregado na produção (FANG; BHANDARI, 2012). No entanto, o composto a ser encapsulado geralmente permanece no núcleo da cápsula cercado pelo agente de encapsulação ou disperso em uma matriz contendo o agente de encapsulação (Figura 3). Alguns tipos de microcápsulas podem ter mais de um agente encapsulante, construindo paredes diferentes com diferentes propriedades químicas e físicas. Os diferentes tipos de micropartículas são produzidos a partir de uma ampla gama de agentes encapsulantes e por grande número de processos de microencapsulação (ESTEVINHO et al., 2013).

As capsulas mononucleares possui somente uma camada ao redor do núcleo, já as multicamadas possuem várias camadas de recobrimento e as polinuclear uma única camada revestindo diferentes núcleos. Além disso é possível ter uma capsula nuclear múltipla com forma esférica ou irregular (SAIFULLAH et al., 2019).

Figura 3 - Esquema de morfologia de cápsulas formadas após o processo de microencapsulação.



Fonte: adaptado de Saifullah et al. (2019).

A seleção do método de microencapsulação depende de alguns aspectos, tais como, as propriedades físico-químicas do material a ser encapsulado e do agente encapsulante (principalmente, a solubilidade); a aplicação ou finalidade da micropartículas, o tamanho, textura, e forma da micropartícula e o mecanismo de libertação do material a ser encapsulado (BANSODE et al., 2010).

Além do formato da microcápsula, a sua permeabilidade também é um fator importante. O material encapsulado deve ter sua liberação controlada com o decorrer do tempo ou pela exposição de alguma condição específica, evitando a perda de compostos durante o processamento ou sua utilização inefetiva (RATHORE et al., 2013). A técnica de encapsulação por *spray dryer*, é uma das mais antigas, tendo sido originalmente utilizada, na década de 30, para preparar os primeiros compostos contendo sabores encapsulados, usando como agente encapsulante a goma acácia (WILSON; SHAH, 2007). O método *spray dryer*, apresenta vantagens em relação a outros métodos dentre elas, sua rapidez e custo relativamente baixo. A técnica é altamente reprodutível e sua característica mais importante consiste na sua adequação para aplicações industriais (BURGAIN et al., 2011).

O princípio básico da técnica de *spray dryer*, é a transformação de um meio líquido para sólido, por pulverização e atomização de uma amostra. Após a secagem

das gotículas do líquido, o pó é retirado por um separador de ciclone (SHISHIR; CHEN, 2017).

Os materiais comumente utilizados no encapsulamento de bactérias probióticas incluem polissacarídeos oriundos de algas marinhas (como carragena, alginato), plantas (amido e seus derivados) e frutas (pectina), produtos resultantes do metabolismo de bactérias (gomos gelana e xantana), e também proteínas animais (proteínas do leite, gelatina). A seleção do material vai depender tanto das propriedades funcionais da matriz, quanto da técnica utilizada para o encapsulamento (MARTÍN et al., 2015). A técnica baseada em proteínas pode fornecer uma alternativa ao encapsulamento apenas com géis de alginato ou revestimento por spray com gorduras, os dois métodos de encapsulamento probiótico mais amplamente utilizados (VIDHYALAKSHMI; SUBHASREE, 2009).

O soro de leite é o principal subproduto da indústria de laticínios, sendo obtido a partir do líquido resultante após a precipitação da gordura e das caseínas do leite durante a fabricação de queijos. Apresenta na sua composição uma mistura de lactose, minerais e proteínas globulares, com locais específicos de ligação ao cálcio, que favorece a formarem géis e microcápsulas sem o uso de tratamento térmico severo e qualquer produto químico (KRUNIC et al., 2018).

As principais características que tornam as proteínas de soro de leite interessantes para aplicação como material de parede na elaboração de micropartículas são as propriedades funcionais como: a solubilidade, capacidade emulsificante, estabilidade das emulsões, e capacidade de formação de micropartículas. Além das propriedades encapsulantes, as proteínas do soro são uma excelente fonte de aminoácidos essenciais, favorecendo assim a sua aplicabilidade (ABBASI et al., 2014). As encapsulações com proteína do leite têm grande potencialidade na produção de probióticos micro encapsulados.

Diversos autores mostraram a eficiência de microencapsulação de probióticos em soro de leite. Para alguns exemplos, destacar o trabalho desenvolvido por KIM et al. (2017), que encapsularam *Lactobacillus acidophilus* por gelificação iônica com extrusão eletrostática, sendo que o material encapsulado apresentou maior sobrevivência em armazenamento refrigerado e condições gastrointestinais *in vitro*. *Lactobacillus reuteri* microencapsulado em soro de leite a 20% apresentou taxa de sobrevivência de 32% em comparação com as não encapsuladas, quando expostas ao suco gástrico artificial (JANTZEN; GÖPEL; BEERMANN, 2013). *L. acidophilus* LA-

5 microencapsulado em soro de leite e aplicado em iogurte teve sua estabilidade confirmada por 10 semanas de estocagem (WANG et al., 2017). Embora o processo de microencapsulação seja bem descrito para microrganismos, poucos trabalhos relatam a encapsulação de bacteriocinas, incluindo enterocinas.

A técnica de encapsulação de bacteriocinas tem como principal função a liberação controlada de peptídeos antimicrobianos bem como a prevenção de possíveis interações com a matriz alimentar, podendo comprometer a ação antimicrobiana (MARTÍNEZ et al., 2015). Estudos mostraram que o encapsulamento de bacteriocinas em nanopartículas aumentou a atividade desses peptídeos contra microrganismos deteriorantes de alimentos e bactérias multirresistentes (ARTHUR; CAVERA; CHIKINDAS, 2014). O uso da técnica de encapsulação das bacteriocinas apresenta, na maioria dos casos, um aumento no seu rendimento, facilitando assim a sua utilização na produção comercial (ZACHAROF; LOVITT, 2012). Alguns estudos com encapsulação de bacteriocinas podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Estudos com encapsulação de bacteriocinas.

Bacteriocina/isolado	Técnica de encapsulação	Material encapsulante	Referência
Pediocina	<i>Spray dryer</i>	Lipossomas	Biasuz, (2018)
Nisina	<i>Spray dryer</i>	Lipossomas	Malheiros; Cuccovia; Franco (2016)
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Liofilização	Alginato, goma gelana e leite em pó	Wang et al. (2015)
Nisina	<i>Spray dryer</i>	Lipossomas, caseína e gelatina	Silva et al. (2015)
Nisina	<i>Spray dryer</i>	Maltodextrina e carboximetilcelulose	Oliveira (2015)
<i>Enterococcus faecium</i> CRL1385	Geleificação iônica com íons de cálcio	Pectina	Ibarguren et al. (2012)

Fonte: Autoria própria.

Oliveira (2015) verificou que a nisina microencapsulada em maltodextrina e carboximetilcelulose apresentou maior eficiência antimicrobiana quando comparada a não encapsulada; além disso diversos autores verificaram melhoria tecnológica da aplicação de enterocinas encapsuladas, como observado na Tabela 2. Portanto, o

encapsulamento de bacteriocinas pode ser uma técnica promissora para o controle de patógenos de origem alimentar.

Não são encontrados na literatura estudos com a encapsulação de enterocinas utilizando soro de leite como encapsulante por *spray dryer*, diante deste cenário da pesquisa, este trabalho apresenta-se como inédito no processo de microencapsulação de enterocina produzida pelo isolado *E durans* MF5, já caracterizado por Tossoni, (2019).

