



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ISABELA POLETTO MASSELLI ROCHA

AVALIAÇÃO DO EFEITO CONSERVADOR DE SUBSTÂNCIA TIPO
BACTERIOCINA PRODUZIDO POR *pediococcus acidilactici* EM SUCO DE
LARANJA

ISABELA POLETTO MASSELLI ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CONSERVADOR DE SUBSTÂNCIA TIPO
BACTERIOCINA PRODUZIDO POR *pediococcus acidilactici* EM SUCO DE
LARANJA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller

664.804
R672a

Rocha, Isabela Poletto Masselli

Avaliação do efeito conservador de substância tipo bacteriocina produzido por *pediococcus acidilactici* em suco de laranja \ Isabela Poletto Masselli Rocha ; orientadora Lizziane Kretli Winkelströter Eller. -- Presidente Prudente, 2020.
34 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.
Bibliografia.

1. Suco de laranja. 2. Conservantes de alimentos. 3. Doenças transmitidas por alimentos. I. Eller, Lizziane Kretli Winkelströter. II. Título.

Catálogo: Bibliotecária - Jakeline Queiroz Ortega – CRB 8/6246

ISABELA POLETTI MASSELLI ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CONSERVADOR DE SUBSTÂNCIA TIPO
BACTERIOCINA PRODUZIDO POR *pediococcus acidilactici* EM SUCO DE
LARANJA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 31 de janeiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Luciana Maria Ramires Esper
Universidade Federal Fluminense – UFF
Niterói-RJ

Profa. Dra. Telma Reginato Martins
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este mestrado ao meu marido, homem íntegro e honesto, que possui um coração maior do que ele próprio. Aos meus filhos, razões da minha vida, motivo para que eu queira sempre crescer e pelos quais me torno uma leoa. Aos meus pais que tanto lutaram e batalharam para nos proporcionar a melhor educação e tanto se desdoblaram para nos criar com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Sempre achei clichê e que fosse fácil escrever os agradecimentos, mas confesso que perdi algumas horas de sono quando deitava minha cabeça no travesseiro e pensava em como escrever.

Em primeiro lugar, assim como deve ser em nossa vida, agradeço à Deus por sempre se fazer tão presente. Sentimos, eu e minha família, sua presença em todos os detalhes da nossa vida, programando cada segundo e nos amparando nos tempos difíceis.

Ao meu marido, que sempre me apoiou e incentivou para que eu seguisse a carreira de pesquisadora e professora, desde o primeiro dia após minha formatura. Ele, que conseguiu multiplicar meu coração em dois e fazer com que batesse fora do meu corpo. Amo você e tudo o que construímos juntos. Este título é nosso.

Aos corações que batem fora de mim, Henrique e Otávio. Ao Henrique pela paciência com a mamãe quando precisava sentar no computador por horas, pela falta de paciência que o mestrado promove para seus alunos e pelas minhas ausências para poder fazer com que isso acontecesse. Te amo infinito, meu primogênito. Otávio, você ainda estava na minha barriga quando ingressei no mestrado e foi extremamente difícil te deixar com 1 mês de vida para assistir às aulas, sentir meu seio transbordando leite durante elas e imaginar que você queria a mamãe. Foi difícil ter que tirar seu leitinho e imagino a dificuldade do papai e da Dona Ivete em ter que te oferecer o leite no copinho, para que não pegasse a mamadeira. Fizemos realmente uma dança. Eu te amamentava, saía correndo, voltava correndo, amamentava novamente e assim foi até você começar a comer. E deu certo! Conseguimos, meu amor.

À minha orientadora, professora Lizziane, que me recebeu com tanto carinho, amor e empatia, e mais que isso, se colocou no meu lugar como mãe, gestante e puérpera. Obrigada pela paciência, pelos ajustes para que eu pudesse ficar tranquila em meu pós parto e pelos ensinamentos. Te admiro muito como profissional, mãe e esposa.

Aos alunos de graduação Vitória, Yuri e Beatriz, alunos de graduação, e Caroline, também aluna de mestrado como eu, que tanto me ajudaram nas práticas de laboratório. Queridos, sem vocês eu finalizaria o mestrado com metade dos meus

cabelos. Maria e Carol, técnicas de laboratório, foi fundamental poder contar com a ajuda de vocês.

Aos professores que contribuíram com ensinamentos e sempre me trataram com muito carinho.

E por fim, aos meus pais. Pais estes que cobram seus filhos para que se tornem o melhor que podem ser. Nos ensinaram, a mim e meus irmãos, a sermos fortes, inteligentes, corretos, batalhadores, honestos e, mais que isso, nos ensinaram sobre o amor. O amor incondicional de mãe e pai e entre eles. Obrigada mãe, pela vida, pelo colo e pelo ouvido sempre que precisei. Pela dança que fez para criar três filhos e trabalhar tanto. Pai, obrigada por tanto esforço e batalha para que pudesse nos oferecer o melhor - educação e qualidade de vida. Eu amo vocês.

RESUMO

Avaliação do efeito conservador de substância tipo bacteriocina produzido por *Pediococcus acidilactici* em suco de laranja

A bioconservação de alimentos é uma abordagem ecológica e inofensiva que utiliza a microbiota natural ou controlada e/ou ainda os compostos antimicrobianos para estender o prazo de validade de alimentos e aumentar a sua segurança. Este trabalho teve como objetivo estudar a aplicação da substância tipo bacteriocina, produzida por *Pediococcus acidilactici*, uma Bactéria Ácido-Lática na bioconservação do suco de laranja. Pesquisas nessa área são de grande importância, pois as bacteriocinas podem substituir os conservantes sintéticos, como por exemplo o benzoato de sódio, que podem ser prejudiciais à saúde humana. O efeito bioconservador da substância tipo bacteriocina foi avaliado considerando as concentrações (0, 25, 50 e 75%) adicionadas em suco de laranja pasteurizado sem adição de conservantes. Para essa avaliação foram utilizadas como microrganismos indicadores a *Listeria monocytogenes* e a *Enterococcus faecium*. Também foram testados os efeitos da bacteriocina nos diferentes valores de pH (2; 6,5 e 9 por 60 min), temperatura (50°C, 75°C e 100°C por 60 min), e na refrigeração (-80°C, -20°C e 4°C por 35 dias). Foi constatado que a atividade antimicrobiana da substância tipo bacteriocina ficou estável durante os 35 dias a -20°C ou -80°C. O desempenho da bacteriocina contra a *Enterococcus faecium* foi superior ao do benzoato de sódio, pois a mesma reduziu 1,0 log de UFC/mL a mais que o conservante sintético. A atividade da bacteriocina não foi influenciada nos pH 2 e 6,5, e nem quando submetida à 50°C por 1 hora. Com isso se conclui que a pediocina tem potencial para ser aplicada na indústria alimentícia, uma vez que apresentou estabilidade às várias condições de armazenamento.

Palavras-chave: viabilidade, conservantes de alimentos, doenças transmitidas por alimentos

ABSTRACT

Evaluation of the conservative effect of bacteriocin-like substance produced by *Pediococcus acidilactici* in orange juice

Food bioconservation is an environmentally friendly and harmless approach that uses natural or controlled microbiota and / or antimicrobial compounds to extend the shelf life of foods and increase their safety. This work aimed to study the application of the bacteriocin-like substance produced by *Pediococcus acidilactici*, a Lactic Acid Bacterium in the orange juice bioconservation. Research in this area is of great importance, as bacteriocins can replace synthetic preservatives such as sodium benzoate, which can be harmful to human health. The bioconservative effect of the bacteriocin-like substance was evaluated considering the concentrations (0, 25, 50 and 75%) added in pasteurized orange juice without preservatives. For this evaluation were used as indicator microorganisms *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium*. The effects of bacteriocin on different pH values (2.0; 6.5 and 9.0 for 60 min), temperature (50 ° C, 75 ° C and 100 ° C for 60 min), and cooling (-80 ° C, -20 ° C and 4 ° C for 35 days)) were also tested. The antimicrobial activity of the bacteriocin-like substance was found to be stable for 35 days at -20 ° C or -80 ° C. The bacteriocin performance against *Enterococcus faecium* was superior to that of sodium benzoate, as it reduced 1.0 log CFU / mL, more than the synthetic preservative. Bacteriocin activity was not influenced at pH 2.0 and 6.5, nor when subjected to 50 ° C for 1 hour. Thus, it is concluded that pediocin has potential to be applied in the food industry, since it presented stability to the various storage conditions.

