

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA BORGES DE OLIVEIRA

EFEITO DOS MATERIAIS DE PAREDE SOBRE A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DA NISINA ENCAPSULADA EM SPRAY-DRYER EM RELAÇÃO AO
Staphylococcus aureus

CURITIBA

2015

CAROLINA BORGES DE OLIVEIRA

EFEITO DOS MATERIAIS DE PAREDE SOBRE A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DA NISINA ENCAPSULADA EM SPRAY-DRYER EM RELAÇÃO AO
Staphylococcus aureus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Masson

CURITIBA

2015

O48e Oliveira, Carolina Borges de
 Efeito dos materiais de parede sobre a atividade antimicrobiana da nisina
 encapsulada em spray-dryer em relação ao *Staphylococcus aureus*/ Carolina
 Borges de Oliveira. – Curitiba, 2015.
 83 f. : il. color. ; 30 cm.

 Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
 Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

 Orientador: Maria Lúcia Masson .
 Bibliografia: p. 62-71.

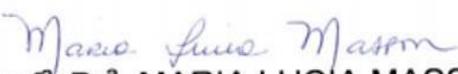
 1. Bacteriocinas. 2. Polissacarídeos. 3. Polímeros. 4. Secagem em spray.
 I. Universidade Federal do Paraná. II. Masson, Maria Lúcia. III. Título.

CDD: 664.0287

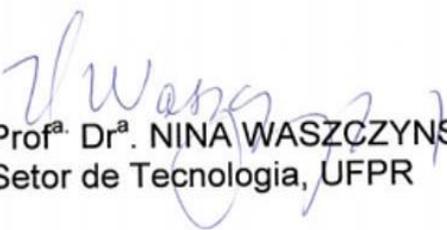
CAROLINA BORGES DE OLIVEIRA

**EFEITO DOS MATERIAIS DE PAREDE SOBRE A ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA NISINA ENCAPSULADA EM *SPRAY-
DRYER* EM RELAÇÃO AO *Staphylococcus Aureus***

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora: 
Prof^a Dr^a. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR


Dr^a. LUCIANA DE SOUZA NEVES ELLENDERSEN
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof^a Dr^a. NINA WASZCZYŃSKYJ
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 28 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meu porto seguro e pilar de minha educação, principalmente a meu irmão que conviveu diretamente diariamente neste período.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Lúcia Masson, pela orientação, dedicação e apoio durante a realização deste trabalho.

A banca examinadora Profa. Dra. Nina Waszczyński e Profa. Dra. Luciana Neves Ellendersen por suas correções e sugestões, contribuindo imensamente para a conclusão deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho e a Capes e Fundação Araucária pela bolsa de estudos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho.

Ao laboratório de Polímeros, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, especialmente à Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski que, gentilmente, cedeu o uso do Spray Dryer.

A todos meus amigos e familiares que, mesmo distantes, sempre me apoiaram e incentivaram.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A utilização da nisina como agente antimicrobiano é permitida na indústria de alimentos em diversos países, inclusive no Brasil onde sua utilização em queijos é regulamentada. A utilização da nisina em outros alimentos apresenta alguns problemas como a redução da sua atividade antimicrobiana quando em contato com os componentes destes. Uma das formas de prevenir a redução da atividade antimicrobiana da nisina é associá-la a agentes encapsulantes que podem prevenir ou retardar a interação desta com componentes dos alimentos, portanto preservando o potencial antimicrobiano. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos agentes encapsulantes maltodextrina e carboximetilcelulose, sobre a atividade antimicrobiana da nisina contra o *Staphylococcus aureus*, em diferentes concentrações e diferentes combinações entre eles, resultando em 6 amostras. As amostras obtidas pelo método de secagem por aspersão apresentaram rendimento entre 44,63 e 64,59%, sendo os melhores valores obtidos quando foi utilizado a maltodextrina como agente encapsulante único ou então associado à carboximetilcelulose, e a atividade de água de todas as amostras ficou abaixo de 0,37, refletindo uma baixa disponibilidade de água para a ação de micro-organismos ou reações químicas. A maior atividade antimicrobiana, quando comparada com a nisina comercial, foi obtida com a utilização de carboximetilcelulose como único agente encapsulante na razão de 1/0,80 de nisina / agente encapsulante, resultando em 82,64% desta atividade, e esta foi a amostra que apresentou menor rendimento. Em conclusão, diante dos resultados obtidos que indicam que o tipo e a quantidade de agente encapsulante influenciam no rendimento e na atividade antimicrobiana da nisina; a melhor condição para o encapsulamento foi a empregada na amostra D, onde foi utilizado a razão de nisina / agente encapsulante de 1/50, sendo o agente encapsulante uma mistura da maltodextrina com a carboximetilcelulose na razão de 49 e 1, respectivamente, e que apresentou rendimento de 63,89%, atividade antimicrobiana de 65,38%, atividade de água de 0,281 e estruturas capsuladas nas micrografias.

Palavras-chave: Bacteriocina. Maltodextrina. Carboximetilcelulose. Secagem por aspersão.

ABSTRACT

The use of nisin as an antimicrobial agent is permitted in the food industry in several countries, including Brazil where its use in cheese is regulated. The use of nisin in other foods presents some problems as the reduction of its antimicrobial activity when in contact with these components. One way to prevent the reduction of antimicrobial activity of nisin is associate it with encapsulating agents that can prevent or delay this interaction with food components, so preserving the antimicrobial potential. The aim of this study was to evaluate the influence of encapsulating agents maltodextrin and carboxymethylcellulose on the antimicrobial activity of nisin against *Staphylococcus aureus* in different concentrations and different combinations between them, resulting in six samples. The samples obtained by the spray drying method showed performance between 44.63 and 64.59%, with the best values obtained when the maltodextrin was used as a single encapsulating agent or then associated with carboxymethylcellulose, and the water activity of all samples it was below 0.37, reflecting a low water availability for the action of micro-organisms or chemical reactions. The greatest antimicrobial activity, compared with the commercial nisin, was obtained by using carboxymethylcellulose as a only encapsulating agent in a ratio of 1/0.80 of nisin/encapsulating agent, resulting in 82.64% this activity, and this was sample had lower yield. In conclusion, given the results that indicate the type and amount of encapsulating agent influence on yield and antimicrobial activity of nisin; the best condition for the encapsulation was employed in sample D, which was used ratio nisin/encapsulating agent of 1/50, with the encapsulating agent being a mixture of maltodextrin with carboxymethylcellulose in the ratio of 49 and 1, respectively, and showed yield of 63.89%, antimicrobial activity of 65.38%, water activity of 0.281 and capsulated structures in micrographs.

Keywords: Bacteriocin. Maltodextrin. Carboxymethylcellulose. Spray drying.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DAS BACTERIOCINAS: A - AÇÃO NA MEMBRANA CELULAR, CARACTERÍSTICO DE BACTERIOCINAS INIBIDORAS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS; B – INTERFERÊNCIA NO DNA, RNA E METABOLISMO DE PROTEÍNAS, CARACTERÍSTICO DE BACTERIOCINAS INIBIDORAS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	18
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DA NISINA A, PRODUZIDA POR LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS ATCC 11454, SENDO AS LIGAÇÕES: ALA-S-ALA REPRESENTAÇÃO DE LANTIONINA, ABU-S-ALA REPRESENTAÇÃO DE B-METIL-LANTIONINA, DHA REPRESENTA DEHIDROALANINA E DHB REPRESENTA DEHIDROBUTIRINA.....	25
FIGURA 3 - ESQUEMA DE UM EQUIPAMENTO SPRAY DRYER.....	33
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MALTODEXTRINA.....	37
FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FLUXO DA PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA SECAGEM POR ASPERSÃO	39
FIGURA 6 - SECADOR POR ASPERSÃO (SPRAY DRYER), MODELO MSD 1.0 DA LABMAQ DO BRASIL.....	41
FIGURA 7 - MICROGRAFIA DA NISINA COMERCIAL AUMENTADA 15000 VEZES.....	51
FIGURA 8 - MICROGRAFIA DA NISINA COMERCIAL APÓS SECAGEM POR ASPERSÃO, SEM AGENTE ENCAPSULANTE, AUMENTADA 5000 VEZES (A) E 15000 VEZES.....	52
FIGURA 9 - MICROGRAFIA DO AGENTE ENCAPSULANTE CARBOXIMETILCELULOSE AUMENTADO 5000 VEZES.....	52
FIGURA 10 - MICROGRAFIA DO AGENTE ENCAPSULANTE MALTODEXTRINA DE 15-20 AUMENTADO 5000 VEZES.....	53
FIGURA 11 - MICROGRAFIAS DE TODAS AS AMOSTRAS APÓS SECAGEM POR ASPERSÃO, COM AUMENTO DE 5000 VEZES.....	55
FIGURA 12 - MICROGRAFIA DA AMOSTRA E (1) DE NISINA COM CMC (RAZÃO DE DE 1 / 0,80 DE NISINA E CMC), COM AUMENTO DE 15000 VEZES E (2) MICROGRAFIA DE XIAO (2011A) DE SECAGEM POR ASPERSÃO DE NISINA UTILIZANDO COMO ENCAPSULANTE A ZEÍNA.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS.....	15
TABELA 2 - APLICAÇÃO DE BACTERIOCINAS NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	21
TABELA 3 - RELAÇÃO DE NISINA COMERCIAL E AGENTE ENCAPSULANTE UTILIZADO EM CADA AMOSTRA.....	40
TABELA 4 - RENDIMENTO (η) E DA ATIVIDADE DE ÁGUA (Aa) DAS AMOSTRAS SECAS POR ASPERSÃO.....	46
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DA NISINA, EM %, QUANDO COMPARADA COM MESMA QUANTIDADE DE MISTURA DE NISINA COMERCIAL UTILIZADA COMO PADRÃO.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 BACTERIOCINAS.....	11
3.2 BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	13
3.2.1 Classificação.....	14
3.2.1.1 Classe I (Lantibióticos)	16
3.2.1.2 Classe II, III, IV e V.....	17
3.3 MECANISMOS DE AÇÃO.....	17
3.3.1 Mecanismo associado à membrana celular.....	18
3.3.2 Inibição do gene de expressão e produção de proteína.....	19
3.4 UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	19
3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A EFICIÊNCIA DAS BACTERIOCINAS...	21
3.6 NISINA.....	24
3.7 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	27
3.8 MICROENCAPSULAÇÃO.....	30
3.8.1 Secagem por aspersão no Spray-Dryer.....	32
3.9 AGENTES ENCAPSULANTES.....	35
3.9.1 Carboximetilcelulose (CMC).....	36
3.9.2 Maltodextrina.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAL.....	39
4.2 MÉTODOS.....	39
4.2.1 Preparação da solução com agente encapsulante.....	40
4.2.2 Secagem por aspersão em Spray-dryer.....	40
4.2.3 Análises do produto após secagem por aspersão.....	42
4.2.3.1 Rendimento do processo.....	42
4.2.3.2 Determinação da atividade de água.....	42
4.2.3.3 Determinação da atividade da nisina.....	42
4.2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
4.2.4 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 RENDIMENTO DA ENCAPSULAÇÃO E ATIVIDADE DE ÁGUA.....	46
5.2 TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA.....	47
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	51
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes tendências mundiais na área dos alimentos tem sido a busca do consumidor por produtos minimamente processados, com aparência fresca, de rápido e fácil preparo, que sejam livres ou de reduzido conteúdo de conservantes químicos, mas que continue com sua qualidade garantida. A segurança alimentar precisa ser aplicada em toda a indústria, sendo uma alternativa a biopreservação, ou seja, o emprego de micro-organismo e/ou seus metabólitos na prevenção da contaminação e proliferação de patógenos, impedindo a deterioração dos alimentos e possível doença causada por eles, estendendo a vida útil do alimento (CASTRO et al., 2011; GÁLVEZ et al., 2007; COTTER et al., 2005; CHEN; HOOVER, 2003).