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório do PPGTA na Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus - Campo Mourão - PR e Campus Londrina - PR.

4.1 Materiais

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Himedia), Luria Bertani (LB) (Himedia), Brain Heart Infusion (BHI) (Acumedia), soro de leite em pó (SOORO), sais usados para preparar o tampão fosfato NaOH (Dinamica), tampão fosfato PBS (Dinamica), Bovine Serum Albumin (BSA) (laboratório Promega); solução salina: cloreto de sódio (Dinâmica) e água ultra pura (MiliQ).

4.2 Linhagens Bacterianas e Condições de Cultivo

Neste estudo foi utilizado o isolado *E. durans* MF5 produtor de enterocina, previamente caracterizado por Tosoni, 2019. As bactérias indicadoras foram *Salmonella* Typhimurium UK-1 ATCC 68169, *Escherichia coli* ETEC, *Pseudomonas* sp, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovi*. As culturas encontram-se estocadas em freezer e foram reativadas em 5 mL de caldo MRS para *E. durans* e caldo BHI para as demais bactérias. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas.

4.3 Produção e Concentração de Enterocina

O sobrenadante Livre de Células (CFS), contendo enterocina, foi obtido conforme metodologia descrita por (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Para isso, *E. durans* MF5 foi crescido em 600ml caldo MRS e incubados a 37 °C sob agitação de 150 rpm por 24 h. O cultivo foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,5 com NaOH 1N, para inibir a ação do ácido láctico. Um volume de 600 mL de CFS foi distribuído em alíquotas de 80 mL em béqueres, mantidos no ultrafreezer (-80°C) por 24 horas. Posteriormente os béqueres foram

levados ao liofilizador (Liotop, L101 Liobrás) e mantidos por 5 dias. O pó obtido foi diluído em água ultrapura estéril na concentração final de 100 mg/mL.

4.4 Encapsulação da Enterocina

A encapsulação da enterocina foi realizada seguindo o protocolo descrito por (CHEN; DAVIDSON; ZHONG, 2014; XIAO et al., 2011) com modificações. A matriz encapsulante (soro de leite em pó, 10g/100mL) foi assepticamente adicionada a frascos contendo água estéril (121 °C/15 minutos). A solução foi mantida sob agitação em agitadores magnéticos por 30 minutos para hidratação do pó. Preparou-se duas concentrações de enterocina sendo 1 % e 5 % p/v da enterocina liofilizada na solução de encapsulação, resultando em concentrações de 10 e 50 % p/p de enterocina no soro do leite. As formulações foram designadas de E10 (10 %p/p enterocina) e E50 (50 %p/p enterocina).

Após total homogeneização realizou-se a secagem por aspersão em *spray dryer* (LabMaq MSD1.0). As soluções foram pulverizadas para secagem e microencapsulação conforme os parâmetros: 150 °C na temperatura de entrada; temperatura de saída 110 °C; pressão de ar 5,0 kgf/cm² e taxa de fluxo 0,8 L/h. Para o controle negativo foi utilizado apenas o agente encapsulante (soro de leite) nas mesmas condições de secagem. O pó obtido (microcápsulas) foi coletado da base do ciclone e armazenado em frascos estéreis hermeticamente fechados e mantidos a 4°C.

4.5 Rendimento do Processo

O rendimento do processo ($\eta\%$) compreende a quantidade em massa de material recolhido após a secagem por aspersão, com referência à massa de não solvente na correspondente solução (alimentação) utilizada no preparo (XIAO et al., 2011). Para tanto, foi utilizada a Equação 1.

$$\eta(\%) = \frac{\text{massa de material seco coletado}}{\text{massa (encapsulante+enterocina) na alimentação}} \times 100 \quad (1)$$

4.6 Atividade Antagônica da Enterocina Sobre os Isolados Alvo

O teste da atividade antimicrobiana da enterocina concentrada e encapsulada seguiu protocolo descrito por (HARRIS et al., 1989). Assim, 20 mL de meio BHI semi-sólido 0,8%, contendo as bactérias alvo (*Salmonella* Typhimurium UK-1 ATCC 68169, *Escherichia coli* ETEC, *Pseudomonas* sp, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovi*) na concentração de $1,5 \times 10^8$ células/mL foram transferidos para placas de Petri. Após a solidificação, foram realizados poços de 5 mm no meio. As duas formulações de enterocina microencapsulada (E10 e E50) foram diluídas em água estéril em concentrações de 1 e 5 %p/v, sendo transferidos para cada poço 40 μ L desta solução. A enterocina não encapsulada foi testada nas mesmas concentrações.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 min, para permitir a difusão do sobrenadante no ágar e posteriormente incubadas a 37 °C por 24 h. A presença de halo ao redor do poço foi mensurada com auxílio de um paquímetro e foi indicativo de atividade antagônica da enterocina, encapsulada ou não.

4.7 – Teste da Diluição Seriada Quantitativa

Para avaliação da atividade da bacteriocina, foi utilizado o método de diluição crítica de (MAYR-HARTING et al., 1972). As amostras de enterocina não encapsulada e encapsuladas (E10 e E50) foram solubilizadas a 5 %p/v em água estéril e esta solução foi diluída na proporção 1:2 (v/v) em solução salina a 0,85% no primeiro poço de uma microplaca. Nos poços seguintes foram retiradas alíquotas dos poços anteriores seguindo a proporção de 1:2 (v/v). A análise de atividade antagônica foi realizada conforme descrito anteriormente. A Unidade Arbitrária ($AU \cdot mL^{-1}$) da atividade de enterocina foi definida como sendo a recíproca da maior diluição a qual não apresentou crescimento bacteriano, multiplicado por 100.

4.8 - Microscopia Eletrônica de Varredura

Células de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovi* tratadas e não tratadas com enterocina microencapsulada foram fixadas em lâminas com glutaraldeído a 2,5% (Electron Microscopy Sciences) em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M por 18 h a 4 °C. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente lavadas com tampão de

cacodilato de sódio 0,1 M. A pós-fixação foi realizada por 1 h a 25 ° C com tetróxido de ósmio a 1% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M. As amostras foram desidratadas suavemente em etanol graduado (de 50 a 100% de etanol), secas em CO₂ (secador de pontos críticos BALTEC DCP 030), revestidas com ouro (*sputter coater* BALTEC SDC 050) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

4.9 Modo de Ação da Enterocina Microencapsulada

O efeito antimicrobiano da enterocina microencapsulada foi avaliado contra *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovi* como descrito por (LEROY et al., 2003), com modificações. As bactérias indicadoras foram ajustadas para $1,5 \times 10^8$ células/mL. Um volume de 10 mL da cultura bacteriana foi distribuído em tubos e foram adicionados 0,5 mL de enterocina microencapsulada (formulação E50) e enterocina não encapsulada. A Densidade Óptica (D.O.) foi mensurada a 600 nm em UV-Vis (S60 Libra, Biochrom) nos tempos 3, 6, 9, 12, e 24 h de incubação.

4.10 Caracterização das Partículas

Os Espectros de FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier) foram obtidos em espectrômetro FTIR (IRAffinity, Shimadzu). As amostras E50 (aproximadamente 2mg) foram avaliadas em duplicata na faixa de 4000-400 cm⁻¹ usando 32 varreduras acumuladas e resolução de 4 cm⁻¹.