Keywords: viability, food preservatives, foodborne diseases

LISTA DE SIGLAS

BAL	– Bactéria Ácido-Lática
BHI	– Brain Heart Infusion, Oxoid
GRAS	– Geralmente Reconhecido como Alimento Seguro
HACCP	– Hazard Analysis and Critical Control Point
Kg	– Kilogramas
mg	– Miligramas
Min	– Minutos
mL	– Mililitros
MRS	– De Man, Rogosa, Sharpe
OMS	– Organização Mundial da Saúde
pH	– Potencial Hidrogeniônico
rpm	– Rotações Por Minuto
TDAH	– Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
UA	– Unidades Arbitrárias
UFC	– Unidades Formadoras de Colônia
μl	– Microlitros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura quando submetidos a diferentes pH (2, 6,5 e 9 por 60min), ao tratamento térmico (50, 75 e 100°C por 60min) utilizando *L. monocytogenes* ATCC 19015 como microrganismo indicador..... 20
- Figura 2 - Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura quando submetidos a diferentes pH (2, 6,5 e 9 por 60min), ao tratamento térmico (50, 75 e 100°C por 60min) utilizando *E. faecium* ATCC 6569 como microrganismo indicador..... 21
- Figura 3 - Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura ajustada a pH6,5 quando submetidos a refrigeração (-80, -20 e 4°C por 35 dias) utilizando *L. monocytogenes* ATCC 19015 como microrganismo indicador..... 21
- Figura 4 - Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura ajustada a pH6,5 quando submetidos a refrigeração (-80, -20 e 4°C por 35 dias) utilizando *E. faecium* ATCC 6569 como microrganismo indicador..... 22
- Figura 5 - Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja com a utilização de *L. monocytogenes* ATCC 19015 como microrganismo indicador..... 23
- Figura 6 - Resultados da diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas

	concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja com a utilização de <i>E. faecium</i> ATCC 6569 como microrganismo indicador.....	23
Figura 7 -	Resultados da contagem em placa para avaliação efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja quando incubados por até 35 dias a 4 °C. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19015 foi utilizada como microrganismo indicador e benzoato de sódio (BS) 0,5g/L como controle.....	24
Figura 8 -	Resultados da contagem em placa para avaliação efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja quando incubados por até 35 dias a 4 °C. <i>E. faecium</i> ATCC 6569 foi utilizada como microrganismo indicador e benzoato de sódio (BS) 0,5g/L como controle.	25

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO – Avaliação do efeito conservador de substância tipo bacteriocina produzido por <i>Pediococcus acidilactici</i> em suco de laranja.....	13
Introdução.....	15
Materiais e Métodos	17
Resultados	20
Discussão	25
Conclusão	28
Referências	28
ANEXO - Normas de Submissão Journal of Food Science and Technology.....	34

Avaliação do efeito conservador de substância tipo bacteriocina produzido por *Pediococcus acidilactici* em suco de laranja

Isabela Poletto Masselli Rocha², Vitoria Ribeiro da Costa¹, Yuri Allisson De Moraes¹,
Lizziane Kretli Winkelstroter ^{*1,2}

¹ Health Sciences Faculty, University of Western Sao Paulo.700, Jose Bongiovani St.Postal
code19050-920 Presidente Prudente, Sao Paulo – Brazil

²Master in Health Science, University of Western Sao Paulo. 700, Jose Bongiovani St.Postal
code19050-920 Presidente Prudente, Sao Paulo – Brazil

Autor correspondente: Prof. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Rua José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária,

Presidente Prudente - SP, Brasil

CEP: 19050-920

Email: lizzianekretli@gmail.com

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Journal of Food Scienc and Tecnology; Fator de Impacto 1,849; Qualis A2.

Resumo

A bioconservação de alimentos é uma abordagem ecológica e inofensiva que utiliza a microbiota natural ou controlada e/ou ainda os compostos antimicrobianos para estender o prazo de validade de alimentos e aumentar a sua segurança. Este trabalho teve como objetivo estudar a aplicação da substância tipo bacteriocina, produzida por *Pediococcus acidilactici*, uma Bactéria Ácido-Lática na bioconservação do suco de laranja. Pesquisas nessa área são de grande importância, pois as bacteriocinas podem substituir os conservantes sintéticos, como por exemplo o benzoato de sódio, que podem ser prejudiciais à saúde humana. O efeito bioconservador da substância tipo bacteriocina foi avaliado considerando as concentrações (0, 25, 50 e 75%) adicionadas em suco de laranja pasteurizado sem adição de conservantes. Para essa avaliação foram utilizadas como microrganismos indicadores a *Listeria monocytogenes* e a *Enterococcus faecium*. Também foram testados os efeitos da bacteriocina nos diferentes valores de pH (2; 6,5 e 9 por 60 min), temperatura (50°C, 75°C e 100°C por 60 min), e na refrigeração (-80°C, -20°C e 4°C por 35 dias). Foi constatado que a atividade antimicrobiana da substância tipo bacteriocina ficou estável durante os 35 dias a -20°C ou -80°C. O desempenho da bacteriocina contra a *Enterococcus faecium* foi superior ao do benzoato de sódio, pois a mesma reduziu 1,0 log de UFC/mL a mais que o conservante sintético. A atividade da bacteriocina não foi influenciada nos pH 2 e 6,5, e nem quando submetida à 50°C por 1 hora. Com isso se conclui que a pediocina tem potencial para ser aplicada na indústria alimentícia, uma vez que apresentou estabilidade às várias condições de armazenamento.

Palavras chave: viabilidade, conservantes de alimentos, doenças transmitidas por alimentos

1.Introdução

O aumento da população mundial e a globalização exigiu da indústria de alimentos uma ampliação na escala de produção, distribuição e garantia da entrega de alimentos até o destino final. Para garantir a segurança dos alimentos, têm sido desenvolvidos estudos relacionados com a conservação dos alimentos, que consiste em garantir as propriedades organolépticas, sabor, valor nutricional e segurança alimentar – sem deterioração e/ou crescimento de patógenos alimentares (Buisman et al. 2017).

Os processos de conservação alimentar mais comumente utilizados são os tratamentos térmicos com altas e baixas temperaturas, secagem, salga e conservantes químicos (Johnson et al. 2017). O grande desafio no uso destas técnicas, é a manutenção das propriedades originais, uma vez que grande parte delas alteram as características organolépticas do alimento (Millan-Sango and Valdramidis, 2018).

Há um crescente número de consumidores que buscam alimentos mais seguros e naturais. A grande preocupação no consumo exagerado de conservantes químicos se deve principalmente aos riscos e efeitos danosos como reações alérgicas e possíveis formações de produtos finais cancerígenos, como as nitrosaminas (Kashani-Haddad et al. 2012).

Dentre os alimentos bastante consumidos mundialmente, tanto in natura como processados ou industrializados, está a laranja. Esta fruta é rica em compostos bioativos como vitamina C, folato, potássio, vitamina B6, vitamina A, carotenoides e flavonoides (Ponce et al. 2019). Assim sendo, foi demonstrado em ensaios clínicos randomizados um grande potencial em melhorar o controle glicêmico, a saúde vascular e auxílio na prevenção dos fatores de risco de síndromes metabólicas quando há amplo consumo de frutas (Ponce et al. 2019).

De acordo com a Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (Citrus Br), o principal foco do mercado de suco de laranja no Brasil é a exportação (Chaddad, 2016). Os Estados Unidos e o Brasil são os maiores produtores mundiais de suco de laranja, representando 30% e 60%, respectivamente da produção global (Carter et al. 2016).

A segurança microbiológica do suco de laranja depende, principalmente, das condições em relação à estocagem, manipulação, extração e sanitização das frutas antes do processo produtivo. O *Food and Drug Administration* (FDA) publicou em janeiro de 2011, um documento que estabelece um conjunto de procedimentos chamado HACCP – “*Hazard Analysis and Critical Control Point*”, que asseguram a qualidade e segurança alimentar para importação do suco (e qualquer outro alimento) (Minor and Parrett 2017).