Diversos micro-organismos patógenos são investigados e monitorados na indústria de alimentos por serem causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), dentre estes os estafilococos são amplamente estudados, especificamente o *Staphylococcus aureus*. Esta cepa é produtora de enterotoxina, sendo a causa de diversos tipos de infecções, sendo a principal espécie associada a casos de intoxicação alimentar relatados em todo o mundo, e seu controle deve ser rigoroso já que é encontrado, como integrante da população microbiana natural, na pele, narinas e pelos de animais de sangue quente, incluindo o homem. O tratamento ao longo dos anos com antibióticos tem possibilitado o surgimento de cepas resistentes, e novas formas de controle devem ser investigadas (CHAPAVAL et al., 2009; SANTOS et al., 2007).

Devido as suas aplicações como bioconservadores as bacteriocinas, moléculas proteicas que tem ação inibidora sobre micro-organismos, tem sido estudadas e centenas de bacteriocinas derivadas de bactérias lácticas já foram identificadas, mas essas substâncias são produzidas por diversos micro-organismos diferentes (FURTADO, 2014).

Uma das bacteriocinas mais estudadas e utilizadas na indústria de alimentos tem sido a nisina, que é considerada segura e não tóxica, e sua Dose Letal 50% (DL50) é similar à do cloreto de sódio (NaCl). Tem seu uso permitido em diversos países, com diferentes finalidades e limites, e no Brasil seu uso é permitido com limite de 12,5 mg.kg⁻¹ de produto final para todos os tipos de queijos.

A atividade antimicrobiana das bacteriocinas, incluindo a nisina, é efetiva quando quantificada em meio de cultivo, mas quando ocorre sua adição em meios complexos a sua interação com os demais elementos do ambiente onde se encontra resulta em um decréscimo da eficiência ou então sua ineficiência. Uma alternativa para este fator é a encapsulação desta proteína, propiciando sua utilização em diferentes processos, já que haverá uma barreira entre o meio externo e a nisina que poderá garantir a atividade desta proteína.

Faz-se necessário então uma otimização desses processos de encapsulação, dentre os quais a utilização do Secador por Aspersão tem sido estudada e os resultados obtidos têm demonstrado eficiência na viabilidade do material encapsulado, sendo muitas vezes mais eficiente em situações específicas, promovendo a liberação controlada, além de ser um método rápido, de baixo custo e reprodutível.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do material encapsulante na atividade antimicrobiana da nisina sobre *Staphylococcus aureus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da interação e concentração dos agentes encapsulantes sobre a atividade antimicrobiana da nisina.
- Determinar a atividade antagonista da nisina em relação ao microrganismo *Staphylococcus aureus* antes e após a secagem por aspersão.
- Verificar diferenciação morfológica da nisina comercial e da nisina após a secagem por aspersão, juntamente com agentes encapsulantes, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BACTERIOCINAS

As bacteriocinas tem sido definidas como produtos bacterianos, pequenos, peptídeos estáveis termicamente que tem atividade contra outras bactérias e tem um mecanismo de imunidade específica no micro-organismo produtor. As bacteriocinas que, provavelmente, têm o potencial mais imediato em aplicações de alimentos serão aquelas produzidas por bactérias do ácido láctico (BAL) de grau alimentício, por serem cepas mais propensas a obterem aprovação regulamentar de utilização, devido à sua origem, e por serem facilmente introduzidas em alimentos fermentados. Bacteriocinas que são produzidos pela BAL podem ser de largo ou estreito espectro, mas, em geral, a atividade está direcionada contra as espécies Gram-positivas. A atividade contra bactérias Gram-negativas tem sido demonstrada, mas apenas em situações em que a integridade da membrana externa foi comprometida (COTTER et al., 2005).

A primeira descrição de inibição mediada por bacteriocina foi relatada a quase 90 anos, quando foi descoberto antagonismo entre cepas de *Escherichia coli* (GRATIA¹, 1925 apud COTTER et al., 2005), e por este motivo originalmente eram chamadas de “colinas”.

Embora o uso deliberado das bacteriocinas como conservantes foi proposto apenas em 1951 é provável que a humanidade tem se beneficiado da produção casual de bacteriocinas em alimentos, pelo fato de cepas fermentadoras encontradas em queijos e outros alimentos fermentados produzem substâncias antimicrobianas. A utilização de BAL na produção de queijos para converter lactose em ácido láctico, também produzindo bacteriocinas, que podem influenciar na composição da complexa microflora do queijo e potencialmente inibir a deterioração acidental ou através de bactéria patogênica (COTTER et al., 2005).

Em 1928 os pesquisadores Rogers e Whittier observaram que algumas cepas lactocócica (lactococcal) podiam ter um efeito inibitório sobre o crescimento de outras

¹ GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie**, n.93, p. 1040–1041, 1925.

BAL. Esta proteína antimicrobiana foi descrita por Whitehead em 1933 na Nova Zelândia e em 1947 a bacteriocina responsável por esta inibição foi nomeada por Mattick e Hirsch como Nisina ou grupo N de substância inibitória (COTTER et al., 2005; CHEN; HOOVER, 2003).

A nisina foi comercializada pela primeira vez na Inglaterra em 1953 e desde então tem sido aprovada em inúmeros países, sendo que em 2005 já eram 48 países, incluindo o Brasil. A nisina foi avaliada como segura para uso em alimentos pela junta da Organização de Alimento e Agricultura e o comitê especialista em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (JECFA) no ano de 1969. Já em 1983 esta bacteriocina foi adicionada na lista de aditivos alimentares europeus (EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY², 1983 apud COTTER et al., 2005) e em 1988 foi aprovado pela FDA, agência reguladora de drogas e alimentos dos Estados Unidos da América, para uso na pasteurização e no processamento de queijo (COTTER et al., 2005). No Brasil, em 1996, foi autorizado seu emprego em queijos fundidos, preparados à base de queijos fundidos, queijos pasteurizados e requeijão, na concentração máxima até 12,5 mg.kg⁻¹ pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1996).

Quando procura-se por uma bacteriocina com uma aplicação alimentar em mente, existem vários critérios importantes (HOLZAPFEL et al., 1995; COTTER et al., 2005):

- A cepa produtora deve preferencialmente ter status “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS - Generally recognized as safe);
- A bacteriocina deve apresentar um amplo espectro de inibição que inclua patógenos ou que tenha atividade contra um patógeno específico.
- A bacteriocina deve ser estável termicamente;
- Não pode estar associada a riscos à saúde;
- Sua adição nos produtos deve proporcionar efeitos benéficos, tais como a melhoria da segurança, qualidade e sabor;
- Deve apresentar alta atividade específica.

A atividade antimicrobiana das bacteriocinas em alimentos é afetada pelo tipo, nível e quantidade do micro-organismo alvo, condição de aplicação, interação ou

² EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY. Commission Directive. **Official Journal of the European Union**, 255, p. 1–6 1983.

inativação por componentes alimentares e pelo pH e temperatura do produto (NAIDU, 2000³ apud CASTRO et al., 2011).