A caracterização térmica foi realizada por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) utilizando-se um Calorímetro (Perkin Elmer DSC4000). As amostras analisadas (aproximadamente 4 mg) foram depositadas dentro de cadinhos de alumínio. As rampas de aquecimento foram realizadas entre 0 °C e 300 °C e a razão de aquecimento de 20° C/min, sob fluxo de nitrogênio gasoso (20 mL/min).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do Processo

O rendimento do processo de microencapsulação foi de 31,66 % e 34,16% para E10 e E50, respectivamente. Esses valores de rendimento corroboram com estudos de microencapsulação de probióticos em soro de leite. Como o presente trabalho é o primeiro a descrever a encapsulação de enterocina em soro de leite, a comparação pode ser feita com probióticos utilizando o método de *spray dryer*, como no caso do trabalho de (BORDINI, 2019), que microencapsulou *Pediococcus pentaceus* em soro de queijo e soro de queijo/xantana com rendimento de 17 e 15%, respectivamente. (MISHRA et al.,2018), relataram 37,97% de eficiência máxima de reuterina encapsulada em alginato de sódio. Já o rendimento de nisina encapsulada com lipossomo foi de 32% (IMRAN et al.,2016); embora o agente encapsulante tenha sido diferente do utilizado no presente estudo, a eficiência de rendimento foi semelhante.

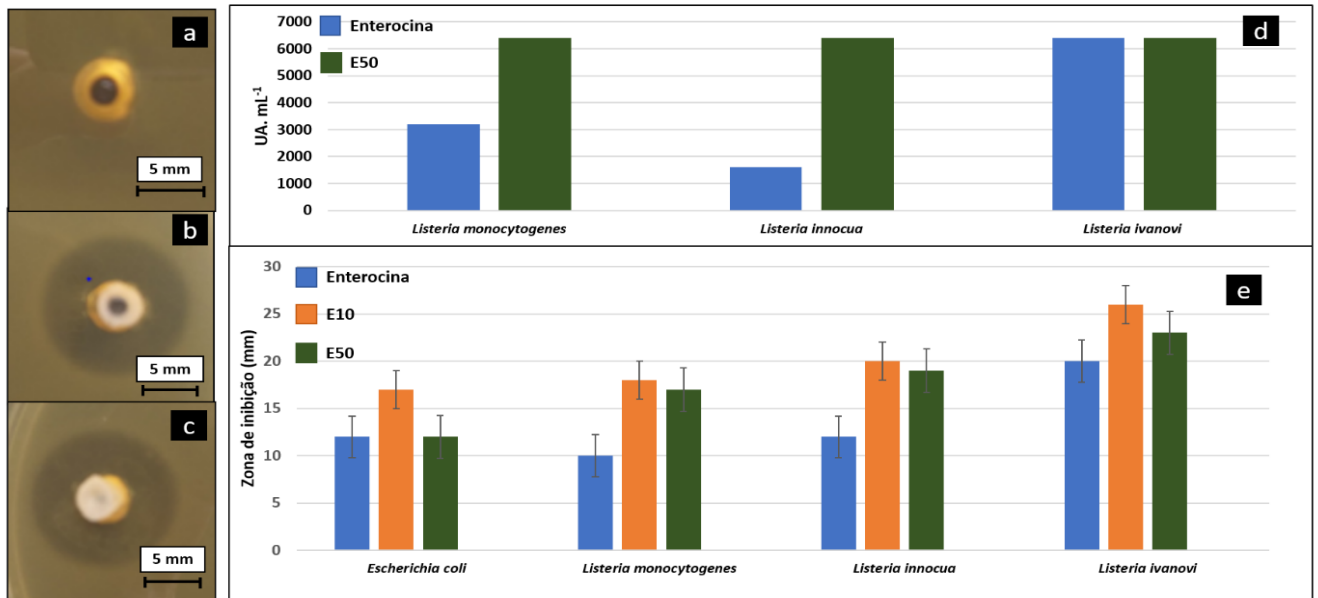
Em conclusão, a enterocina pode ser microencapsulada em soro de leite com rendimento bastante satisfatório.

5.2 Atividade Antagônica e Unidade Arbitrária de Enterocina Pura e Microencapsulada

A enterocina produzida por *E. durans* MF5 já foi anteriormente caracterizada pelo grupo de pesquisa em que este trabalho foi desenvolvido, sendo confirmado seu caráter proteico e termoestável, pertencendo à bacteriocina de classe II (TOSONI, 2019). Os halos de inibição formados para cada isolado teste e a unidade arbitrária obtida com a concentração (E10 e E50) nos dois processos estão apresentados na Figura 4.

Destaca-se que os isolados *Salmonella*, *Pseudomonas* sp, *S. aureus* não foram inibidos pela enterocina testada neste estudo. Nas Figuras 4 (a), (b) e (c) são apresentadas imagens do halo de inibição do soro de leite e das amostras de micropartículas com 10%p/p de enterocina e 50%p/p de enterocina, respectivamente, frente à *L. innocua*. O soro de leite em pó, usado como agente de encapsulação não apresentou atividade antimicrobiana, como pode ser observado na Figura 4 (a). Já as micropartículas apresentaram atividade com halo de inibição de tamanho semelhante nas duas amostras (E10 e E50).

Figura 4 - Inibição da enterocina frente a *Listeria sp.* e *E. coli* (a) soro de leite em pó (controle); (b) concentração 10 % p/p (E10); (c) concentração 50% p/p (E50) (d) Unidade Arbitrária de enterocina e enterocina encapsulada (E50) e (e) zona de inibição da Enterocina, E10 e E50 frente à *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria ivanovii*.



Fonte: Autoria própria.

Para os demais isolados, a atividade inibitória da enterocina microencapsulada a 10% e 50%p/p no soro de leite foi superior ao observado com a enterocina pura (Figura 4 e), com exceção do teste de inibição frente a *E. coli*, que não houve diferença entre a amostra E50 e a não encapsulada. Esse resultado indica que independente da concentração de enterocina encapsulada, o soro de leite permitiu a liberação da mesma para o meio externo, de forma controlada, garantindo a difusão da enterocina no meio e prolongando sua atividade bactericida.

O aumento da atividade antimicrobiana também foi observado com nisina microencapsulada em alginato (BEN AMARA et al., 2017), ABID et al., (2019) também demonstraram melhor eficiência na atividade antagônica da nisina encapsulada em exopolissacarídeo após secagem em *spray dryer*. Ambos os autores relataram que provavelmente o processo de microencapsulação e o aquecimento pelo *spray dryer* geram um desdobramento parcial das moléculas de peptídeo, levando a uma melhor exposição dos locais de ligação hidrofóbica no polipeptídeo que conseqüentemente aumentam a atividade antimicrobiana. Neste sentido, pode-se sugerir que a

enterocina também sofreu alguma alteração que potencializou a ação antagônica contra *E. coli* e *Listeria* sp neste trabalho. Esta hipótese pode ser confirmada pela mensuração da Unidade Arbitraria (UA) (Figura 4 d), uma vez que os resultados de UA para a enterocina encapsulada foram superiores aos da enterocina pura, para alguns isolados de *Listeria*.

Maia et al.(2018) relataram o aumento da atividade antagônica de enterocina após tratamento a 100 °C. Essas características de tolerância ao calor favorecem a utilização das enterocinas como alternativa aos conservantes químicos utilizados em alimentos (KHAN; VIPIN MADHAVAN; MUNIYAPPA, 2010).

Não há consenso entre os trabalhos publicados a respeito do espectro de ação das enterocinas, ficando claro que a atividade antagônica depende do peptídeo formado, da espécie produtora e espécie alvo. Neste estudo foi demonstrado que a enterocina produzida pelo isolado *E. durans* MF5 não apresentou atividade inibitória contra *Pseudomonas* sp, *S. aureus* e *Salmonella*.