A acidez do suco de laranja parece ser um fator limitante para o crescimento microbiano, no entanto, vários microrganismos são ácido-resistentes como as bactérias ácido-láticas, algumas espécies formadoras de esporos e leveduras, possibilitando assim a deterioração do alimento e o desenvolvimento de doenças de origem alimentar (Oliveira et al. 2006). Um exemplo é a groselha preta, que são frutas ácidas e seu suco concentrado chega a valores de pH em torno de 2,5. Ainda assim, foi encontrado o *Alicyclobacillus*, um agente acidofílico causador de deterioração. Alguns destes isolados têm maior capacidade de deterioração por produzir grandes quantidades de guaiacol, que afeta principalmente o odor do produto (André et al. 2017).

O armazenamento do suco de laranja em baixas temperaturas parece exercer um fator favorável à sua conservação. A indústria alimentícia comumente associa o armazenamento sob refrigeração e a adição de conservantes químicos como sorbato de potássio e benzoato de sódio no aumento do tempo de prateleira dos produtos alimentícios (Yang et al. 2017).

No suco de laranja, pode ser adicionado o benzoato de sódio que é um conservante químico, com ação bacteriostática e fungistáticas (Pongsavee, 2015). O uso do conservante em alimentos está vinculado com a comprovação da sua inocuidade e segurança. A OMS recomenda até 5 mg/kg de benzoato de sódio (WHO 2000). Porém, Dixit et al. (2008) demonstraram que a quantidade utilizada em alimentos tem sido muito maior do que a sugerida, em torno de 2,1 g/kg.

Alguns estudos têm relatado as consequências do uso do benzoato de sódio (Oyewole et al. 2011, Lennerz et al. 2014, Gören et al. 2015; Aşçı et al. 2016). É notado que o consumo excessivo pode trazer importantes alterações sanguíneas associados aos possíveis danos hepatocelulares (Oyewole et al. 2011), uma vez que a fase final da biotransformação hepática do conservante envolve sua conjugação com glicina e excreção como ácido úrico pela urina (Lennerz et al. 2014). Outros sintomas como: dermatite alérgica, urticárias, asma, diarreia e hemorragia intestinal também foram observados em ratos (Gören et al. 2015; Aşçı et al. 2016). Além disso, foi detectada a capacidade de indução de neurotoxicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade na embriogênese precoce de larvas de peixe-zebra (Tsay et al. 2007). Outras evidências demonstraram a sua relação com o TDAH em crianças pequenas (Lok et al. 2013; Connolly et al. 2010; Noorafshan et al. 2014; Khoshnoud et al. 2017).

A partir destes relatos, estudos sobre biopreservação de alimentos têm despertado a atenção. As bactérias ácido láticas são anaeróbicas, anaeróbicas facultativas ou microaerófilas; Gram-positivas e sem motilidade. Seus produtos primários são lactato, acetato, succinato, dióxido de carbono e etanol. Entretanto, grande parte delas produzem

metabólitos secundários capazes de inibir outras bactérias, como as toxinas, enzimas bacteriolíticas e bacteriocinas (Schulz et al. 2014).

As bacteriocinas são definidas como agentes de biopreservação, pois possuem atividade antimicrobiana e não afetam as características sensoriais dos alimentos (Baptista et al. 2019). São peptídeos ou proteínas com ação bactericida ou bacteriostática sintetizados no ribossomo com diversas características bioquímicas e genéticas, dependendo da bactéria de origem (Baptista et al. 2019; Ahmad et al. 2017). Pratush et al. (2012) demonstrou a eficácia da bacteriocina produzida pelo *Lactococcus lactis* AP2 em comparação com o benzoato de sódio no suco de laranja.

Apesar da bacteriocina inibir alguns patógenos, sua ação depende de fatores e características próprias do meio como osmolaridade, pH e temperatura. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados para aprimorar a sua produção em larga escala e sua aplicação em diferentes matrizes alimentares (Ahmad et al. 2017).

A Nisina é uma bacteriocina aprovada pela OMS desde 1969 e pelo FDA desde 1988 como conservante de alimentos, sendo um peptídeo produzido pelo *Lactococcus lactis* sub espécie *lactis* comum em alimentos lácteos (Ahmad et al. 2017; Gharsallaoui et al. 2015). ALTA™ 2341, uma pediocina, é um subproduto obtido através da fermentação do *Pediococcus acidilactici*, cultivado em meio contendo xarope, proteínas vegetais e caldo de extrato de levedura é comercializado através da fabricante Quest International, tem sido utilizada na bioconservação de alimentos (Bédard et al. 2018).

As pediocinas, são bacteriocinas produzidas a partir do *Pediococcus spp.* com amplo espectro de atividade antimicrobiana e bactericida principalmente contra bactérias Gram-positivas (Papagianni et al. 2009). As pediocinas já foram aplicadas previamente na bioconservação de alimentos (Vitola et al. 2018), entretanto, não há relatos da sua aplicação em suco de laranja.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial da substância tipo bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* CE51 como bioconservante em suco de laranja.

2. Materiais e Métodos

2.1 Origem e conservação dos microrganismos utilizados

Pediococcus acidilactici CE51 é uma bactéria láctica em forma de bastonete, Gram-positiva e catalase negativa, originada de embutidos cárneos. O isolado foi cultivado a 30°C em caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe). *Listeria monocytogenes* ATCC 19015, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Shigella sonnei* ATCC

25931, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecium* ATCC 6569 foram cultivadas a 37°C por 24 h em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid), e foram usadas como microrganismos indicadores. As cepas foram mantidas a -20°C em caldo BHI ou MRS contendo 20% (v/v) de glicerol.

2.2. Extração da substância tipo bacteriocina e avaliação da atividade antimicrobiana

A extração da substância tipo bacteriocina iniciou-se pelo inóculo de 100µL da cultura fresca de bactéria ácido láctica em 20mL de caldo MRS com posterior incubação a 30°C / 24 horas. Após esse processo, o cultivo foi submetido a centrifugação (3.500 rpm) por um período de 10 minutos. O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,5 (pHmetro QUIMIB Q400AS, Diadema, Brasil) com solução de NaOH 10M. Em seguida, o sobrenadante foi sujeito à filtração estéril (Sterile Syringe Filter 0.45 µm), e posteriormente o mesmo foi submetido a um tratamento térmico em banho de água em ebulição, durante 10 minutos (Nielsen et al. 1990; Bromberg et al. 2006; Sidek et al. 2018; Gutiérrez-Cortés et al. 2018).

Para avaliação da atividade da substância tipo bacteriocina aplicou-se o método de diluição crítica (Mary-Harting et al. 1972; Sidek et al. 2018; Gutiérrez-Cortés et al. 2018). O sobrenadante foi diluído sucessivamente na razão 1:2 (v/v) em placa de microtitulação, utilizando-se solução-tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7. Logo após, alíquotas de 10µL de cada diluição foram depositadas na superfície de placas de MRS. A estirpe indicadora foi reativada em caldo BHI a 37°C, por 24 horas, sob aerobiose, em seguida foram transferidos 500µl do cultivo da bactéria indicadora para 50 mL de ágar semi-sólido de BHI.

Depois de homogeneizados, os tubos contendo ágar semi-sólido de BHI inoculado foram vertidos sobre as placas de ágar MRS, formando uma sobrecamada. Após 24 horas de incubação os meios foram analisados quanto a sustentação da atividade inibitória da bacteriocina através da formação de halos de inibição. O título da substância tipo bacteriocina, expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/mL), foi estabelecido como sendo a recíproca da maior diluição que mostrou halo de inibição, multiplicada por 100, para a obtenção da preparação original (Gutiérrez-Cortés et al. 2018).

2.3 Sensibilidade da substância tipo bacteriocina a diferentes enzimas

A natureza proteica da substância tipo bacteriocina, produzida pela bactéria láctica em estudo, foi determinada por meio da verificação de sua sensibilidade às enzimas proteolíticas (Mary-Harting et al.1972; Sidek et al. 2018). As soluções de enzimas (0,2 mg/mL) esterilizadas por filtração foram misturadas com a substância tipo bacteriocina na proporção de 1:1 (v/v). A mistura obtida foi incubada a 37°C/1 hora. Em seguida, foi realizada a inativação enzimática, por meio de um tratamento térmico a 95°C, durante 5 min. Na

determinação da atividade antimicrobiana da substância tipo bacteriocina, utilizou-se 10^6 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* como microrganismo indicador. Os controles consistiram de bacteriocina em tampão fosfato de sódio 10 mM e soluções de enzimas não adicionadas de bacteriocina. Soluções-teste de enzimas e os controles foram depositados em cada placa. Após a secagem dos inóculos, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, para posterior avaliação da presença de zonas de inibição. As enzimas testadas foram pepsina (≥ 250 un./mg), α -quimotripsina (≥ 40 un./mg), e proteinase K (≥ 30 un./mg) (Bromberg, et al. 2006; Hermanns et al. 2013; Gutiérrez-Cortés et al. 2018).