3.2 BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) são micro-organismos Gram-positivos, não patogênicos, não esporuladas, catalase negativas, microaerófilos, ácido tolerantes e têm como principal produto de fermentação o ácido lático (KLANDER, 1983; PFEILER; KLAENHAMMER, 2007).

Essas bactérias são consideradas como GRAS e, quando ingeridas em grandes quantidades, algumas espécies têm a capacidade de resistir ao trato gastrointestinal e sobreviver no intestino do hospedeiro, onde são capazes de exercer atividades probióticas (DE MARTINIS et.al., 2003).

O grupo das BAL compõem-se de doze gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lastosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pedicoccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Wessella* e *Lactobacillus* (JAY, 2000).

Estas bactérias acidificam os alimentos, impedindo o desenvolvimento de micro-organismos sensíveis ao pH ácido. A produção em larga escala de alimentos e bebidas por fermentação são dependentes quase inteiramente do uso de culturas iniciadoras definidas as quais têm substituído as misturas de linhagens tradicionais usadas na produção desses alimentos (ROSS et al., 2002).

Uma das principais funções das bactérias ácido lácticas nos alimentos é a proteção alimentar, isso acontece porque essas bactérias acidificam os produtos alimentares, deixando o pH próximo de 4, impedindo a multiplicação de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, pela produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático (DE MARTINIS et.al., 2003).

Bacteriocinas de BAL são compostos de natureza proteica que podem apresentar atividade antimicrobiana dirigida a patógenos de importância alimentar e microbiota deteriorante relacionada o que lhes confere um grande potencial de uso

³ Naidu, A. S. **Natural Food Antimicrobial Systems**, Boca Raton, USA: CRC Press LLC. p. 1-16, 2000.

em sistemas baseados na conservação biológica de alimentos (TAGG et al., 1976; DE MARTINIS et al., 2003). Devido as suas aplicações como bioconservadores as bacteriocinas têm sido estudadas e centenas de bacteriocinas derivadas de bactérias láticas já foram identificadas (FURTADO, 2014).

É seguro dizer que as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas compõem o grupo mais investigado de peptídeos antibacterianos, dado o seu potencial para aplicações comerciais em alimentos e outros produtos. Muito desta popularidade do grupo é devido a nisina ter uma longa história de uso seguro e sua efetividade documentada contra importantes patógenos de origem alimentar Gram-positivas e outros agentes de deterioração (CHEN; HOOVER, 2003).

3.2.1 Classificação

A classificação das bacteriocinas é muito divergente e tem sofrido algumas alterações ao longo dos anos. Inicialmente as bacteriocinas eram distribuídas em 4 classes distintas, sendo que, de modo geral, a classe I, ou lantibióticos, representada pela nisina, era constituída por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (<5 kDa), diferenciados dos demais pela presença de lantionina e derivados; a classe II era composta por pequenos peptídeos (<10 kDa) termoestáveis divididos em três subclasses: IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B); a classe III era representada por peptídeos termolábeis de alto peso molecular (>30 kDa) como helveticina J; na classe IV encontravam-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídeo em sua estrutura (KLAENHAMMER⁴, 1993 apud NASCIMENTO et al, 2008).

Em 2005 foi proposta uma nova classificação, a qual subdivide as bacteriocinas em duas categorias distintas: os lantibióticos (classe I) contendo lantionina e os não lantibióticos (classe II), enquanto os peptídeos de alto peso molecular termolábeis, formalmente componentes da classe III, seriam separadamente designados de 'bacteriolisinas'. Os autores sugeriram ainda, que a classe IV não seria incluída na nova proposta, já que essa classe era reservada a bacteriocinas que requerem grupos

⁴ KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, v. 12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

não proteicos para a atividade, mas nenhum membro desta classe havia sido convincentemente demonstrado (COTTER et al., 2005). Um resumo dessa classificação está apresentado na tabela 1.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS.

Classificação	Sugestões	Exemplos
Classe I		
Bacteriocinas contendo lantionina / Lantibióticos	Inclui tanto lantibióticos simples e de dois peptídeos	Peptídeo simples: nisina, mersacidina, lacticina 481; Peptídeo duplo: lacticina 3147, citolisina.
Classe II		
Bacteriocinas que não contém lantionina	Classe heterogênea de pequenos peptídeos; inclui pediocina (subclasse A bacteriocinas), de dois peptídeos (subclasse B bacteriocinas), cíclica (subclasse C; anteriormente classe V), peptídeos lineares simples não contém pediocina (subclasse D)	Classe IIa: pediocina PA1, leucocina A; Classe IIb: lactacina F; Classe IIc: enterocina AS48, reuterina 6; Classe IId: lactococcina A, divergicina A.
Bacteriolisinas		
Proteínas líticas bacteriocinas *	Proteínas grandes, termolábeis, frequentemente hidrolisam mureína	Lisostafina, enterolisina A.

* Sugeriu que estes não são considerados bacteriocinas.

FONTE: COTTER et al. (2005)

Essa nova classificação proposta por Cotter e colaboradores em 2005 foi reconhecida pela área científica, mas acabou sendo descrita como “radical” por pesquisadores como Heng, Wescombe, Burton, Jack e Tagg que em 2007 analisaram esta classificação, fizeram suas considerações e propuseram outra divisão já que as pesquisas no campo das bacteriocinas de bactérias do ácido láctico estão progredindo muito rapidamente e não é fácil formular um sistema de classificação que seja duradouro, que envolva todas as bacteriocinas existentes e que possa também classificar adequadamente novas bacteriocinas que possam ser descobertas (HENG et al., 2007).

Desta maneira as bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram positivas dividem-se em quatro classes, de acordo com sua função biológica e estrutura química: Classe I (peptídeos lantibióticos), Classe II (peptídeos não-lantibióticos de peso molecular inferior a 10kDa), Classe III (peptídeos não-lantibióticos de peso molecular superior a 10 kDa) e Classe IV (proteínas cíclicas) (HENG et al., 2007).

3.2.1.1 Classe I (Lantibióticos)

Os lantibióticos (antibióticos que contém lantionina) são pequenos peptídeos (19 a 38 resíduos de aminoácidos) termoestáveis que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina, resultante da associação de duas alaninas ligadas por uma ponte dissulfeto, ou β -metilantionina, resultante de um ácido aminobutírico ligado a uma alanina por uma ponte dissulfeto (JARVIS⁵ et al., 1968 apud NASCIMENTO et al, 2008; COTTER et al., 2005) e são ribossomicamente produzidos (BIERBAUM; SAHL, 2009).

O primeiro e mais proeminente lantibiótico é a nisina que foi isolada por Mattick e Hirsch em 1947 de uma cepa de *Lactococcus lactis*. O segundo lantibiótico a ser descrito foi a subtilina. Já a cinamicina foi descoberta em 1952 por Benedict e colaboradores. Na década de 1980 foram descobertas a Pep5 em 1985 por Sahl e colaboradores, a epidermina em 1986 por Allgaier e colaboradores e em 1988 os pesquisadores Kellner e colaboradores descreveram a galidermina (BIERBAUM; SAHL, 2009).

Podem ser divididos em três subgrupos (subclasse Ia, Ib e Ic) conforme sua estrutura e modo de ação. Na subclasse **Ia** estão agrupados peptídeos mais compridos, flexíveis e carregados positivamente que atuam na membrana plasmática da bactéria alvo através da formação de poros, prejudicando a célula pelo efluxo de metabólitos, íons e/ou diminuição da concentração intracelular de adenosina tri-fosfato (ATP). Já a subclasse **Ib** tem como característica um grupo formado por peptídeos esféricos, rígidos e neutros ou carregados negativamente que atuam afetando as reações enzimáticas essenciais de bactérias sensíveis. Mas há casos em que a bacteriocina possui ambos mecanismos de ação, como é o caso da nisina. E por último a subclasse **Ic** são lantibióticos multicomponentes, onde estão agrupados peptídeos duplos modificados que tem individualmente pouca ou nenhuma atividade, mas quando agem sinergicamente apresentam forte ação antibacteriana, como é o caso a lacticina 3147 produzida pelo *Lactococcus lactis* DP3147 (HENG et al., 2007).

⁵ JARVIS, B.; JEFFCOAT, J.; CHEESEMAN, G. C. Molecular weight distribution of nisin. **Biochemical Biophysiology Acta**, v. 168, p. 153-155, 1968.

3.2.1.2 Classe II, III, IV e V

A classe II é composta por pequenos peptídeos (<10 kDa), termoestáveis, e não estão sujeitos a modificações (não modificados ou cíclicos) (COTTER et al, 2005; HENG et al., 2007). Estes apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização e permeabilizando a membrana, com consequente morte celular (COTTER et al, 2005; DRIDER et al., 2006).

Já a classe III é composta por grandes peptídeos (>10 kDa) e esta classe também é subdividida em subclasses, **IIIa** e **IIIb** (HENG et al., 2007).

E, por último, a classe IV é composta por bacteriocinas cíclicas. São peptídeos circulares, sintetizados ribossomicamente e que são processados pós-tradução de tal modo que o primeiro e último aminoácido do peptídeo maduro estão ligados por uma ligação covalente, e o exemplar mais estudado desta classe é a enterocina AS-48 (MAQUEDA et al., 2004).