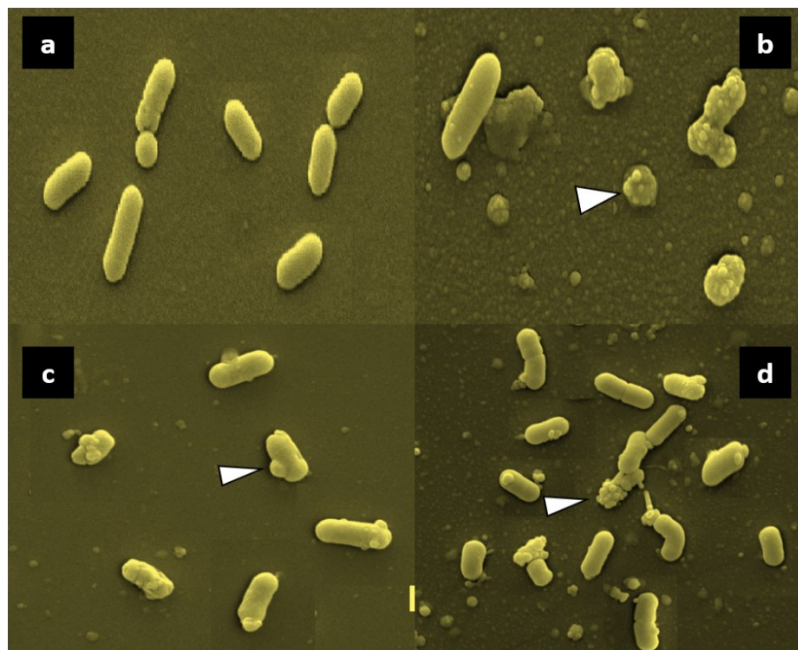
Ogaki et al. (2015) relataram que bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus* e diversas espécies de *Listeria* são mais sensíveis a atividade de enterocinas do que bactérias Gram-negativa, uma vez que é comum que sua atividade seja específica contra gêneros ou espécies intimamente relacionados. Diversos autores relataram maior eficiência de enterocinas contra bactérias Gram-positivas correlacionadas com o gênero *Enterococcus*, por possuírem proteínas do sistema de manose-fosfotransferase (Man-PTS) que são receptores específicos de enterocinas (AHMADOVA et al., 2013; RIVAS et al., 2012; SHIN et al., 2008)

Vários autores também relataram a não eficiência de enterocina contra isolados de *Pseudomonas* sp, corroborando com os resultados neste estudo (KANG; LEE, 2005; SHARMA et al.,2020; TODOKORO et al., 2006). Contudo, (LIU et al., 2016), caracterizaram a enterocina T1 com atividade anti-*Pseudomonas*. (ALSHAMMARI et al., 2019) relataram a enterocina produzida por *E. durans* F3 como inibidora de *S. aureus*, *Salmonella* e *Pseudomonas*, contudo, o trabalho apresenta que o halo de inibição ficou na faixa de 0,3 a 0,6 mm, portanto, apresentando inibição muito sutil.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

O efeito da enterocina pura e microencapsulada na morfologia das células de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *Listeria ivanovi* foi investigado pela Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 5). As células de *L. monocytogenes* não tratadas com enterocina ou micropartículas exibiram estruturas celulares intactas, e superfícies lisas (Figura 5 a). Quando exposta às micropartículas, da formulação E50, a morfologia celular foi alterada, destacando uma superfície rugosa e colapsada, apresentando protuberâncias que podem indicar vazamento celular (Figuras 5 b, c, d). Ainda, é possível observar discreta alteração na morfologia celular dos isolados tratados, apresentando-se mais curvos e arredondados.

Figura 5 – Imagens de MEV (12.000x ampliação) Exposição de células de: (a) *Listeria monocytogenes* controle (sem tratamento); e células após exposição a micropartículas (enterocina encapsulada) E50 de (b) *Listeria monocytogenes*; (c) *Listeria innocua*; e (d) *Listeria ivanovi*. Aspecto flocular na membrana celular são indicados por cabeça de seta.



Fonte: Autoria própria.

O mesmo perfil de protuberância foi observado no trabalho realizado por FURLANETO-MAIA et al., 2020) com enterocinas contra células de *Listeria* sp. Resultados semelhantes foram relatados para enterocina LD3 (SHEORAN; TIWARI,

2019), bacteriocina BMP11 (YI et al., 2018) e lactocina MXJ 32A (LÜ et al., 2014). De acordo com MASIAS et al. (2017), bacteriocinas classe IIa, à qual pertence a enterocina produzida no presente trabalho, ligam-se ao envelope celular bacteriano pelo sistema fosfotransferase de manose associado, levando à formação de poros.

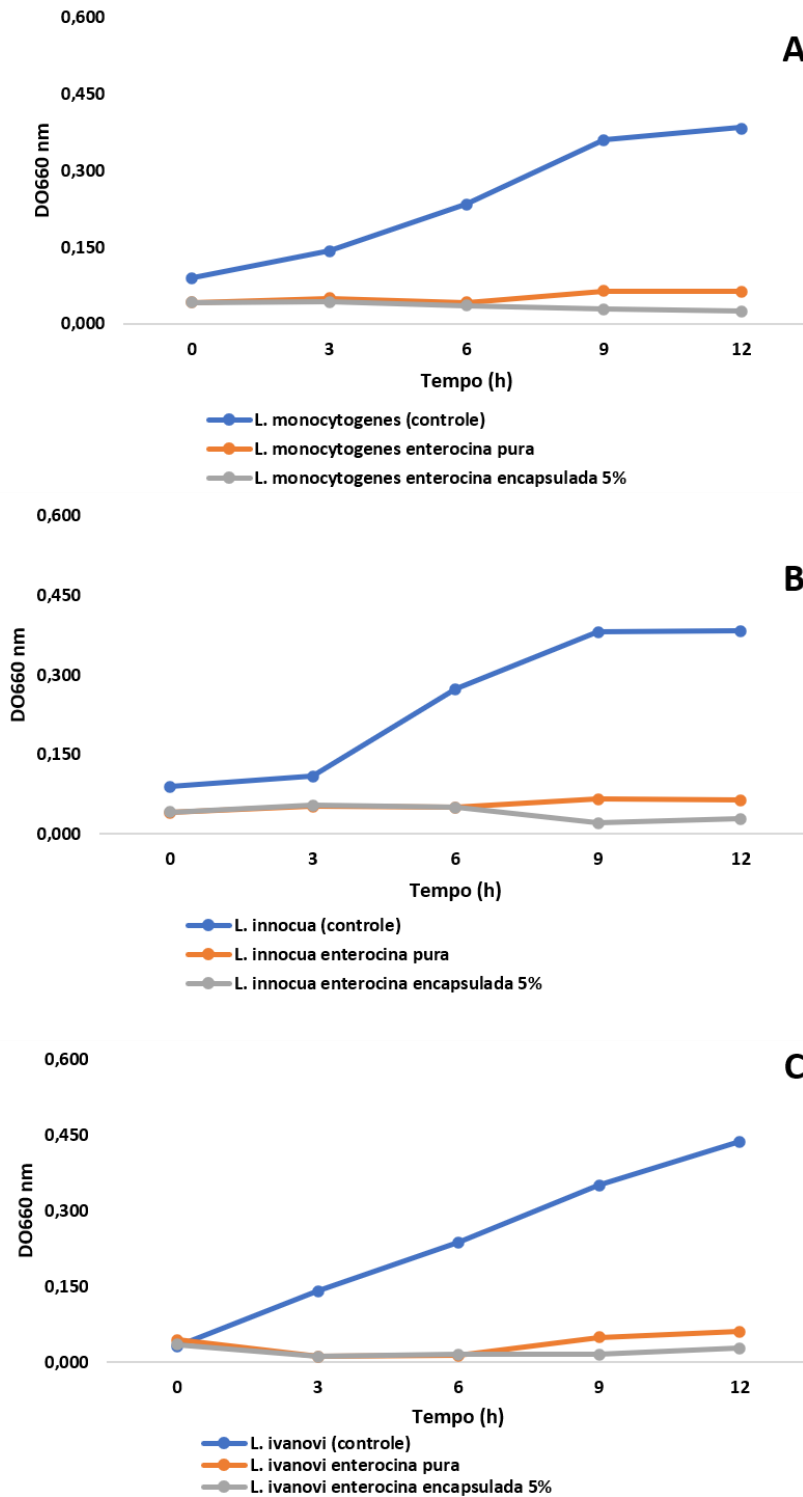
5.4 Modo de Ação da Enterocina Microencapsulada