2.4 Efeito do pH, tratamento térmico e refrigeração na ação da substância tipo bacteriocina

Foi avaliada a estabilidade da atividade antimicrobiana da substância tipo bacteriocina quando submetida a diferentes valores de pH (2; 6,5 e 9 por 60 min), tratamentos térmicos (50°C, 75°C e 100°C por 60 min) e refrigeração (-80°C, -20°C e 4°C por 35 dias). Os pHs foram ajustados a seus respectivos valores com soluções de NaOH 10 M e HCl 10 M. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de diluição crítica conforme descrito no item 2.2. Foram utilizadas microrganismos indicadores que apresentaram efeito antagônico da bacteriocina (Bromberg, et al. 2006; Sidek et al. 2018).

2.5 Efeito da substância tipo bacteriocina na bioconservação de suco de laranja

Para avaliar o efeito bioconservador da substância tipo bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* foi utilizado o sobrenadante livre de células em diferentes concentrações (0, 25, 50 e 75%) em suco de laranja industrializado sem adição de conservantes. Como controle foi utilizado o conservante benzoato de sódio 0,5g/L. O inóculo dos patógenos alimentares que apresentaram resposta positiva para a ação da substância tipo bacteriocina no item 2.2 foram acrescentados às preparações de suco de laranja com substância tipo bacteriocina, benzoato de sódio ou sem adição de substância conservadora. Foi utilizado um inóculo padrão de 0,5 da escala Mc Farland (1×10^8 UFC/mL) utilizando solução salina para a diluição necessária. As preparações foram armazenadas a 4°C por até 35 dias. A viabilidade dos microrganismos inoculados foi realizada a cada 7 dias por contagem padrão em placa em ágar BHI e incubação a 37°C. A estabilidade da atividade antimicrobiana da bacteriocina no suco de laranja também foi realizada por meio da diluição crítica, conforme o item 2.2 (Gutiérrez-Cortés et al. 2018).

2.6 Forma de análise dos dados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados finais submetidos à análise estatística. Para análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA (Dunnet),

considerando uma significância de $P < 0,05$. A amostra sem adição de bacteriocina e com a adição de benzoato de sódio 0,5g/L foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados no GraphPad Prism® 4 (GraphPad Software Inc.).

3.Resultados

O sobrenadante livre de células de *P. acidilactici* CE51 apresentou atividade antimicrobiana para *L. monocytogenes* e *E. faecium*. O espectro de atividade do sobrenadante da cultura láctica CE51 foi quantificada por meio do método de diluição crítica demonstrando espectro antimicrobiano de 3.200 UA/mL para *L. monocytogenes* e 1600 UA/mL para *E. faecium*.

A substância antimicrobiana produzida pelo *P. acidilactici* CE51 demonstrou ter natureza proteica uma vez que foi observada degradação do halo de inibição a *L. monocytogenes* quando expostas as enzimas digestivas α -Quimotripsina, Proteinase K e uma redução na atividade da pepsina. Também não foi observada perda da atividade antagonista pela substância tipo bacteriocina quando submetida ao tratamento térmico em banho de água em temperatura de ebulição/5 minutos, nem quando neutralizado o pH, excluindo desta forma ação antimicrobiana devido a produção de ácidos orgânicos e confirmando a hipótese que a substância de ação antimicrobiana é uma substância tipo bacteriocina.

Foi observado que pH 2,0 e pH 6,5 não influenciaram a atividade da substância tipo bacteriocina produzida por *P. acidilactici* CE51. Enquanto, o pH 9,0 inibiu completamente a atividade antimicrobiana da pediocina em *L. monocytogenes* e *E. faecium* ($p < 0,05$). O tratamento térmico por 1h a 50°C não alterou a ação da bacteriocina frente aos dois microrganismos, entretanto, a sua ação antimicrobiana foi reduzida a metade em temperatura de 75°C ($p < 0,05$). A 100°C houve inibição completa da ação frente a *E. faecium*, restando apenas um quarto (400 UA/mL) da atividade inicial frente *L. monocytogenes* ($p < 0,05$) (Figura 1 e 2)

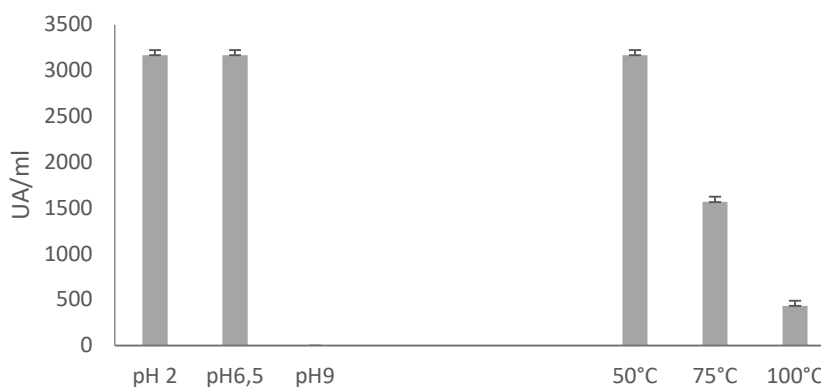


Figura 1. Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura quando submetidos a diferentes pH (2, 6,5 e 9 por 60min), ao tratamento térmico (50, 75 e 100°C por 60min) utilizando *L. monocytogenes* ATCC 19015 como microrganismo indicador.

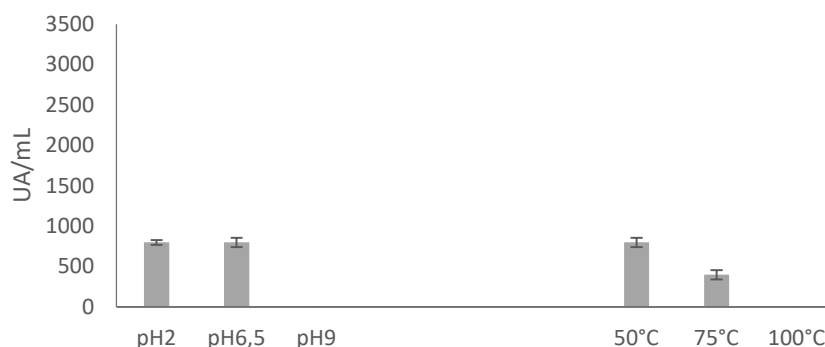


Figura 2. Resultados do ensaio da diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura quando submetidos a diferentes pH (2, 6,5 e 9 por 60min), ao tratamento térmico (50, 75 e 100°C por 60min) utilizando *E. faecium* ATCC 6569 como microrganismo indicador.

Em relação ao efeito do armazenamento da substância tipo bacteriocina em diferentes temperaturas de refrigeração foi observado uma ação sem alterações até 35 dias e 28 dias respectivamente para temperatura a -80°C e -20°C, apresentando perfil semelhante de atividade antimicrobiana. Entretanto, para armazenamento em temperatura 4°C ela reduziu sua ação contra *L. monocytogenes* a partir do 14° dia e contra *E. faecium* a partir do 7° dia ($p < 0,05$) (Figura 3 e 4)

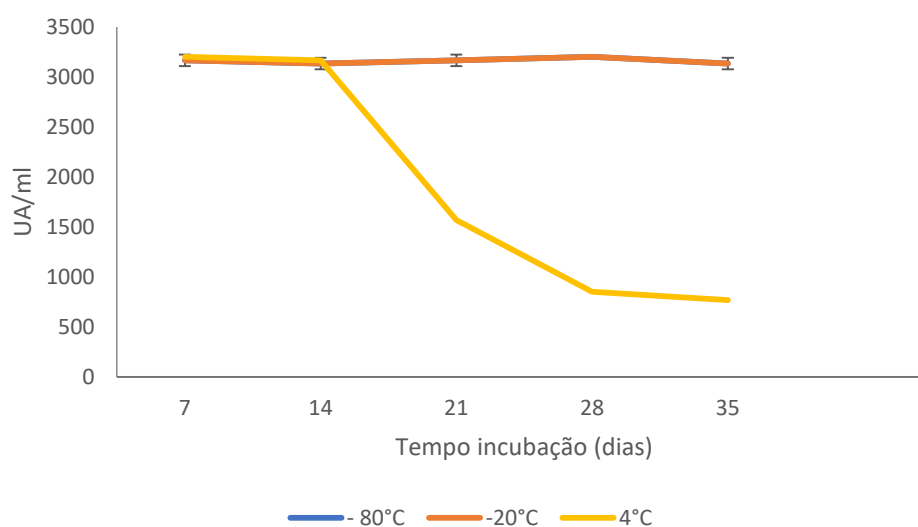


Figura 3. Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura ajustada a pH6,5 quando submetidos a refrigeração (-80, -20 e 4°C por 35 dias) utilizando *L. monocytogenes* ATCC 19015 como microrganismo indicador.