3.3 MECANISMOS DE AÇÃO

Os mecanismos de ação das bacteriocinas podem ser divididos entre os que agem na membrana celular e aqueles que são ativos, principalmente, no interior da célula, que afetam diretamente a expressão de genes e a produção das proteínas (COTTER et al., 2013). Estes mecanismos de ação estão demonstrados, de forma simplificada, na figura 1.

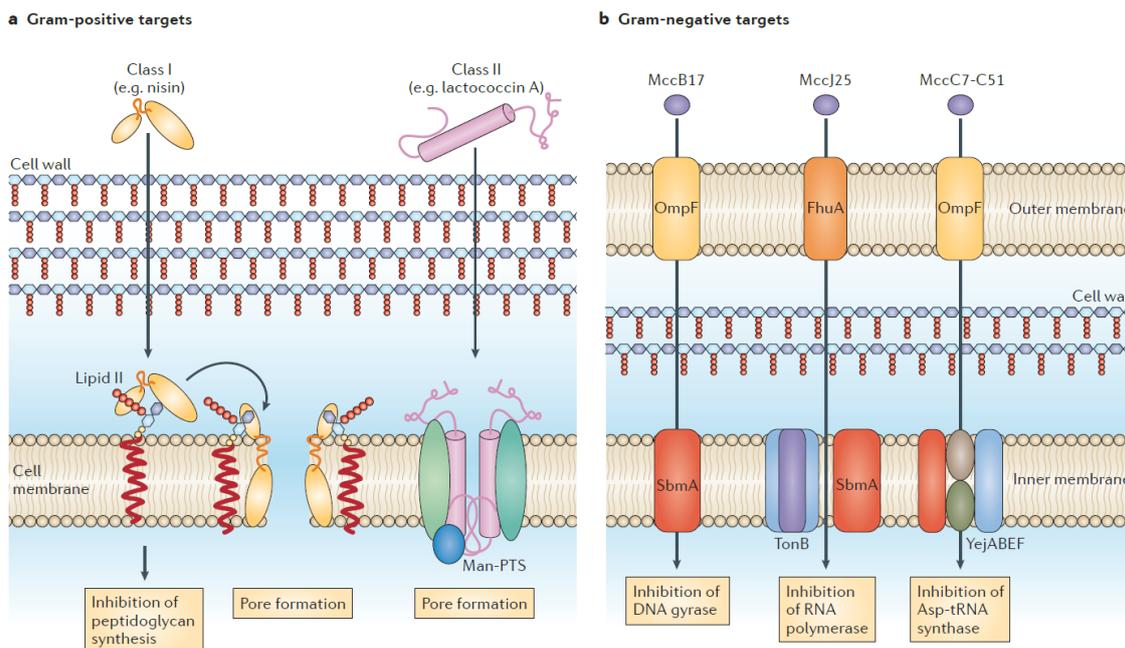


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DAS BACTERIOCINAS: **A** - AÇÃO NA MEMBRANA CELULAR, CARACTERÍSTICO DE BACTERIOCINAS INIBIDORAS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS; **B** - INTERFERÊNCIA NO DNA, RNA E METABOLISMO DE PROTEÍNAS, CARACTERÍSTICO DE BACTERIOCINAS INIBIDORAS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.

FONTE: COTTER et al. (2013).

3.3.1 Mecanismo associado à membrana celular

Vários lantibióticos, incluindo a nisina, além de algumas bacteriocinas classe II, tem como alvo os lipídeos II presentes na membrana celular das bactérias que irão atacar (BIERBAUM; SAHL, 2009). Segundo Piper⁶ et al. (2009 apud COTTER et al., 2013), o lipídeo II é o principal transportador de subunidades de peptidoglicanos do citoplasma para a parede celular e também são atacados pelo antibiótico vancomicina, mas é importante ressaltar que o sítio de ligação da nisina e de outras bacteriocinas é distinto do sítio de ligação da vancomicina, fazendo então com que a bacteriocina seja eficiente também nos agentes patógenos Gram-positivos que são resistentes à vancomicina. Alguns lantibióticos tem seu único mecanismo de ação a inibição da síntese de peptidoglicanos, através do lipídeo II. Já outros lantibióticos utilizam o lipídeo II como um encaixe para facilitar a formação de poros na membrana da célula

⁶ PIPER, C.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Discovery of medically significant lantibiotics. *Current Drug Discovery Technologies*, v. 6, p. 1–18, 2009.

atacada, que resultará em uma perda de potencial da membrana e, por fim, a morte celular (BIERBAUM; SAHL, 2009).

Outras bacteriocinas também danificam ou causam a morte celular através da formação de poros na membrana celular, mas agem ligando-se com células diferentes e seus mecanismos de ação por muitas vezes não está completamente esclarecido (COTTER et al., 2013).

3.3.2 Inibição do gene de expressão e produção de proteína

As bacteriocinas podem matar as células alvo interferindo no DNA, RNA e no metabolismo das proteínas, sendo diversos os tipos de ação. Por exemplo, microcina B17 (MccB17) inibe a DNA-girase interferindo assim na replicação do DNA (PARKS et al., 2007); a MccJ25 inibe a RNA polimerase (VINCENT; MORENO⁷, 2009 apud COTTER et al., 2013); e a MccC7-C51 inibe aspartil-tRNA sintetase, bloqueando assim a síntese de mRNA (METLITSKAYA et al., 2006).

3.4 UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A indústria de alimentos enfrenta um grande desafio no cenário atual onde a legislação e os consumidores estão cada vez mais exigentes, onde os alimentos necessitam ser seguros e com uma longa vida de prateleira, mas ao mesmo tempo expressam uma preferência por produtos minimamente processados que não contenham conservantes químicos. Neste contexto as bacteriocinas são uma opção interessante e que pode ajudar na solução deste dilema.

No entanto somente a nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, e a pediocina PA1/AcH, produzida por *Pediococcus acidilactici*, são ingredientes comercialmente utilizados em alimentos como bioconservantes (COTTER et al., 2005; GÁLVEZ et al., 2007). Diversos países permitem o uso da nisina em produtos com leite e derivados

⁷ VINCENT, P. A.; MORERO, R. D. The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 538–549, 2009.

lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002⁸ apud FURTADO, 2010).

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, sendo que seu sucesso está ligado a capacidade da bactéria crescer e produzir a bacteriocina; pela utilização de um produto que foi previamente fermentado com uma estirpe produtora como um ingrediente no processamento de alimentos; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas (CHEN; HOOVER, 2003; SCHILLINGER et al, 1996).

As bacteriocinas têm demonstrado potencial na biopreservação de carne, produtos lácteos, alimentos enlatados, peixes, bebidas alcoólicas, saladas, produtos de ovos, produtos de panificação de alta umidade, e os vegetais fermentados, através de sua utilização isoladamente, em combinação com outros métodos de preservação ou através da sua incorporação em superfícies de embalagem / alimento formando uma película (CHEN; HOOVER, 2003).

Elas têm sido sugeridas na área da saúde para utilização como substitutas dos antibióticos por apresentarem propriedades como: potência de ação (determinada *in vitro* e *in vivo*), sua baixa toxicidade, ter peptídeos de amplo e estreito espectro de ação, a possibilidade de sua produção *in situ* através de bactérias probióticas e a interessante possibilidade dos peptídeos serem bioengenheirados (COTTER et al., 2013). No entanto, até o momento, o foco principal para o uso foi na saúde animal, não humana, e exemplos disto são uma pomada contendo tioestreptona para tratar dermatologicamente animais domésticos e a utilização de nisina como agente ativo em um produto de prevenção de mastite (COTTER et al., 2003).

Outra forma interessante de atuação das bacteriocinas é a aceleração da maturação de diversos alimentos e aumento da velocidade da proteólise, devido a lise de células bacterianas. Isso pode ser proveitoso na fabricação de queijos onde podem ser liberadas enzimas intracelulares, acelerando a maturação e melhorando as características sensoriais do produto (O'SULLIVAN et al., 2003; ÁVILA⁹ et al., 2005

⁸ DE MARTINIS, E. C. P. et al. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 8, p. 191-208, 2002.

⁹ ÁVILA, M.; GARDE, S.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Effect of milk inoculation with bacteriocina producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1026-1033, 2005.

apud FURTADO, 2010; MORGAN¹⁰ et al., 1997 apud GARDE et al., 2006). Outra atuação das bacteriocinas no campo de promoção de qualidade é quando são adicionadas em queijos e vinhos e sua atuação é controlar a flora deteriorante que poderá causar perdas econômicas pela formação de compostos indesejáveis no produto final (THOMAS; CROW¹¹, 1983 apud COTTER et al., 2005).

Vários estudos demonstram a efetividade destes compostos na bioconservação de alimentos, conforme exemplificado na Tabela 2.

TABELA 2 - APLICAÇÃO DE BACTERIOCINAS NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Bacteriocina	Cepa produtora	Alimento	Micro-organismo alvo
Nisina	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Carne suína	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
Nisina	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Leite fermentado/ Queijo Minas	<i>Listeria monocytogenes</i>
Pediocina AcH	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Queijo	<i>Listeria monocytogenes</i>
Enterocina	<i>Enterococcus faecium</i>	Leite	<i>Listeria monocytogenes</i>
Nisina Z	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Queijo <i>Afuega'l Pitu</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Enterocina	<i>Enterococcus faecalis</i>	Salsicha	<i>Staphylococcus aureus</i>

FONTE: Adaptado de NASCIMENTO et al. (2008), MALHEIROS et al. (2012).