A adição de enterocina pura e encapsulada do isolado de *E. durans* MF5 à culturas de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovi* causaram uma redução na densidade óptica (D.O.) a 600 nm e no número de células viáveis, quando comparado ao controle (sem enterocina ou micropartículas) (Figura 6). A redução permaneceu durante o período de 12 horas de cocultivo, enfatizando a ação bactericida da enterocina.

Os resultados determinados para os três microrganismos avaliados demonstraram que a enterocina pura e a enterocina microencapsulada E50 apresentaram ação semelhante, diferente do observado em meio de crescimento sólido (Figura 6) em que as micropartículas apresentaram maior halo de inibição. Na análise onde foram coletados os dados de densidade óptica, o tempo de exposição dos microrganismos foi de seis horas, já o ensaio de disco difusão teve duração de 24 h. Dessa forma, possivelmente após um período maior de exposição em meio líquido, a enterocina microencapsulada apresentou uma manutenção da inibição no meio maior que a enterocina pura.

Esses dados são bastante interessantes e sugerem que a enterocina produzida pelo isolado *E. durans* MF5 pode ser um candidato promissor para futuras aplicações em biopreservação de alimentos. De fato, o uso de bacteriocinas é de particular interesse para a indústria de alimentos, pois contribui para garantir biologicamente a segurança microbiana dos produtos alimentícios e para aumentar sua vida útil em vez de aditivos químicos (JAOUANI et al., 2015).

Figura 6 – Densidade óptica (D.O.) determinada em meios de cultivo de (a) *Listeria monocytogenes*, (b) *Listeria innocua* e (c) *Listeria ivanovi*, sem exposição à enterocina, exposta à enterocina produzida por *E. durans* MF5 e à enterocina microencapsulada (E50).



Fonte: Autoria própria.

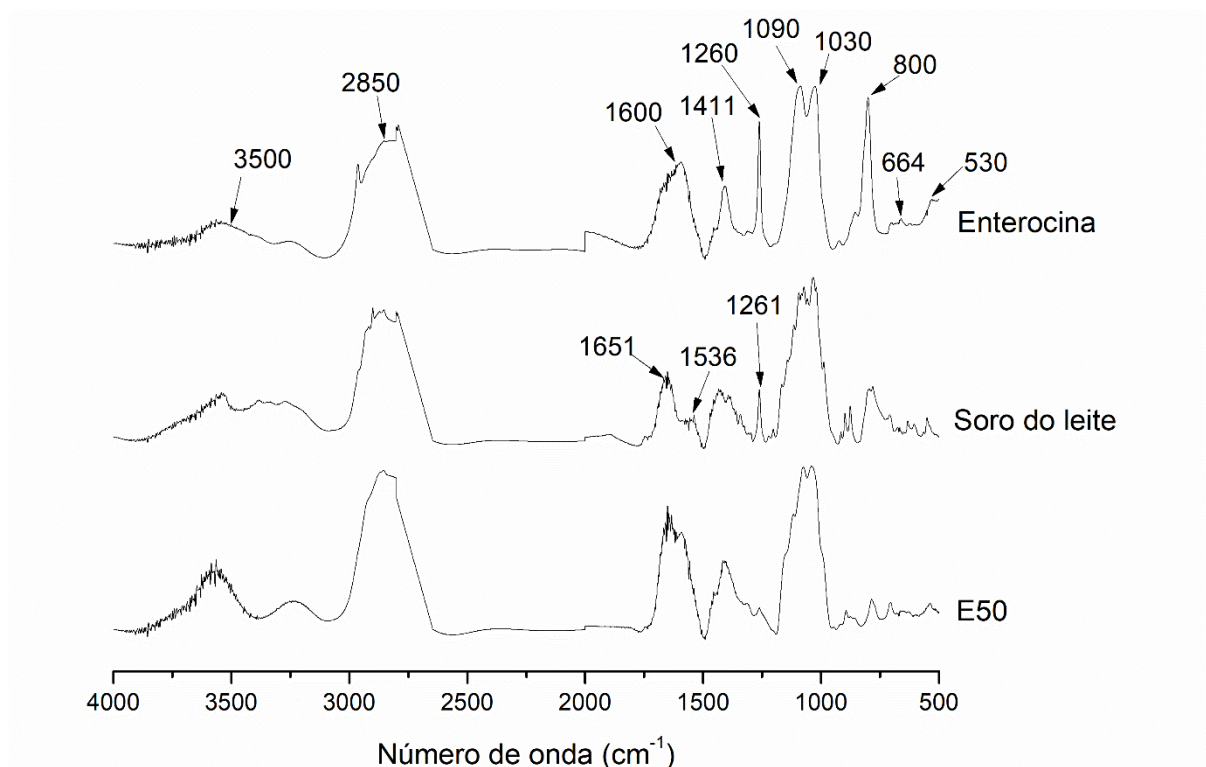
5.5 Caracterização das Micropartículas por FTIR e DSC

Para confirmar a microencapsulação da enterocina com soro de leite, foram realizadas as análises de espectro de infravermelho e caracterização térmica.

Os espectros de infravermelho podem ser usados para identificar e analisar compostos pelas transições vibracionais e rotacionais das moléculas. Na Figura 7 são apresentados os espectros de FTIR da enterocina, do soro de leite e da enterocina microencapsulada, identificando os grupos funcionais presentes em sua composição e suas respectivas interações.

A enterocina produzida pelo *E. durans* MF5 ainda não possui sua caracterização molecular, contudo, pelas características de termoestabilidade é consenso que esta pertença às bacteriocinas da classe IIa, que compartilham uma sequência de aminoácidos YGNGVxCxxxxC (onde Y- Tirosina, G- Glicina, N- Asparagina, V- Valina, e C- Cisteína), e uma ligação dissulfeto conservada na parte N-terminal do peptídeo; contudo, podem diferir na região C-terminal (OLUK; KARACA, 2018).

Figura 7 - Espectros de FTIR das amostras de enterocina pura; Enterocina encapsulada (E50) e Soro do leite.



Fonte: Autoria própria.