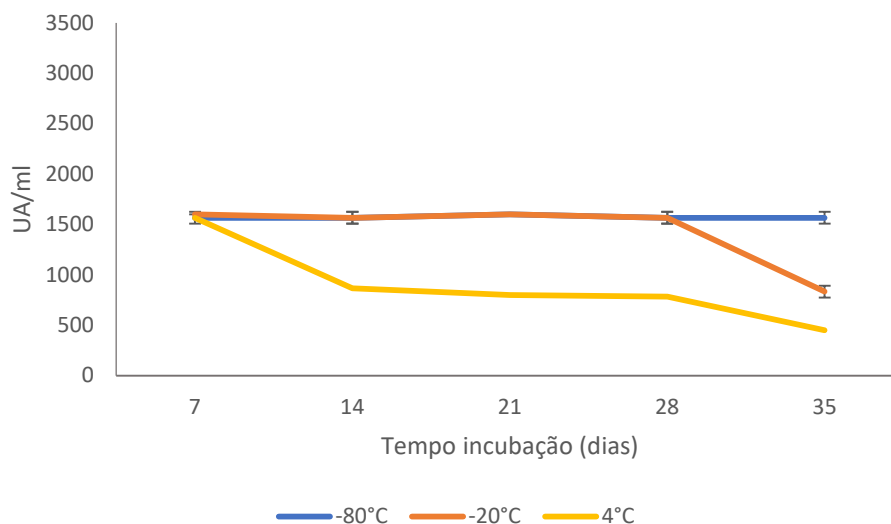


Figura 4. Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina pura ajustada a pH6,5 quando submetidos a refrigeração (-80, -20 e 4°C por 35 dias) utilizando *E. faecium* ATCC 6569 como microrganismo indicador.

Foi demonstrado que suco de laranja sem a presença de substância tipo bacteriocina não formou halos de inibição no teste de diluição crítica. O suco contendo 75% de bacteriocina apresentou maior atividade se comparado com bacteriocina pura (BP) ao final dos 35 dias ($p < 0,05$). Das concentrações de sobrenadante testados, o suco contendo 25% de substância tipo bacteriocina apresentou a menor atividade antimicrobiana, mas não apresentou variações bruscas tanto quando foi utilizado *L. monocytogenes* quanto *E. faecium* como microrganismo indicador (Figura 5 e 6).

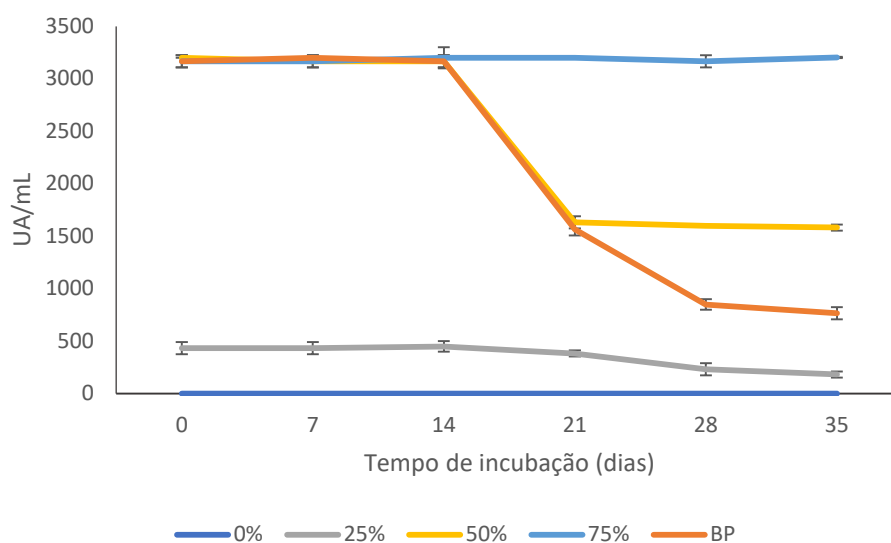


Figura 5. Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja com a utilização de *L. monocytogenes* ATCC 19015 como microrganismo indicador.

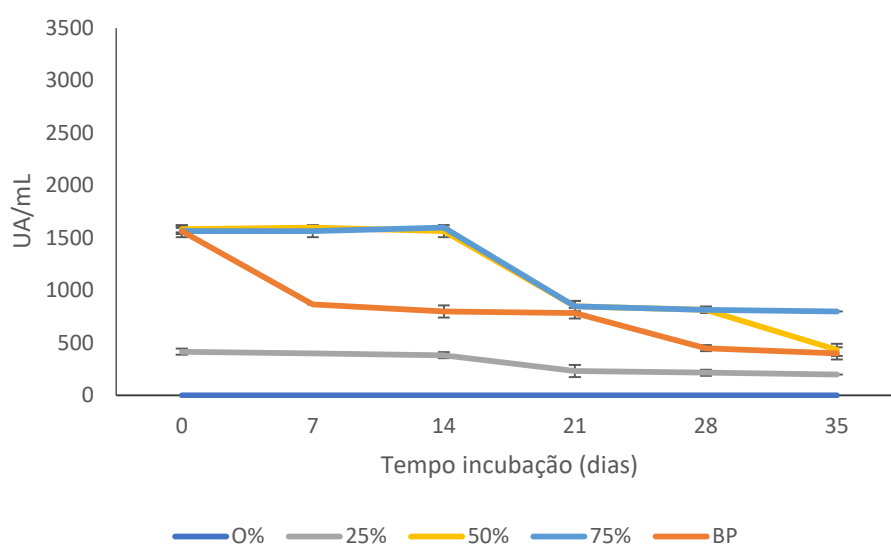


Figura 6. Resultados do ensaio de diluição crítica para avaliar o efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja com a utilização de *E. faecium* ATCC 6569 como microrganismo indicador.

Em relação a *L. monocytogenes* foi notado que suco de laranja não é uma matriz alimentar que favorece a sua viabilidade visto que houve uma redução progressiva da sua

contagem, até que no dia 21 não foi possível observar células viáveis. O maior efeito antimicrobiano observado foi no primeiro contato com a substância tipo bacteriocina com uma redução de 5 log UFC/mL ($p < 0,05$). Nos 7º e 14º dias essa diferença foi reduzida para 2,5 log de UFC/mL ($p < 0,05$) em comparação com o suco sem substância tipo bacteriocina. A presença do benzoato de sódio (BS) (0,5g/L) em suco de laranja contaminado artificialmente com *L. monocytogenes* reduziu completamente o microrganismo após 7 dias de incubação ($p < 0,05$) (Figura 7).