3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A EFICIÊNCIA DAS BACTERIOCINAS

A eficácia da atividade antagonista das bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de bactérias lácticas não é constante e uniforme, e é dependente de características do alimento como sua composição química e condições físicas, das condições de produção e estocagem até o consumo final do alimento. São diversos os fatores que afetam a atividade das bacteriocinas, entre estes a interação das bacteriocinas com os componentes dos alimentos ou com outros aditivos, a adsorção à célula ou às proteínas, a ação do pH do meio em que se encontra, baixa solubilidade

¹⁰ MORGAN, S.; ROSS, R. P.; HILL, C. Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. **Journal of Dairy Science**, v.80, p. 1–10, 1997.

¹¹ THOMAS, T. D.; CROW, V. L. Mechanism of D-lactic acid formation in cheddar cheese. **N. Z. Journal Dairy Science Technology**, v. 18, p. 131–141, 1983.

e desigual distribuição no alimento e à atividade das proteases e outras enzimas que estão naturalmente presentes no alimento (GÁLVEZ et al., 2007; SCHILLINGER et al., 1996).

Alimentos são sistemas muito complexos, que abrangem uma quantidade de componentes extensa e uma série de composições microbianas. Há disponíveis no comércio diversos tipos de alimentos, desde crus até complexamente processados e/ou estéreis, e é por este motivo que a eficiência das bacteriocinas dependerá diretamente da carga microbiana contaminante presente neste alimento. Se a contaminação for grande a concentração de bacteriocina precisará ser mais elevada além de que dependendo do tipo de bactérias ela pode apresentar maior resistência, como as Gram-negativas, ou ainda pode apresentar uma elevada produção de enzimas, como as proteases (GÁLVEZ et al., 2007).

Segundo Gálvez et al. (2007) quando a cepa produtora de bacteriocina for adicionada diretamente no alimento, é necessário que ela apresente diversas habilidades, como: a capacidade de implantação e proliferação no meio, e isto é diretamente dependente da estrutura do alimento (diretamente relacionada as condições de armazenamento do alimento até o momento), da sua capacidade tamponante, da composição do alimento (nutrientes, aditivos, ingredientes); adaptação da cepa ao ambiente do alimento, que pode conter outros micro-organismos presentes e que tem uma composição físico-química única (pH, temperatura, atividade de água (Aa), concentração de gases (O₂ e CO₂), potencial redox); ter sensibilidade para fatores ambientais (conservantes químicos, bacteriocinas); apresentar produção de bacteriocina em quantidade necessária, com bom espectro antibacteriano e estabilidade da produção.

Há fatores que modificam o crescimento microbiano e afetam a produção de bacteriocina, dentre estes fatores estão o dióxido de carbono, etanol, oxigênio, cloreto de sódio, micro-organismos concorrentes (GÁLVEZ et al., 2007). O cloreto de sódio (NaCl), por exemplo, em determinadas concentrações pode acarretar a redução do crescimento de bactérias lácticas e, portanto, a produção de bacteriocinas, além do fato de que o NaCl pode beneficiar micro-organismos alvo, como *Listeria monocytogenes*, da ação das bacteriocinas (HUGAS¹² et al., 2002 apud NASCIMENTO et al., 2008).

¹² HUGAS, M.; Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. **Food Microbiology**, v. 19, p. 519-528, 2002.

Outra limitação funcional das bacteriocinas é sua atividade contra bactérias Gram-negativas, devido a impermeabilidade da membrana externa. Autores tem sugerido o uso de quelantes, como o EDTA, para superar estas limitações, permeabilizando esta membrana e permitindo o acesso da bacteriocina à membrana plasmática (KOPERMSUB et al., 2011).

As bacteriocinas podem ser afetadas também por condições de processamento e estocagem, como a temperatura do produto e o pH. O aumento da temperatura reduz, de forma significativa, a atividade antimicrobiana das bacteriocinas pela maior atividade das proteases (NASCIMENTO et al., 2008).

O pH influencia diretamente a atividade das bacteriocinas, e mais especificamente quando ela é produzida *in situ*, pela necessidade do micro-organismo produtor de um pH específico para produção ótima da bacteriocina. Foi demonstrado por Drosinos et al. (2005) que o valor de pH ótimo para produção de bacteriocina (5,5) de *Leuconostoc mesenteroides* E131 não coincide com o valor ótimo para o desenvolvimento microbiano (6,5). No caso da nisina à sua estabilidade máxima ocorre em condições ácidas e, portanto, a atividade da nisina é maior quando utilizada em alimentos ácidos. Para a efetiva aplicação da nisina é necessário que o pH do alimento seja inferior a 7, garantindo sua solubilidade e estabilidade durante o processamento e o período de estocagem (HERNANDEZ et al., 1993).

Outro fator que pode influenciar a eficiência das bacteriocinas é o nível de contaminação do alimento pelo micro-organismo sobre qual a bacteriocina tem atividade. Se a contaminação inicial estiver elevada, a atividade antimicrobiana da bacteriocina será reduzida e não conseguindo conter o crescimento/desenvolvimento do micro-organismo. Um exemplo disto foi no trabalho realizado por Rilla et al. (2004) onde foi analisado a atividade antimicrobiana do *Lactobacillus lactis subsp. lactis* IPLA 729 sobre duas concentrações distintas de *Staphylococcus aureus* ($1,8 \times 10^4$ e $7,2 \times 10^6$ UFC/mL). Após 24 horas de incubação a amostra com maior concentração inicial de *S. aureus* apresentou uma contagem de UFC de $5,0 \times 10^4$ UFC/mL, enquanto que na amostra com concentração inicial de *S. aureus* não foi detectado UFC.

3.6 NISINA

A descoberta da Nisina começa em 1928 quando Rogers e Whittier publicaram pela primeira vez sobre o efeito inibidor do *Spreptococcus lactis* (agora *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) sobre *Lactobacillus bulgaricus*. Em 1933 Whitehead e Riddet descreveram uma “inibição streptococcica” no leite, mas o nome Nisina foi dado por Mattick e Hirsch em 1947 (COTTER et al., 2005; CHEN; HOOVER, 2003). A partir de então o interesse por esta substância aumentou e começaram a surgir estudos para sua utilização, começando em 1949 por Taylor e colaboradores que queriam identificar uma aplicação prática da nisina testando sua eficiência no tratamento de mastite em rebanho leiteiro. Logo em seguida Hirsch e colaboradores examinaram o potencial da nisina como um conservante alimentar em 1951. Já em 1957 foi relatado por Chevalier e colaboradores que a nisina estava sendo comumente encontrada em queijos do tipo coalho e Aplin e Barrett desenvolveram uma preparação comercial para uso em alimentos (CHEN; HOOVER, 2003). Mas foi somente em 1967 que foram encontradas substâncias, comumente isoladas entre as culturas de queijo, com ação semelhante a nisina e, por fim, foi possível entender que lactococos podem produzir outras bacteriocinas e substâncias inibidoras além da nisina (HURST¹³, 1967 apud CHEN; HOOVER, 2003).

A primeira elucidação sobre sua composição foi em 1971 quando Gross e Morrell descobriram que era um peptídeo formado por 34 aminoácidos. São conhecidos e caracterizados diversos tipos de nisininas, sendo que a nisina A é a forma mais estabelecida e comercializada (CHEN; HOOVER, 2003). As nisininas Z e Q são variações naturais da nisina A e a nisina U é derivada do micro-organismo *Streptococcus uberis* e é muito parecida também com a nisina A (WIRAWAN et al., 2006). E em 2008 foi caracterizada outra variação, a nisina F (DE KWAADSTENIET et al., 2008).

A nisina é um lantibiótico com massa molar de 3,353 kDa, sendo os seus aminoácidos terminais a isoleucina (NH₂) e a lisina (COOH) (ARAUZ, 2011), conforme demonstrado na figura 2.

¹³ HURST, A. Function of nisin and nisin-like basic proteins in the growth cycle of *Streptococcus lactis*. **Nature**, v. 214, p. 1232-1234, 1967.

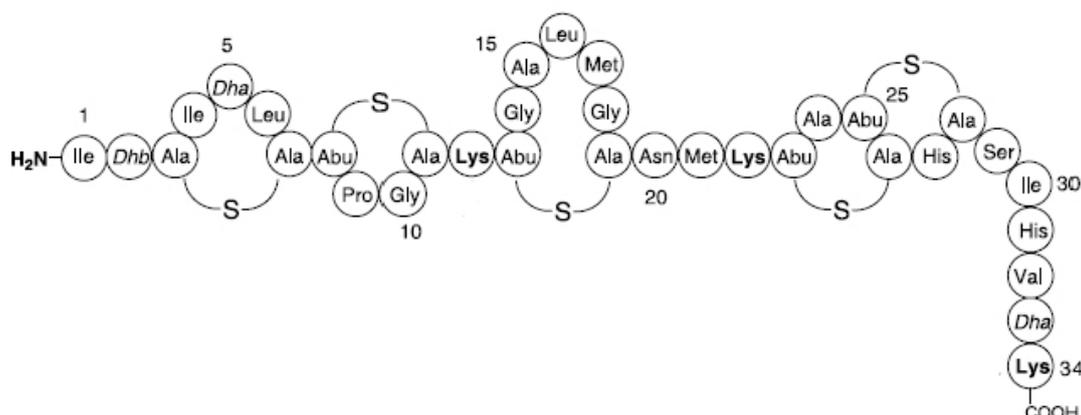


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DA NISINA A, PRODUZIDA POR *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* ATCC 11454, SENDO AS LIGAÇÕES: ALA-S-ALA REPRESENTAÇÃO DE LANTIONINA, ABU-S-ALA REPRESENTAÇÃO DE B-METIL-LANTIONINA, DHA REPRESENTA DEHIDROALANINA E DHB REPRESENTA DEHIDROBUTIRINA.