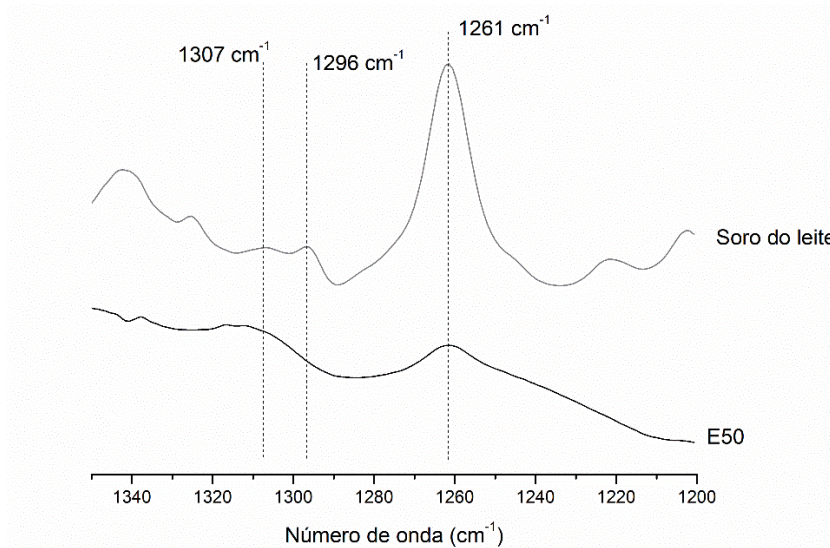
É possível observar no espectro da amostra de enterocina (Figura 7 enterocina) em 530 cm^{-1} o sinal referente à ligação dissulfeto da parte N-terminal (MORISSET et al., 2004). Além disso, foi detectada a vibração da deformação angular (*bending*) da ligação C = C aromática em 1411 cm^{-1} , em 664 cm^{-1} a deformação angular fora do plano do anel pelo grupo C-C, e a deformação angular fora do plano do grupo C-H aromático em 622 cm^{-1} , todos referentes à tirosina. Observa-se também na região de 1600 cm^{-1} a vibração correspondente ao estiramento C = O do grupo amida da asparagina (ABDEL-HAMID et al., 2018).

As cadeias alquílicas da estrutura peptídica podem ser avaliadas com os modos vibracionais do metileno, na banda em torno de 2850 cm^{-1} . Essa banda corresponde ao modo vibratório de estiramento simétrico dos grupos metileno e é sensível aos ângulos conformacionais gauche/trans nas cadeias carbônicas (MEDINA AMADO et al., 2020). Na região de 3500 cm^{-1} nota-se uma banda larga relativa ao grande conteúdo de aminas primárias (N-H).

É possível observar as bandas características do soro de leite (Figura 7 E50) em 1651 cm^{-1} (Amida I, associado com deformação axial (*stretching*) de -C=O e C-N), 1536 cm^{-1} (Amida II, associado com deformação angular (*bending*) N-H), e em 1261 cm^{-1} (Amida III) que corresponde à torção do grupamento N-H no plano, acoplado com estiramento N-N e vibrações de deformação dos grupamentos C-H e N-H (PÉREZ-MONTERROZA et al., 2018).

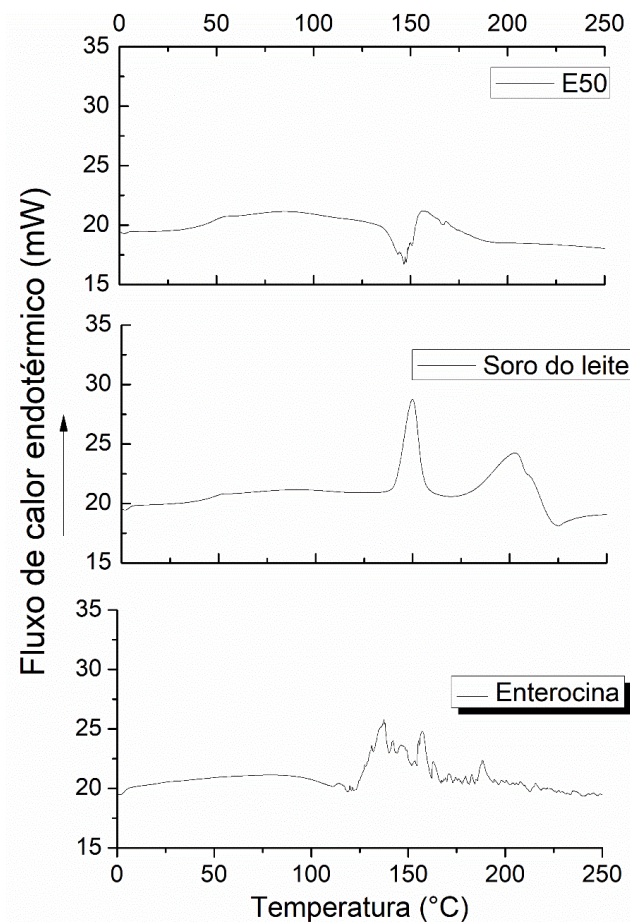
Na Figura 8 onde o detalhe da região entre 1200 e 1350 cm^{-1} , é ampliado, nota-se que na amostra de soro de leite as bandas localizadas em 1307 e 1296 cm^{-1} que correspondem à estrutura α -hélice e à estrutura desordenada, bem como a banda referente à estrutura de conformação β -pregueada em 1261 cm^{-1} . Em comparação da amostra de soro de leite com a enterocina encapsulada, percebe-se uma redução expressiva na intensidade da banda relativa à estrutura β -pregueada, indicando que a interação da enterocina encapsulada no o soro do leite levou a uma modificação da estrutura proteica (DHUMAL; PAL; SARKAR, 2019; YIN et al., 2020). Os dados de caracterização térmica estão apresentados na Figura 9.

Figura 8 - Espectros de FTIR com região ampliada de 1200 a 1350 cm^{-1} das amostras de Enterocina encapsulada (E50) e Soro do leite.



Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Termogramas de DSC das amostras de Enterocina, Soro do leite e Enterocina encapsulada em soro do leite (E50).



Fonte: Autoria própria.

O termograma da amostra de enterocina indica que a umidade residual da amostra foi eliminada em 110 °C, observando o início de um pico endotérmico. A partir de 118 °C pode ser identificado o comportamento de degradação térmica da amostra. Já para a amostra de soro de leite, o início do pico endotérmico ocorreu em 140 °C, e com máximo em 150 °C e mostra um pico largo em 203 °C relativo à desnaturação proteica (GHARANJIG et al., 2020)

Na amostra de enterocina encapsulada percebe-se que houve um aumento na estabilidade térmica da amostra, com o deslocamento da degradação para 137 °C e 154 °C. Esses resultados podem ser devidos à interação entre a enterocina encapsulada e a proteína do soro do leite, favorecida pelo processamento no *spray dryer*. De acordo com Ramos et al. (RAMOS et al., 2019) calor ou pressão podem promover alterações na estrutura conformacional da proteína, expondo seus grupos SH livres inicialmente encoberto pela estrutura da proteína nativa. Com a exposição de tais grupos existe a possibilidade de interação com os grupos funcionais das moléculas de enterocina.