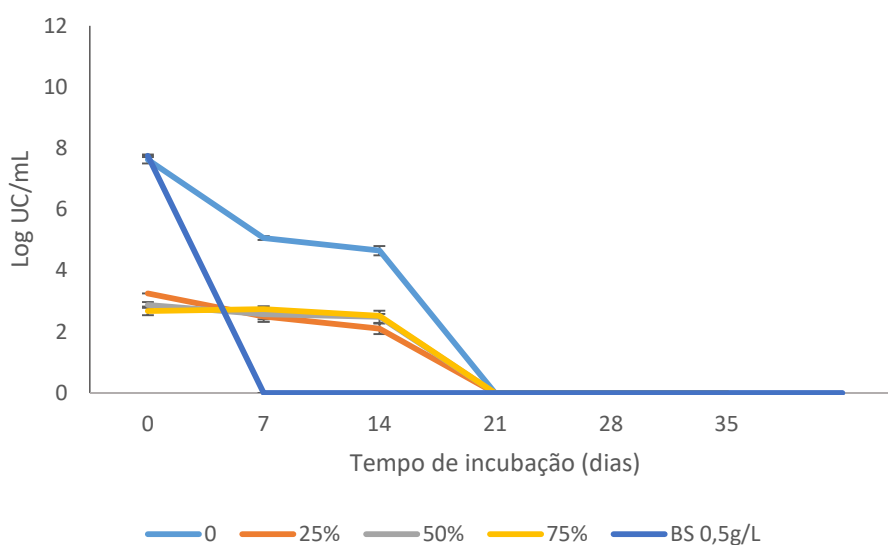


Figura 7. Resultados da contagem em placa para avaliação efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja quando incubados por até 35 dias a 4 °C. *L. monocytogenes* ATCC 19015 foi utilizada como microrganismo indicador e benzoato de sódio (BS) 0,5g/L como controle.

E. faecium foi capaz de se manter viável até 21 dias no suco de laranja puro, após esse período foi observado um decréscimo na sua viabilidade. Neste período, também foi observado o maior efeito da conservação com a aplicação da bacteriocina 75% com uma redução de 2,7Log de UFC/mL ($p < 0,05$). A presença de benzoato de sódio (0,5g/L) neste mesmo período de armazenamento reduziu apenas 1,7logUFC/mL (Figura 8).

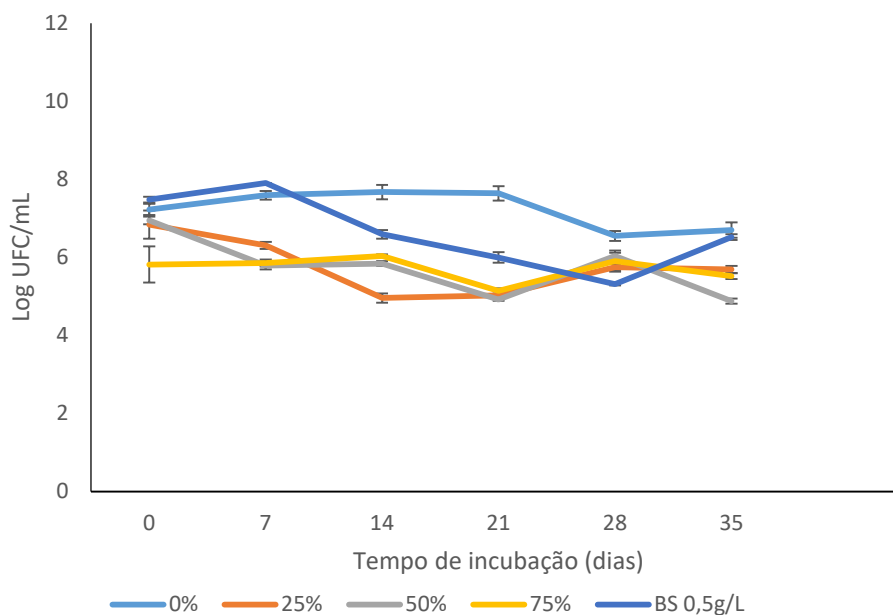


Figura 8. Resultados da contagem em placa para avaliação efeito da substância tipo bacteriocina ajustada para pH6,5 nas concentrações 0, 25, 50 e 75% e Bacteriocina pura (BP) em suco de laranja quando incubados por até 35 dias a 4 °C. *E. faecium* ATCC 6569 foi utilizada como microrganismo indicador e benzoato de sódio (BS) 0,5g/L como controle.

Tanto para a avaliação de *L. monocytogenes* quanto para *E. faecium* em suco de laranja, as contagens em placa sofreram pouca variação em relação as três concentrações de bacteriocina testadas ($p > 0,05$), demonstrando que o efeito conservador foi independente das concentrações.

4. Discussão

A busca por alimentos mais seguros tem motivado a aplicação de métodos alternativos na conservação dos alimentos, como as bacteriocinas. As pediocinas tem sido um grande destaque devido a sua aplicação na conservação dos alimentos (Papagianni et al. 2009; Zhang, 2018; Cotter et al. 2013).

L. monocytogenes é o microrganismo causador de listeriose, uma doença de origem alimentar que pode resultar em sintomas similares a uma gastroenterite febril até uma infecção sistêmica. A forma invasiva da doença é responsável por uma taxa de mortalidade entre 20 a 30% principalmente em lactentes, imunossuprimidos e idosos (Paduro et al. 2019). Outro grupo de risco são gestantes, pois a listeriose, mesmo da forma mais branda, pode causar aborto e malformação fetal (Paduro et al. 2019). Bactérias do gênero *Enterococcus* também possuem um grande impacto na Saúde Pública e geralmente acometem indivíduos

imunossuprimidos. Podem causar doenças como bacteremia, endocardite, infecções no trato urinário (Destro and Ribeiro, 2014).

Alguns trabalhos já relataram a ação antilisteriana de bacteriocinas produzidas por *P. acidilactici*. Amado et al. (2016), relataram o efeito da pediocina AS-1 produzida por *P. acidilactici* NRRL B-5627 como um importante agente antimicrobiano nas silagens de milho. Schlyter et al. (1993) verificou a atividade antilisteriana do subproduto derivado de cultura de *P. acidilactici* em diferentes percentuais. Estes relatos são semelhantes aos dados obtidos no presente estudo uma vez que foi observado ação antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* e *E. faecium*. Nenhum relato da literatura foi encontrado em relação a ação antimicrobiana da substância tipo bacteriocina produzida por *P. acidilactici* frente a *E. faecium*

Dados da literatura demonstram que a pediocina age na permeabilização da célula-alvo, inibição da síntese da parede celular, inibição da atividade da DNA girase ou da RNA polimerase da célula-alvo (Ogaki et al. 2015). Em geral, o mecanismo de ação das bacteriocinas provenientes de bactérias ácido-láticas possuem ação por dissipação da força próton-motriz que modifica o potencial da membrana e do gradiente de concentração de H⁺, formando poros na membrana plasmática (Porto et al. 2017). No presente trabalho, foi observado que o efeito conservador da substância tipo bacteriocina foi independente das concentrações. Este fato sugere que o mecanismo de ação pode estar relacionado a saturação de receptores de membrana das bactérias ou possível ação enzimática da bacteriocina, que demandaria uma análise de cinética não realizada neste estudo.

Alguns estudos demonstraram a aplicação da substância tipo bacteriocina produzida por *P. acidilactici* como conservante alimentar. Nielsen et al. (1990) usaram a pediocina como conservante de carne bovina e observaram uma redução de até 2,2 log UFC de *L. monocytogenes*, além disso, observaram que a atividade antimicrobiana se manteve estável por até 28 dias sob armazenamento refrigerado. Chen et al. (2004) utilizou 3000 e 6000 UA/mL de pediocina para a conservação de salsichas e observaram sua ausência de *L. monocytogenes* por até 12 semanas. Skariyachan e Govindarajan, (2019) pulverizou sobrenadante contendo bacteriocina produzida por *Pediococcus spp.* em tomates e observaram que as amostras mantiveram sem deterioração por 14 dias. O mesmo estudo apresentou comparações de alimentos como milho, morango, carne e cogumelos, pulverizados com a pediocina e sem pediocina e concluíram que todas as amostras tratadas tiveram redução significativa na contagem de células viáveis.

O uso de bacteriocinas na bioconservação de bebidas também foi observado em alguns trabalhos (Alpas; Bozoglu, 2000; Backialakshmi et al. 2015; Mohammad et al. 2016; Pei et al.