FONTE: ARAUZ, 2011

As características da nisina como solubilidade, estabilidade e atividade biológica são extremamente ligadas ao pH, a natureza do substrato e a temperatura. Tanto a estabilidade quanto a solubilidade aumentam com o aumento da acidez, sendo assim, em condições alcalinas ou neutras a nisina é praticamente insolúvel. Além disto ela apresenta uma grande estabilidade térmica, podendo ser autoclavada a 121°C por 15 minutos, em pH 2-3, sem que ocorra desnaturação e com perda menor que 10% em sua atividade (DELVES-BROUGHTON¹⁴, 2005 apud ARAUZ, 2011).

A liberação da nisina do micro-organismo, se propagando para o meio, é dependente do pH do meio de cultivo. A um pH menor que 6, mais de 80% da nisina produzida é liberada para o meio extracelular, e quando é cultivada em meios com pH maiores a 6, a maior parte da nisina produzida pelo micro-organismo está associada à membrana celular ou encontra-se dentro da célula bacteriana (PENNA et al., 2006).

A nisina já foi utilizada com segurança como bioconservante na indústria de alimentos há quase 50 anos sem o aparecimento de resistência bacteriana significativa (HENG et al., 2007).

Nisina é considerada uma substância segura e não tóxica, sua DL50 é similar à do cloreto de sódio, quando administrada oralmente, 33.000 Unidades

¹⁴ DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, v. 57, p. 525-527, 2005.

Internacionais (UI) (0,825 mg) por quilo de peso corpóreo (FRAZER¹⁵ et al., 1962 apud NASCIMENTO et al, 2008). A FAO/Comitê da OMS recomendou uma ingestão diária máxima de nisina para uma pessoa de 70 kg de 60 mg de nisina pura ou 33000 Unidades (HURST; HOOVER¹⁶, 1993 apud CHEN; HOOVER, 2003).

Tem permissão de uso em diversos países e com limites diferentes, por exemplo, em queijos processados nos EUA o limite máximo é de 10000 UI/g, na Rússia o limite é 8000 UI/g, na Argentina, Itália e México o limite é de 500 UI/g enquanto que na Austrália, França e Grã-Bretanha é permitido sua utilização em queijos processados sem limite máximo (CHIKINDAS; MONTVILLE¹⁷, 2002 apud CHEN; HOOVER et al., 2003). No Brasil o uso da nisina é permitido com limite de 12,5 mg.kg⁻¹ de produto final para todos os tipos de queijos (BRASIL, 1996) e é considerada uma substância GRAS pelo comitê do Codex Alimentarius da FAO - Food and Agriculture Organization.

Esta bacteriocina tem sido empregada, em larga escala, na indústria de alimentos de vários países, como agente antibotulínico em queijos e ovo líquido, além de molhos e alimentos enlatados (NASCIMENTO et al., 2008). Na Austrália seu uso é legalizado em sopas, na República Tcheca em alimentos próprios para bebês, produtos de panificação e maionese, na Espanha em milk-shakes (HURST; HOOVER²⁶, 1993 apud CHEN; HOOVER, 2003), porém a grande maioria das aprovações do uso da nisina é em produtos lácteos e enlatados.

Devido à natureza ácida de sua molécula, a nisina é completamente estável em soluções de pH 2,0, podendo ser estocada durante um período prolongado a temperaturas de 2 a 7 °C. Acima de pH 7,0, a inativação ocorre mesmo em temperatura ambiente (DELVES-BROUGHTON¹⁸, 1990 apud NASCIMENTO et al, 2008). A completa inativação da atividade da nisina é observada após 30 minutos em temperatura de 63° C e com pH 11 (HANSEN¹⁹ et al., 1991 apud JOZALA et al., 2007).

¹⁵ FRAZER, A. C.; SHARRATT, M.; HICKMAN, J. R. The biological effects of food additives. I. Nisin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 13, p. 32-42, 1962.

¹⁶ HURST, A.; HOOVER, D. G. Nisin. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L., editores. **Antimicrobials in foods**, New York: Marcel Dekker, Inc. p 369-407, 1993.

¹⁷ CHIKINDAS, M. L.; MONTVILLE, T. J. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: JUNEJA, V. K.; SOFOS, J. N., editores. **Control of foodborne microorganisms**. New York: Marcel Dekker, Inc. p 303-21, 2002.

¹⁸ DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 43, n. 3, p. 73-76, 1990.

¹⁹ HANSEN, J. N.; CHUNG, Y.; LIU, W., **ESCOM Science Publishers**, p. 287–302, 1991.

A nisina apresenta amplo espectro antimicrobiano com ação sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, além de outros patógenos e espécies de bactérias lácticas (NASCIMENTO et al, 2008; RILLA et al., 2004).

Nisina não tem nenhum efeito sobre as bactérias Gram-negativas, leveduras e bolores, embora as bactérias Gram-negativas possam ser sensibilizada para a nisina por permeabilização da camada de membrana exterior, como causada por aquecimento sub-letal, congelação e utilização de agentes quelantes (DELVES-BROUGHTON²⁰ et al., 1996 apud CHEN; HOOVER, 2003).

As bacteriocinas têm sido estudadas e testadas em várias áreas, dentre elas está a medicina, onde podem ser potencialmente utilizadas. Em umas destas pesquisas foi demonstrado que a nisina A obtém valores comparáveis aos antibióticos vancomicina e oxacilina contra várias bactérias patógenas e apresentou atividade contra cepas de *Helicobacter pylori* e *Neisseria spp.* que eram resistentes a estes antibióticos, tornando-se potencial candidato para o tratamento de infecções causadas por estas bactérias (MOTA-MEIRA²¹ et al., 2000 apud HENG et al., 2007). Outra nova potencial aplicação da nisina é como contraceptivo espermicida, onde em estudos a administração em coelhos de 1 mg intravaginal parou completamente a mobilidade dos espermatozoides, sendo que nenhum animal tratado engravidou e não houve prejuízo algum no tecido ou no desempenho reprodutivo subsequente (REDDY et al., 2004).

3.7 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo com uma grande capacidade de sobreviver e colonizar diferentes ambientes, o que proporciona o fácil desenvolvimento do mesmo em vários alimentos e na área hospitalar (LOIR²² et al., 2003 apud SANTANA et al., 2010). São bactérias pertencentes à família dos

²⁰ DELVES-BROUGHTON J.; BLACKBUM, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 193-202, 1996.

²¹ MOTA-MEIRA, M.; LAPOINTE, G.; LACROIX, C.; LAVOIE, M. C. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 24–29, 2000.

²² LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

estafilococos, Gram-positiva, em forma de cocos, anaeróbios facultativos, catalase positiva, não capsulados e não esporulados (CHAPAVAL et al., 2009; KONEMAN²³ et al., 1997 apud RODRIGUES et al., 2012).

Essa espécie pertence ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva, que são as espécies capazes de coagular o plasma sanguíneo e que estão associados a produção da enteroxina (CHAPAVAL et al., 2009), mas há também espécies coagulase negativa que produzem esta toxina (GUIMARÃES et al., 2013; PODKOWIK et al., 2013; VERNOZY-ROZAND et al., 1996). Porém a contaminação de alimentos pelo *Staphylococcus aureus* está relacionada com os surtos de intoxicação alimentar (SANTANA et al., 2010).

Pode crescer numa faixa de temperatura ampla, entre 6,5 e 48,5° C com sua temperatura ótima de 30 a 37 °C, e as temperaturas limites para produção de enterotoxina estão entre 14 e 44 °C (SCHMITT et al., 1990), desenvolver-se em pH entre 4,2 e 9,3, com desenvolvimento ótimo entre pH 7 a 7,5 (GENIGEORGIS, 1989; SANTANA et al., 2010), e em concentrações de 15% de cloreto de sódio, havendo produção da enterotoxina em concentração de sal até 10% (SANTANA et al., 2010). Os estafilococos são os únicos capazes de se multiplicarem em alimentos onde a atividade de água (aw) é inferior aos valores normalmente tidos como mínimos para outras bactérias halófilas, sendo este valor igual a 0,86 (GENIGEORGIS, 1989; SANTANA et al., 2010).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) reconhecem como espécies produtoras de enterotoxina os *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2001), não há legislação quanto a determinação de limites para *Staphylococcus* coagulase negativa em alimentos (FREITAS et al., 2009).

Os principais reservatórios são os animais de sangue quente, inclusive o homem, e integram a população microbiana natural, principalmente da pele, narinas e pelos (CHAPAVAL et al., 2009; FRANCO; LANDGRAF²⁴, 2005 apud SANTANA, 2010), sendo encontrado em 30 a 50% de indivíduos saudáveis (CHAPAVAL et al., 2009; LOIR³⁴ et al., 2003 apud SANTANA, 2010).

²³ KONEMAN, E. et al. The gram-positive cocci: Staphylococci and related organisms. In: KONEMAN E.W. et al., editores. **Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**, Philadelphia, p.539-576, 1997.