Em conjunto, os resultados propõem que enterocina produzida pelo isolado *E. durans* MF5 apresenta potencial aplicações industrial quando encapsulado em soro de leite.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, verificou-se que o isolado *E. durans* MF5 produz uma enterocina com amplo espectro de atividade inibitória, principalmente contra patógenos veiculados por alimentos (*Escherichia coli* ETEC *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovi*). A enterocina encapsulada não perdeu sua atividade antagônica, mantendo-se viável após o seu processamento em *spray dryer*, incluindo um aumento na UA, apresentou uma ótima atividade inibitória. A ação da enterocina encapsulada foi confirmada pelas imagens de MEV, que mostraram alterações ao nível de parede das células alvo. A microencapsulação foi confirmada pelas técnicas de FTIR e DSC que indicaram a interação entre encapsulante/encapsulado e maior estabilidade térmica. Assim, os resultados do presente trabalho indicam que enterocina pode ser microencapsulada em soro de leite, sendo uma alternativa de conservação de alimentos.

7 REFERÊNCIAS

- ABBASI, A. et al. Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food Chemistry**, v. 143, p. 379–383, 2014.
- ABDEL-HAMID, M. S. et al. Distinctive antagonistic role of new *Enterococcus faecium* ER-3M strain and its bacteriocin effect against *Staphylococcus aureus* Pneumonia. **Rendiconti Lincei**, v. 29, n. 3, p. 675–690, 2018.
- ABID, Y. et al. Spray-drying microencapsulation of nisin by complexation with exopolysaccharides produced by probiotic *Bacillus tequilensis*-GM and *Leuconostoc citreum*-BMS. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. May, p. 25–30, 2019.
- ACHEMCHEM, F. et al. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 141–150, 2005.
- AHMAD, V. et al. Methods of Screening-Purification and Antimicrobial Potentialities of Bacteriocin in Health Care. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 9, 2017.
- AHMADOVA, A. et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631–641, 2013.
- ALSHAMMARI, E. et al. Potential Evaluation and Health Fostering Intrinsic Traits of Novel Probiotic Strain *Enterococcus durans* F3 Isolated from the Gut of Fresh Water Fish *Catla catla*. **Food Science of Animal Resources**, v. 39, n. 5, p. 844–861, 2019.
- ALVAREZ-SIEIRO, P. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2939–2951, 2016.
- ANANOÛ, S. et al. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 179–190, 2005.
- ANANOÛ, S. et al. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 478–486, 2010.
- ARTHUR, T. D.; CAVERA, V. L.; CHIKINDAS, M. L. On bacteriocin delivery systems and potential applications. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 235–248, 2014.
- BELLEI, B. et al. Purification of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. **Journal of Microbiology**, v. 3, n. May, p. 119–125, 2011.
- BEN AMARA, C. et al. Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying. **Food Chemistry**, v. 236, p. 32–40, 2017.
- BIASUZ, T. **Obtenção de espécies de *Lactobacillus* microencapsulado em carragena com combinação proteica e aplicação em salame tipo milano**. 2018. p. 79. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do

Paraná– UTFPR, Câmpus Medianeira/Campo Mourão, 2018.

BORDINI, F. W. **Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* p107 pela técnica de spray drying utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana**. 2019. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells : From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011.

BURGOS, M. J. G. et al. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22706–22727, 2014.

CAMARGO, C. H. et al. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus spp.* isolated from food in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 111–115, 2014.

CARVALHO, M. J. **Isolamento e caracterização de bacteriocinas com potencial interesse na área alimentar**. 2015. 47 f. Tese (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária, Instituto politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, 2015.

CHEN, H.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 75–81, 2014.

CINTAS, L. M. et al. Biochemical and Genetic Evidence that *Enterococcus faecium* L50 Produces Enterocins L50A and L50B, the sec-Dependent Enterocin P, and a Novel Bacteriocin Secreted without an N-Terminal Extension Termed Enterocin Q. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6806–6814, 2000.

COBO MOLINOS, A. et al. Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 762–770, 2008.

CORCORAN, B. M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1024–1039, 2004.

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

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics ? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95–105, 2012.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

DA SILVA, P. T. et al. Microencapsulação de probióticos por spray drying: Avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 7, p. 1342–1347,

2015.

DHUMAL, C. V.; PAL, K.; SARKAR, P. Characterization of Tri-Phasic Edible Films from Chitosan, Guar Gum, and Whey Protein Isolate Loaded with Plant-Based Antimicrobial Compounds. **Polymer-Plastics Technology and Materials**, v. 58, n. 3, p. 255–269, 2019.

ENNAHAR, S. et al. Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 85–106, 2000.

ESTEVINHO, B. N. et al. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 138–155, 2013.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 478–483, 2012.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749–1757, 2009.

FONSECA, J. F. G. DA. Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em *Enterococcus* clínicos e alimentares. **Biologia**, p. 46, 2010.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4385–4389, 2001.

FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2–3, p. 255–270, 1996.

FURLANETO-MAIA, L. et al. Antimicrobial activity of enterocins against *Listeria sp.* and other food spoilage bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 5, p. 797–806, 2020.

FURTADO, D. N. et al. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis subsp. lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 206, p. 201–206, 2015.

GÁLVEZ, A. et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51–70, 2007.

GARCI, B. E.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; REGALADO, C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 670–680, 2008.

GARDINER, G. E. et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray

- drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2605–2612, 2000.
- GBASSI, G. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103–105, 2009.
- GHARANJIG, H. et al. Differential scanning calorimetry (DSC) of nanoencapsulated food ingredients. In: JAFARI, S. M. (org.). **Vol 4 - Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients in: Nanoencapsulation in the Food Industry**. Elsevier Inc., 2020. p. 295–346.
- GILLOR, O.; VRIEZEN, J. A. C.; RILEY, M. A. The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. **Microbiology**, v. 1, p. 1783–1792, 2008.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 215–222, 2003.
- GRANDE, M. J. et al. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 289–297, 2005.
- GRANDE, M. J. et al. Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2339–2345, 2007.
- GÜLLÜCE, M.; KARADAYI, M.; BARIŞ, Ö. Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Volume 2**, 2013, p. 1016–1027, 2013.
- HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 105–108, 2007.
- HARRIS, A. W. et al. Phase relations of high albedo asteroids: The unusual opposition brightening of 44 Nysa and 64 Angelina. **Icarus**, v. 81, n. 2, p. 365–374, 1989.
- HERMANNNS, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais**. 2013. 100 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) - Programas de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- HUFNAGEL, L.; BROCKMANN, D.; GEISEL, T. Forecast and control of epidemics in a globalized world. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 42, p. 15124–15129, 2004.
- IBARGUREN, C. et al. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of enterocins microencapsulated by ionic gelation. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 21–26, 2012.
- IMRAN, M. et al. Diffusion of Fluorescently Labeled Bacteriocin from Edible Nanomaterials and Embedded Nano-Bioactive Coatings. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 33, p. 21618–21631, 2016.
- IWASE TADASHI, C. H. **Bacillus cereus e esporos de bacilos aeróbios mesófilos**

e termófilos deteriorantes em leite em pó. 2017. 83 p. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

JANTZEN, M.; GÖPEL, A.; BEERMANN, C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 4, p. 1029–1036, 2013.

JAOUANI, I. et al. Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1089–1100, 2015.

KANG, J. H.; LEE, M. S. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1169–1176, 2005.

KHAN, K.; VIPIN MADHAVAN, T. P.; MUNIYAPPA, K. Cloning, overexpression and purification of functionally active *Saccharomyces cerevisiae* Hop1 protein from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 72, n. 1, p. 42–47, 2010.

KIM, J. U. et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 519–530, 2017.

KRUNIC, T. et al. **of Whey to Quality of Food Products**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

KUMARIYA, R. et al. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, n. October 2018, p. 171–177, 2019.

LE, N. T. T. et al. Evaluation of factors affecting antimicrobial activity of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* microencapsulated in alginate-gelatin capsules and its application on pork meat as a bio-preservative. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 6, 2019.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1–2, p. 155–164, 2002.