2015; Tenea, Barrigas, 2018). Dentre os mais recentes, Backialakshmi et al. (2015) estudou a biopreservação do suco de laranja fresco usando dois tipos de bacteriocinas purificadas de *Leuconostoc mesenteroides* e demonstraram que ambos foram eficientes durante o processo de preservação de alimentos. Tenea e Barrigas (2018) avaliaram a ação conservante do sobrenadante livre de células contendo bacteriocina de *Lactobacillus plantarum* Cys5-4 em bebidas artesanais. Observaram a ação eficaz sobre a *E. coli* e *Salmonella entérica*, principais bactérias patogênicas encontradas em suco de laranja artesanal. Desta forma demonstrou ser um bioconservante promissor, com ampla aplicação alimentícia desde que seja implantado um programa de boas práticas de fabricação. Mohammad et al. (2016), estudaram o efeito de biopreservativo de bacteriocina na preservação de suco de fruta. Os autores observaram que a bacteriocina retardou o crescimento de patógenos como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella paratyphi*. Os autores também sugeriram que as bactérias ácido lácticas poderiam ser consideradas uma boa solução para as cepas resistentes aos antibióticos. Nenhum dos trabalhos publicados aplicaram a pediocina em suco de laranja, demonstrando a importância e o destaque do presente trabalho na área de bioconservação alimentar.

A substância tipo bacteriocina utilizada neste trabalho apresentou um alto potencial de aplicação como conservante devido sua estabilidade em diversas condições e por ter ação antimicrobiana contra a *L. monocytogenes* e *E. faecium* em suco de laranja. Pal et al. (2010) demonstrou que a faixa ótima de pH para efeito da pediocina foi de pH 2 a 7. Narsaiah et al. (2013) relatou o melhor efeito da pediocina entre pH 3 e 9. No presente trabalho, também foi observado a manutenção da atividade entre pH 2,0 a 6,5 entretanto, foi observado uma completa inibição da ação da pediocina em pH 9,0.

Em relação ao tratamento térmico foi observado uma degradação gradativa da ação da bacteriocina com o aumento da temperatura. Quando submetida a temperatura de ebulição por 60 min foi observada atividade de 400 UA/mL para *L. monocytogenes* e ação antimicrobiana totalmente inibida frente à *E. faecium*. Entretanto, quando submetidas à temperatura -20°C e -80°C a ação da bacteriocina foi capaz de se manter inalterada por até 35 dias. Relatos da literatura demonstraram resultados variados. Narsaiah et al. (2013) demonstraram manutenção da atividade inibitória da pediocina após tratamento térmico de 65°C a 121°C. Por outro lado, Wang et al. (2015) demonstraram que a pediocina se manteve estável quando armazenada a -20°C ou 4°C por até 4 semanas.

É ressaltado ainda neste trabalho a impossibilidade de avaliar o efeito da bacteriocina produzida por *P. acidilactici* na presença *L. monocytogenes*, uma vez que naturalmente, este

microrganismo não conseguiu sobreviver por muito tempo em ambientes ácidos, como o suco de laranja (Gahan et al. 1996; Taylor et al. 2019).

No presente estudo foi constatado que a ação bioconservadora da substância tipo bacteriocina foi superior ao benzoato de sódio quando aplicados em suco de laranja contendo *E. faecium*. O benzoato de sódio é um conservante alimentar amplamente usado pela indústria alimentícia há muito tempo, sendo aplicado inclusive no suco de laranja. Embora ele esteja entre os compostos “Geralmente reconhecido como seguro” (GRAS), seu consumo em excesso pode resultar em danos à saúde (Yang et al. 2017; Lannerz et al. 2015). Além disso, há uma preocupação em relação ao consumo de benzoato de sódio juntamente com o ácido ascórbico (vitamina C) uma vez que pode desencadear a formação de benzeno. Um composto tóxico capaz de causar impacto negativo na saúde humana, especialmente o sistema nervoso e imunológico, e eventualmente causar câncer após exposição a longo prazo (Kwon et al. 2008).

É evidente a necessidade de se buscar alternativas naturais e seguras para a conservação de alimentos. Cotter et al. (2013) relatou a não toxicidade da nisina e pediocina quando utilizados na biopreservação em alimentos. Porém, a sua aplicação em determinados modelos alimentares requer conhecimento mais aprofundado devido a possível descaracterização dos produtos, perda da atividade e barreiras tecnológicas de produção (Mani-López et al. 2018).

5. Conclusão

Conclui-se que a substância tipo bacteriocina produzida pelo *P. acidilactici* apresentou potencial de ser utilizada na indústria alimentícia, principalmente em alimentos refrigerados, congelados e com pH ácido. A ação antimicrobiana observada mesmo nas menores concentrações testadas vai de acordo com as necessidades das indústrias de alimentos, por substâncias conservadoras eficazes, em baixas concentrações e com custos reduzidos. Além disso, a ação efetiva como bioconservante no suco de laranja contaminado artificialmente com *E. faecium* terá impacto na Saúde Pública devido a possibilidade de se reduzir as doenças transmitidas por alimentos causadas por esse patógeno. Desta forma, é importante ressaltar que as bacteriocinas produzidas pelas BAL são muito promissoras, sendo vantajoso investir em estudos envolvendo a aplicação dessas substâncias como bioconservadores em alimentos.

Referência

Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, Alzohairy MA, Al Karaawi MA, Siddiqui MU (2017) Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation.

- Alpas H, Bozoglu F (2000) The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and Orange juice. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 387 – 392
- Amado IR, Fuciños C, Fajardo P, Pastrana L (2016) Pediocin SA-1: a selective bacteriocin for controlling *Listeria monocytogenes* in maize silages. *J. Dairy Sci* 99: 8070–8080
- André S, Vallaeyts T, Planchon S (2017) Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology* 168: 379–387 Doi:10.1016/j.resmic.2016.10.003
- Aşçı B, Zor SD, Dönmez OA (2016) Development and Validation of HPLC Method for the Simultaneous Determination of Five Food Additives and Caffeine in Soft Drinks. *International Journal of Analytical Chemistry* Doi: 10.1155/2016/2879406
- Backialakshmi S, Meenakshi RN, Saranya A, Jebil MS, Krishna AR, Krishna JS, Suganthi Ramasamy (2015) Biopreservation of Fresh Orange Juice Using Antilisterial Bacteriocins 101 and Antilisterial Bacteriocin 103 Purified from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Food Processing & Technology* Doi: 10.4172/2157-7110.1000479
- Baptista RC, Horita CN, Sant’Ana AS (2019) Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: a review. *Food Research International* Doi:10.1016/j.foodres.2019.108762
- Bédard F, Hammami R, Zirah S *et al.* (2018) Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Sci Rep* Doi:10.1038/s41598-018-27225-3
- Buisman ME, Haijema R, Bloemhof-Ruwaard JM (2017) Discounting and dynamic shelf life to reduce fresh food waste at retailers. *International Journal of Production Economics* Doi:10.1016/j.ijpe.2017.07.016
- Bromberg R, Moreno I, Delboni RR, Cintra HC (2006) Characterisation of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 and the effect of this compound on *Listeria monocytogenes* in beef. *Food Science and Technology* 26: 135-144.
- Carter CA, Chalfant JA, Yavapolkul N, Carroll CL (2016) International commodity trade, transport costs, and product differentiation. *Journal of Commodity Markets* 1: 65–76 Doi:10.1016/j.jcomm.2016.02.002

- Chaddad F. (2016) Agriculture in Southeastern Brazil: Vertically Integrated Agribusiness. The Economics and Organization of Brazilian Agriculture 73 – 110 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801695-4.00004-5>
- Chen CM, Sebranek JG, Dickson JS, Mendonca AF (2004) Combining Pediocin (ALTA 2341) with Postpackaging Thermal Pasteurization for Control of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters. Journal of Food Protection, 67(9), 1855–1865. doi:10.4315/0362-028x-67.9.1855
- Connolly A, Hearty A, Nugent A, McKeivitt A, Boylan E, Flynn A, Gibney M.J (2010) Pattern of intake of food additives associated with hyperactivity in Irish children and teenagers. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 447-56 Doi: 10.1080/19440040903470718.
- Cotter PD, Ross RP (2013) Bacteriocins HC. A viable alternative to antibiotics? Nat Rev Microbiol 11: 95 – 105
- Destro MT, Ribeiro VB (2014) Foodborne Zoonoses. Encyclopedia of Meat Sciences 17–21 Doi:10.1016/b978-0-12-384731-7.00213-0
- Dixit S, Mishra KK, Khanna SK, Das M (2008) Benzoate and synthetic color risk assessment of fast food sauces served at street food joints of lucknow J. Food Technol 3: 183 - 191.
- Gahan CG, O'Driscoll B, Hill C (1996) Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Applied and Environmental microbiology 62: 1693 – 1698
- Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P (2015) Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 56: 1262 – 1274 Doi:10.1080/10408398.2013.763765
- Gören AC, Bilsel G, Şimşek A, Bilsel M, Akçadağ F, Topal K, Ozgen H (2015) HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. Food Chem 9: 175 - 273 Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.094.
- Grande MJ, Lucas R, Valdivia E, Abriouel H, Maqueda M, Omar NB, Martínez-Canamero M, Gálvez A (2005) Stability of Enterocin AS-48 in fruit and Vegetable Juices. Journal of food protection 68: 2085 - 2094
- Gutiérrez-Cortés C, Suarez H, Buitrago G, Nero LA, Todorov SD (2018) Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-culture With *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. Frontiers in microbiology Doi:10.3389/fmicb.2018.02952