²⁴ FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

É um micro-organismo que pode provocar diversas infecções como foliculite, furúnculo, celulite, espinha, osteomielite, septicemia, gastroenterite, pneumonia, síndrome do choque tóxico, meningite e outras, sendo algumas destas infecções graves (LOWY²⁵, 1998 apud RODRIGUES et al., 2012; SANTOS et al., 2007). É a principal espécie associada à intoxicação alimentar, representando quase a totalidade dos surtos causados pelos estafilococos (SANTANA et al., 2010) além de ser um dos principais causadores de infecções mamárias em vacas leiteiras, o que torna o micro-organismo patogênico isolado com mais frequência em leite cru (ZECCONI; HAHN²⁶, 2001 apud SANTANA et al., 2010).

No mundo todo a intoxicação estafilocócica continua a ser uma intoxicação alimentar muito comum. Algumas décadas atrás o *Staphylococcus aureus* foi responsável por 25% de todas as doenças de origem alimentar nos EUA (TAMARAPU²⁷ et al., 2001 apud GUSTAFSON et al., em prelo). A sobrevivência, crescimento e produção de enterotoxina pelos estafilococos em diferentes alimentos é dependente de diversos fatores internos (nível de contaminação, pH, atividade de água, antimicrobianos, flora microbiana competitiva) e fatores externos de processamento e armazenamento (temperatura, congelação, irradiação, desidratação, embalagem, humidade) do alimento (GENIGEORGIS, 1989).

Os surtos de intoxicação por ingestão da toxina estafilocócica no mundo envolvem diferentes alimentos, sendo os produtos lácteos o principal, mas estão envolvidos também cremes, tortas recheadas com cremes, salada de batata, atum, carne de frango, presunto, carnes e produtos à base de ovos (SANTANA et al., 2010).

O tratamento de pacientes infectados com *Staphylococcus aureus* ao longo dos anos fez com que cepas resistentes se proliferassem. Tudo iniciou em 1943 com a utilização da penicilina G, mas logo em seguida esse patógeno já exibia resistência à penicilina G em hospitais no Reino Unido e nos Estados Unidos. Aconteceu novamente isto com a metilina (primeira penicilina semi-sintética para uso clínico lançada em 1960), aparecendo assim as cepas MRSA (*S. aureus* resistente à metilina) e depois com a vancomicina (conhecida desde 1956), com as cepas

²⁵ LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England J. Medicine**, v.339, p.520-532, 1998.

²⁶ ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, Brussels, v.345, p.15-18, 2001.

²⁷ TAMARAPU, S.; McKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *S. aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 664-668, 2001.

resistentes (VRSA – *S. aureus* resistente à vancomicina) (SANTOS et al., 2007). A resistência aos antibióticos tem se desenvolvido por mutações genéticas ou pela aquisição do gene de resistência de outras bactérias, da mesma espécie ou de outras.

3.8 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é definida como uma tecnologia de armazenamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em minúsculas cápsulas, sendo estas podendo ser compostas por combinações de materiais encapsulantes (ANAL et al., 2007).

Esta tecnologia de microencapsulação tem sido amplamente utilizada na indústria cosmética, agrícola, médica, gráfica, alimentar e farmacêutica (SILVA et al., 2003), onde diferentes tipos de matérias são encapsulados, como: ativos farmacêuticos, proteínas, peptídeos, óleos voláteis, vitaminas, sais, aminoácidos, ácidos, óleos essenciais, enzimas, pigmentos, corantes, catalizadores, micro-organismos, pesticidas, dentre outros (DESAI²⁸ et al., 2005 apud FAVARO-TRINDADE et al., 2008; VENKATA NAGA JYOTHI et al., 2010).

Apresenta vantagens muito interessantes, que já foram citadas por diversos autores (GHOSH²⁹, 2006 apud CHOIŃSKA-PULIT et al., 2015; JYOTHI SRI et al., 2012; BANSODE et al., 2010; VENTAKATA NAGA JYOTHI et al., 2010):

- imobilização de micro-organismos e enzimas;
- proteção de compostos ou micro-organismos sensíveis;
- melhora nas propriedades como solubilidade, dispersão e fluidez;
- diâmetro pequeno das cápsulas ajuda na redução das limitações da transferência de massa;
- proteção contra oxidação, calor, pH, raios Ultra violetas;
- melhora na vida de prateleira, devido a prevenção de reação de degradação como oxidação e desidratação;
- liberação controlada dos componentes ativos;

²⁸ DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

²⁹ GHOSH, S. K. Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective, In: GHOSH, S. K., editor **Functional Coatings: Polymer Microencapsulation**. Weinheim: Wiley-VCH, p. 1-28, 2006.

- manuseio seguro de materiais tóxicos;
- mascarar características sensoriais como cor, sabor e odor da substância encapsulada;
- evitar efeitos adversos causados pela substância encapsulada, tais como irritação gástrica;
- facilitar a difusão dos nutrientes e metabólitos através da membrana semipermeável.

A encapsulação tem se mostrado uma boa alternativa para uma maior utilização das moléculas com propriedades bioativas e também de micro-organismos probióticos na indústria de alimentos. O uso destes elementos é limitado já que os mesmos acabam apresentando baixa sobrevivência de sua bioatividade nos alimentos devido ao processamento e armazenamento dos produtos onde são adicionados e também devido às circunstâncias deletérias durante seu transporte através do trato gastrointestinal. A encapsulação destas substâncias promove não somente sua viabilidade, mas o mais importante é que também protege a funcionalidade e pode facilitar a liberação controlada (ANAL et al., 2007; FAVARO-TRINDADE et al., 2008; DE VOS et al., 2010).

A liberação do material ativo encapsulado pode ocorrer de diferentes maneiras, de acordo com a natureza do material encapsulante, sendo as mais comuns: biodegradação, variação na temperatura ou pH do meio, difusão, ruptura mecânica, variação de pressão, solubilidade do meio (BRANNON-PEPPAS³⁰, 1997 apud ANAL et al., 2007; BAKAN³¹, 1973 apud FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

A perda da atividade da forma comercial da nisina tem sido reportada em diversos produtos alimentícios durante sua estocagem (DELVES-BROUGHTON³², 1990 apud BENECH et al., 2002). A nisina, como qualquer outro elemento presente nos alimentos, interage com todas as estruturas, elementos e características do ambiente em que se encontra. É observado em estudos que a atividade antimicrobiana da nisina em alimentos é menor do que a encontrada em meios de cultivo ou em tampão, demonstrando que há interação entre os elementos e uma diminuição da ação das bacteriocinas (ROSE et al., 1999).

³⁰ BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in controlled drug delivery. **Biomaterials**, v. 11, p. 1-14, 1997.

³¹ BAKAN, J. A. Microencapsulation of foods and related products. **Food Technology**, v. 27, p. 34-44, 1973.

³² DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as food preservative. **Food Technology**, v. 44, p. 100-117, 1990.

A incorporação da nisina dentro de cápsulas de polímeros comestíveis podem reduzir esta ligação da nisina e componentes alimentares e, conseqüentemente, melhorar a sua eficácia em alimentos (BENECH et al., 2002; TEERAKARN et al., 2002), além de ser uma técnica eficiente para minimizar o desenvolvimento de resistência a nisina e conseguindo a liberação controlada da bacteriocina (LARIDI et al., 2003).

Em um recente estudo, Malheiros et al. (2012) encapsulou nisina em lipossomas e testou sua ação contra *Listeria monocytogenes*. Quando incubado em meio de cultivo BHI e leite desnatado os resultados encontrados quanto seus efeitos bactericidas foram iguais quando aplicados em baixas temperaturas (7°C). Já quando aplicadas nisina livre e encapsulada diretamente em queijos Minas frescal, as que apresentaram maior inibição da *L. Monocytogenes* após 10 dias de armazenamento a 7°C foram as encapsuladas (MALHEIROS et al., 2012).

A encapsulação de uma substância pode ser feita através de diferentes tecnologias e metodologias, sendo as mais frequentemente utilizadas na indústria de alimentos a atomização em Secador por aspersão (Spray Dryer), a liofilização, extrusão, coaservação e método eletrostático (ANAL et al., 2007).

3.8.1 Secagem por aspersão no Spray-Dryer

A secagem por aspersão é uma operação unitária e muito utilizada no processamento de leite em pó, produtos farmacêuticos e de outras soluções e suspensões contendo agentes biológicos e bioativos, tais como proteínas, enzimas, vitaminas, antibióticos, probióticos e os micro-organismos (GHANDI et al., 2012b). É uma tecnologia amplamente utilizada por ser econômica e eficaz, e tem sido recomendada sua aplicação na encapsulação de perfumes, óleos e aromas (VENKATA NAGA JYOTHI et al., 2010).

Nesta tecnologia o componente a ser encapsulado é disperso ou dissolvido numa solução contendo o material encapsulante e o sistema é aspergido numa corrente de ar quente. É uma técnica rápida e que permite a obtenção de um material pronto, sem a necessidade de lavagens para isolamento das microcápsulas ou eliminação de solvente. Mas esta técnica, por utilizar temperaturas elevadas, é restrita

para alguns componentes e micro-organismos que não apresentam alterações em suas propriedades (OLIVEIRA et al., 2010; AFTABROUCHAD³³, et al., 1992 apud SILVA et al., 2003). Um esquema básico do equipamento está ilustrado na Figura 3.

As cápsulas produzidas neste processo são geralmente do tipo matricial, onde o núcleo é constituído de micropartículas na matriz do agente encapsulante, e sua liberação geralmente é associada à ação de solventes por difusão (RÉ³⁴, 1998 apud AZEREDO, 2005).