LEROY, F.; FOULQUIÉ MORENO, M. R.; DE VUYST, L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 235–240, 2003.

LI, B. Z. et al. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 3, p. 250–254, 2009.

LIU, H. et al. A novel enterocin T1 with anti-*Pseudomonas* activity produced by *Enterococcus faecium* T1 from Chinese Tibet cheese. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 1–9, 2016.

LÜ, X. et al. Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms. **Food Control**, v. 46, p. 264–271, 2014.

LUCAS, R. et al. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1774–1781, 2006.

MADZIVA, H.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 4, p. 343–351, 2005.

MAIA, L. F. et al. Termoestabilidade de bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 9, n. 2, p. 43, 2018.

MALHEIROS, P. S.; CUCCOVIA, I. M.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in vitro and in goat milk by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. **Food Control**, v. 63, p. 158–164, 2016.

MANDAL, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1190–1195, 2006.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, 2015.

MARTÍNEZ-VIEDMA, P. et al. Inactivation of exopolysaccharide and 3-hydroxypropionaldehyde-producing lactic acid bacteria in apple juice and apple cider by enterocin AS-48. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1143–1151, 2008.

MARTÍNEZ, M. L. et al. Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. **Powder Technology**, v. 270, n. Part A, p. 271–277, 2015.

MARTÍNEZ VIEDMA, P. et al. Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 756–761, 2011.

MASIAS, E. et al. Impairment of the class IIa bacteriocin receptor function and membrane structural changes are associated to enterocin CRL35 high resistance in *Listeria monocytogenes*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 7, p. 1770–1776, 2017.

MATHUR, H. et al. Insights into the mode of action of the sacitibiotic thuricin CD. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 1–14, 2017.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for Studying Bacteriocins. **Methods in Microbiology**, v. 7, n. April, p. 315–422, 1972.

MEDINA AMADO, C. et al. Bacteriocin enterocin CRL35 is a modular peptide that induces non-bilayer states in bacterial model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1862, n. 2, p. 183135, 2020.

MISHRA, S. K. et al. Microencapsulation of reuterin to enhance long-term efficacy against food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, 2018.

MORISSET, D. et al. Mutational analysis of mesentericin Y105, an anti-listeria bacteriocin, for determination of impact on bactericidal activity, in vitro secondary structure, and membrane interaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4672–4680, 2004.

MTIBAA, A. C. et al. Enterocin BacFL31 from a Safety *Enterococcus faecium* FL31: Natural Preservative Agent Used Alone and in Combination with Aqueous Peel Onion (*Allium cepa*) Extract in Ground Beef Meat Storage. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

MUÑOZ, A. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 760–769, 2007.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HOLO, H. **Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus***. **Journal of Bacteriology**, 2007.

NISHIYAMA, M.; IGUCHI, A.; SUZUKI, Y. Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as vanC-type Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 50, n. 1, p. 16–25, 2015.

O'BRYAN, C. A. et al. Characteristics of Bacteriocins and Use as Food Antimicrobials in the United States. *In*: RICKE, S. C. (org.). **Food and Feed Safety Systems and Analysis**, Elsevier Inc., 2018. Cap. 15, 273-286.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas, **Brazilian Journal of Food Technology**, 2015.

OLIVEIRA, C. B. DE. **Efeito dos materiais de parede sobre a atividade antimicrobiana da nisina encapsulada em spray-dryer em relação ao *Staphylococcus aureus***. 2015. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós - Graduação em Engenharia de Alimentos; Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

OLUK, C. A.; KARACA, O. B. The Current Approaches and Challenges of Biopreservation. *In*: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (org.). **Food Safety and Preservation**. Elsevier Inc., 2018. Cap. 18. p. 565–597.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 6, p. 465–499, 2003.

PARADA, J. L. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521–542, 2007.

PARTE, A. C. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825–1829, 2018.

PAUL ROSS, R.; MORGAN, S.; HILL, C. **Preservation and fermentation: Past, present and future**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, n. 1-2, p. 3-

16, 2002.

PÉREZ-MONTERROZA, E. J. et al. Encapsulation of Bixin with High Amylose Starch as Affected by Temperature and Whey Protein. **Food Biophysics**, v. 13, n. 4, p. 343–352, 2018.

PEZZIN, A. P. T. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, 2006.

RAMOS, O. L. et al. Nanostructures of whey proteins for encapsulation of food ingredients. In: JAFARI, S. M. (Ed.). . **Vol 3: Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes in: Nanoencapsulation in the Food Industry**. 1st. ed. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 69–100.

RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369–381, 2013.

REDDY, M. N. P.; ISHWARYA, S. P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation of roasted coffee bean oil in whey protein wall system through nanospray drying. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 3, p. 1–8, 2019.

RIVAS, F. P. et al. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 428–436, 2012.

ROCHA, K. R. et al. Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria innocua*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 1–11, 2019.

RODRÍGUEZ, E. et al. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1–2, p. 7–15, 2000.

S. S. BANSODE, S. K. BANARJEE, D. D. GAIKWAD, S. L. JADHAV, R. M. T. **Microencapsulation: A review International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 2010.

SAIFULLAH, M. et al. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, n. September 2018, p. 230–251, 2019.

SCHITTLER, L. et al. Isolation of *Enterococcus faecium*, characterization of its antimicrobial metabolites and viability in probiotic Minas Frescal cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 11, p. 5128–5137, 2019.

SHARMA, P.; RASHID, M.; KAUR, S. Novel enterocin E20c purified from *Enterococcus hirae* 20c synergised with β -lactams and ciprofloxacin against *Salmonella enterica*. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2020.

SHEORAN, P.; TIWARI, S. K. Enterocin LD3 from *Enterococcus hirae* LD3 causing efflux of intracellular ions and UV-absorbing materials in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 1059–1069, 2019.

- SHIN, M. S. et al. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 2203–2212, 2008.
- SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.
- TODOKORO, D. et al. Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 6955–6964, 2006.
- TOSONI, N. F. POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ENTEROCINAS EM CÉLULAS PLANCTONICAS E EM BIOFILME DE *Salmonella Typhimurium* E SOROTIPOS DE *Escherichia coli*. 2019. **Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. p 51, 2019.
- VIDHYALAKSHMI, R. B. ; R. S. S. Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review. **Advances in Biological Research**, v. 3, p. 96–103, 2009.
- WANG, Q. et al. UV–Vis and ATR–FTIR spectroscopic investigations of postmortem interval based on the changes in rabbit plasma. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–16, 2017.
- WANG, S. et al. Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus ke fi ranofaciens* M1. **Food Microbiology**, v. 46, p. 494–500, 2015.
- WIEDEMANN, I. et al. The mode of action of the lantibiotic lacticin 3147 - A complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 285–296, 2006.
- WILSON; SHAH, N. . Microencapsulation of Vitamins. **ASEAN Food Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2007.
- XIAO, L. J. et al. Expression of yeast high mobility group protein HMO1 is regulated by TOR signaling. **Gene**, v. 489, n. 1, p. 55–62, 2011.
- YI, L. et al. A novel bacteriocin BMP11 and its antibacterial mechanism on cell envelope of *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii*. **Food Control**, v. 91, p. 160–169, 2018.
- YIN, X. et al. α -Tocopherol and naringenin in whey protein isolate particles: Partition, antioxidant activity, stability and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 106, n. December 2019, p. 105895, 2020.
- YING, D. Y. et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, 2010.
- ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.