- Hermanns G, Funck GD, Schmidt JT, Richards NST (2013) Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient* 11:191 - 196
- Johnson EM, Jung DYG, Jin DYY, Jayabalan DR, Yang DSH, Suh JW (2017) Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Doi:10.1080/10408398.2017.1340870
- Kashani-Haddad H, Nikzad H, Mobaseri S, Hoseini ES (2012) Synergism effect of nisin peptide in reducing chemical preservatives in food industry. *Life Sci. J* 9: 496 – 501
- Khoshnoud MJ, Siavashpour A, Bakhshizadeh M, Rashedinia M (2017) Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory and oxidative stress in brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* Doi: 10.1002/jbt.22022
- Kwon SW, Ju HK, Park JH (2008) Evaluation of headspace-gas chromatography/mass spectrometry for the analysis of benzene in vitamin C drinks; pitfalls of headspace in benzene detection. *Biomedical Chromatography* 22:.900 – 905
- Lennerz BS, Vafai SB, Delaney NF, Clish CB, Deik AA, Pierce KA, Ludwig DS, Mootha VK (2014) Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Mol. Genet. Metab* Doi: 10.1016/j.ymgme.2014.11.010
- Lok KY, Chan RS, Lee VW, Leung PW, Leung C, Leung J, Woo J (2013) Food additives and behavior in 8-to 9 –year-old children in Hong Kong: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Dev. Behav. Pediatr* 34: 642 - 650 Doi: 10.1097/DBP.0000000000000005
- Mani-López E, Palou E, López-Malo A (2018) Biopreservativos as Agents to Prevent Food Spoilage, *Microbial Contamination and Food Degradation* 235 – 270 Doi: 10.1016/b978-0-12-811515-2.00008-1
- Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley RCW (1972) Chapter VII methods for studying bacteriocins. In: *Methods in Microbiology*. Academic Press 315 – 422
- Millan-Sango D, Valdramidis VP (2018) Quantitative Assessment of the Shelf Life of Fruit Juices. *Fruit Juices* 557 – 569 Doi:10.1016/b978-0-12-802230-6.00028-x
- Minor T, Parrett M (2017) The economic impact of the Food and Drug Administration’s Final Juice HACCP Rule. *Food Policy* 68: 206 - 213 Doi:10.1016/j.foodpol.2017.02.008

- Mohammad SA, Begum A, Uddin MdF, Ahmed S (2016) Biopreservative effect of bacteriocin in fruit juice preservation. *Asian-Australasian Journal of Bioscience and Biotechnology* 1: 435 – 440
- Narsaiah K, Jha SN, Wilson RA, Mandge HM, Manikantan MR, Malik RK, Vij S (2013) Pediocin loaded nanoliposomes and hybrid alginate-nanoliposome delivery systems for slow release of pediocin. *Bionanoscience* 3:37 – 42
- Nielsen JW, Dickson JS, Crouse JD (1990) Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2142-2145
- Noorafshan A, Erfanizadeh M, Karbalay-Doust S (2014) Sodium benzoate, a food preservative, induces anxiety and motor impairment in rats. *Neurosciences* 19: 24 – 8
- Ogaki MB, Furlaneto MC, Maia LF (2015) Aspectos gerais das bacteriocinas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 18, n. 4, p. 267-276
- Oliveira JC, Setti-Perdigão P, Siqueira KAG, Santos AC, Miguel MAL (2006) Características microbiológicas do suco de laranja in natura. *Ciênc. Tecnol. Aliment Campinas* 26: 241-245
- Oyewole OI, Dere FA, Okoro OE (2011) Sodium Benzoate Mediated Hepatorenal Toxicity in Wistar Rat: Modulatory Effects of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf. *European Journal of Medicinal Plants* 2: 11 – 18 Doi: 10.9734/EJMP/2012/619.
- Paduro C, Montero DA, Chamorro N, Carreño L, Vidal M, Vidal R (2019) Ten years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008–2017. *Food Microbiology* Doi:10.1016/j.fm.2019.103280
- Pal V, Pal A, Patil M, Ramana KV, Jeevaratnam K (2010). Isolation, Biochemical properties and application of bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* isolates. *Journal of Food Processing and Preservation* 34 1064 – 1079. Doi: 10.1111/j.1745-4549.2009.00438.x
- Papagianni M, Anastasiadou S (2009) Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Factories* 8: 1 – 16
- Pei J, Yue T, Jin W (2016) Application of bacteriocin RC20975 in apple juice. *Food Science and Technology International* 23: 166 – 173 Doi: 10.1177/1082013216668691
- Ponce O, Oliveira R, Cesar T (2019) Orange juice associated with a balanced diet mitigated risk factors of metabolic syndrome: A randomized controlled trial. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism* Doi:10.1016/j.jnim.2019.100101

- Pongsavee M (2015) Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes. *Biomed Res Int* Doi: 10.1155/2015/103512.
- Porto MCW et al. (2017) *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 3, p. 365-374.
- Pratish A, Gupta A, Kumar A, Vyas (2012) Application of purified bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* AP2 as food biopreservative in acidic foods. *Ann Food Sci Technol* 13: 83 – 87
- Sanchez-Moreno C, Plaza L, De Ancos B, Cano MP (2003) Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J Sci Food Agric* 83:430 – 439
- Sidek NLM, Halim M, Tan JS, Abbasiliasi S, Mustafa S, Ariff AB (2018) Stability of Bacteriocin-Like Inhibitory Substance (BLIS) Produced by *Pediococcus acidilactici* kp10 at Different Extreme Conditions. *BioMed Research International* Doi:10.1155/2018/5973484
- Skariyachan S, Govindarajan S (2019) Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in comparison with chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology* 291: 189 – 196 Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.002
- Schlyter JH, Glass KA, Loffelholz J, Degnan AJ, Luchansky JB (1993) The effects of diacetate with nitrite, lactate or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 19, p. 271-281.
- Schulz D, Pereira MA, Bonelli RR, Nunes MM, Batista CRV (2014) Bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 5: 1-10
- Taylor BJ, Quinn AR, Kataoka AI (2019) *Listeria monocytogenes* in Low-Moisture Foods and Ingredients. *Food Control* Doi:10.1016/j.foodcont.2019.04.011
- Tenea GN, Barrigas A (2018) The efficacy of bacteriocin-containing cell-free supernatant from *Lactobacillus plantarum* Cys5-4 to control pathogenic bacteria growth in artisanal beverages. *International Food Research Journal* 25: 2131 – 2137.
- Tsay HJ, Wang YH, Chen WL, Huang MY, Chen YH (2007) Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol* Doi:10.1016/j.ntt.2007.05.001
- Vitola HRS, Gandra EA, Frazzon APG, Dannenberg GS, Motta AS (2018) Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango.

- Revista Brasileira de Biociências v.16: 21 - 27. <Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3990>>
- Yang W, Wu Z, Huang ZY, Miao X (2017) Preservation of orange juice using propolis. *Journal of Food Science and Technology* 54: 3375 - 3383 Doi: 10.1007/s13197-017-2754-x
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology, Review Article, Front. Microbiol. Lausanne* 5: 1 - 10
- Wang J, Li L, Zhao X, Zhou Z (2015) Partial characteristics and antimicrobial mode of pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* PA003. *Annals of Microbiology* 65: 1753 – 1762 Doi:10.1007/s13213-014-1014-9
- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety (2000) Benzoic acid and sodium benzoate. World Health Organization <Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42310>>
- Zhang L (2018) The use of biological agents in processing. *Packaging for Nonthermal Processing of Food* 83–94 Doi:10.1002/9781119126881.ch5