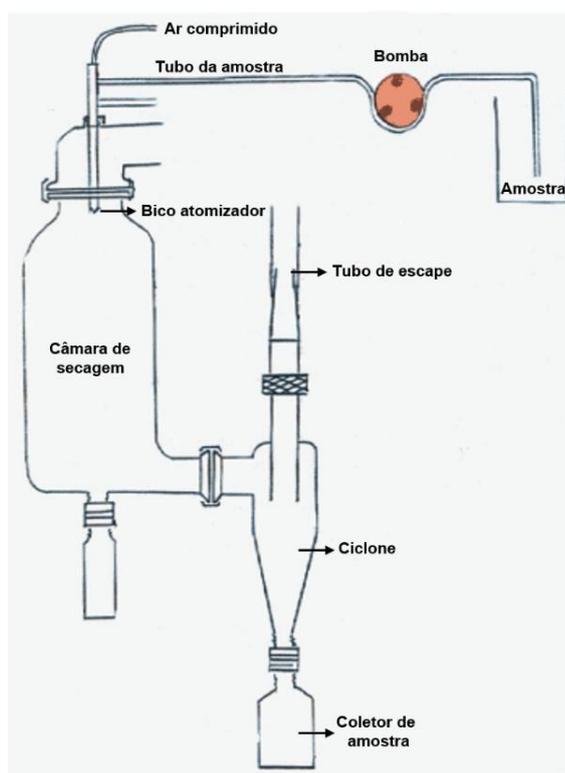


FIGURA 3 - ESQUEMA DE UM EQUIPAMENTO SPRAY DRYER
 FONTE: adaptado de VALDUGA et al., (2003)

É um método relativamente de baixo custo, e o mais utilizado pela indústria de alimentos, sendo uma das técnicas mais antigas de encapsulação, sendo utilizado na década de 1930 na preparação dos primeiros encapsulados de compostos de sabor (DZIEZAK³⁵, 1998 apud AZEREDO, 2005). É bem estabelecido para a produção de pós através da evaporação rápida de solventes, especialmente água, e pode ser adaptada para converter biomassa bacteriana, enzimas, proteínas e outros materiais

³³ AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. **STP Pharma Science**, v. 2, p. 365- 380, 1992.

³⁴ RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, p.1195-1236, 1998.

³⁵ DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v.42, n.4, p.136-151, 1988.

biologicamente ativos em forma de pós para que possam ser armazenados por períodos prolongados (GHANDI et al., 2012b). Apenas dispersões a base de água são aplicadas neste tipo de secagem, portanto a matriz deverá ter uma elevada solubilidade em água (sendo muito utilizados hidratos de carbono), mas é importante ressaltar que é possível utilizar como material de núcleo tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas, sendo somente necessário dissolver as hidrofóbicas primeiramente em óleo e depois formar uma emulsão com água antes da secagem (DE VOS et al., 2010).

O processo de secagem por aspersão apresenta diversas vantagens, como (MASTERS³⁶, 1985 apud OLIVEIRA et al., 2010; AULTON³⁷, 2002 apud OLIVEIRA et al., 2010):

- controle no tamanho e na uniformidade da partícula final, através das variáveis do processo;
- processo contínuo, onde podem ser alteradas as condições de operação durante o processamento, sem a necessidade de interrupção;
- rendimento e rapidez do processo. A evaporação ocorre em frações de segundo;
- baixa agressividade ao produto, podendo ser utilizados produtos termolábeis devido ao curto período de contato com o calor;
- os custos do processo são baixos.

Os fatores que influenciam as características finais das microcápsulas são a concentração e combinação do material encapsulante, da temperatura e a velocidade de alimentação do sistema, e a eficiência da encapsulação varia entre 70 e 85%, não interferindo neste valor os parâmetros utilizados durante o processo (GIUNCHEDI³⁸ et al., 1995 apud SILVA et al., 2003), mas eficiência varia muito dependendo do autor, sendo que alguns obtiveram em seus experimentos valores inferiores aos apresentados. Por exemplo, Mehta³⁹ et al. (1996 apud VENKATA NAGA JYOTHI et

³⁶ MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4. ed. Londres: George Godwin, 1985.

³⁷ AULTON, M. E. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. 2 ed. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 388- 390, 2002

³⁸ GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: overview. **STP Pharma Science**, v. 5, p. 276-290, 1995.

³⁹ MEHTA, R. C, et al. Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Journal of Controlled Release**, v. 41, p. 249–257, 1996.

al. 2010) obteve uma eficiência de encapsulação aumentada de 53,1 para 70,9% quando aumentou a concentração do encapsulante de 20 para 32,5%.

3.9 AGENTES ENCAPSULANTES

Há muitos anos a técnica de encapsulação vem sendo estudada, e o material encapsulante utilizado, sua composição e as condições de secagem são determinantes para o sucesso do procedimento (ROSENBERG et al., 1990). A escolha do material encapsulante depende de diversos fatores, entre eles a ausência de reação com o material que deseja encapsular, as propriedades físicas e químicas do material encapsulado, o mecanismo de liberação ideal mais adequado, fatores econômicos e o processo utilizado para a formação das microcápsulas (BRAZEL⁴⁰, 1999 apud AZEREDO, 2005; FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

A proteção proporcionada pela parede polimérica evita que, durante o armazenamento prolongado, ocorram alterações químicas e sensoriais no material encapsulado. Na forma de micropartículas hidrofílicas, aumentam a solubilidade de ingredientes e facilitam a sua incorporação como aditivos em alimentos (GOUIN, 2004).

Muitos materiais encapsulantes podem ser utilizados, individualmente ou como misturas, para obtenção da cobertura para as microcápsulas, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato, quitosana, carragena, amido, amidos modificados, dextrinas, sacarose, carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras, sulfato de cálcio e silicatos, caseína, gelatina, albumina e polímeros sintéticos. (ANAL et al., 2007; JACKSON; LEE⁴¹, 1991 apud FAVARO-TRINDADE et al., 2008; NARSAIAH et al., 2014).

⁴⁰ BRAZEL, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v.44, n.6, p.388-393, 1999.

⁴¹ JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

3.9.1 Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose (CMC) é obtida a partir do tratamento da polpa da madeira purificada com hidróxido de sódio 18%, produzindo uma celulose alcalina. Quando esta celulose alcalina reage com o sal sódico do ácido cloroacético, forma-se o sal sódico do éter carboximético (celulose-O-CH₂-CO₂-Na⁺). As soluções de CMC tendem a ser altamente viscosas e estáveis, podendo-se obter preparados com diferentes graus de viscosidade (BEMILLER et al., 2010).

Em função de suas propriedades como baixa a alta viscosidade em solução, solubilidade em água fria e quente, grau de adesividade, capacidade de formação de filme, retenção de água, características de suspensão, resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos e capacidade de formação de gel, a CMC tem ampla utilização na indústria alimentícia, no processamento e desenvolvimento de produtos. Na indústria alimentícia é utilizada como estabilizante, aglutinante, espessante, retentor de água e agente de suspensão em biscoitos, preparos de bolos, sorvetes, sobremesas geladas, recheio de tortas, bebidas de frutas, molhos, sopas desidratadas e alimentos dietéticos (CANCELA et al., 2005; PILIZOTA et al., 1996).

3.9.2 Maltodextrina

A maltodextrina, [(C₆ H₁₂ O₅)_n H₂O], é um polímero de cadeia de glicose, com ampla aplicação na indústria por seu baixo custo, por não apresentar sabor e como anti-cristalizante (CACARETO et al., 2010), nutritivo e que é constituído por unidades de D-glicose ligadas por ligações α 1-4. Apresenta-se como pó branco ou como uma solução concentrada obtida a partir da hidrólise parcial dos amidos de milho, batata ou arroz com ácidos e enzimas seguras e adequadas (FDA, 2003).

A composição desses açúcares da maltodextrina determina, simultaneamente, suas características funcionais tanto físicas como biológicas, tais como osmolaridade, higroscopicidade, absorção pelos organismos, estabilidade, fermentabilidade nos produtos alimentícios, gelatinização, doçura e viscosidade (MARCHAL et al., 1999).

A maltodextrina é um produto derivado da hidrólise do amido, caracterizado pelo seu grau de hidrólise, expresso como DE (do inglês Dextrose Equivalent), que indica a porcentagem de açúcares redutores calculados como dextrose com base na matéria seca (MARCHAL et al., 1999).

A hidrólise do amido afeta as propriedades funcionais dos produtos finais, sendo que as propriedades aumentadas pelo maior grau de hidrólise (xaropes de alta conversão, com alta DE) apresentam doçura, higroscopicidade e umectância, redução do ponto de congelamento, aumento do sabor, fermentabilidade e reação de escurecimento; já os produtos de menor conversão (xaropes de baixa conversão e maltodextrinas) apresentam as seguintes propriedades aumentadas: capacidade de produzir viscosidade, capacidade de produzir “corpo”, estabilização de espumas, prevenção do crescimento de cristais de gelo e prevenção da cristalização de gelo (BEMILLER et al., 2010).

As maltodextrinas são utilizadas como transportador ou agentes de corpo, melhorador de textura, auxiliando na secagem por aspensão, como substituto de gordura, agente formador de película, agente de controle de congelamento, evitando a cristalização, ou para fornecer valor nutricional ao alimento adicionado. Nestas aplicações, várias propriedades físicas e biológicas são necessárias (CHRONAKIS⁴², 1988 apud MARCHAL et al., 1999). Sua estrutura química está representada na figura 4.

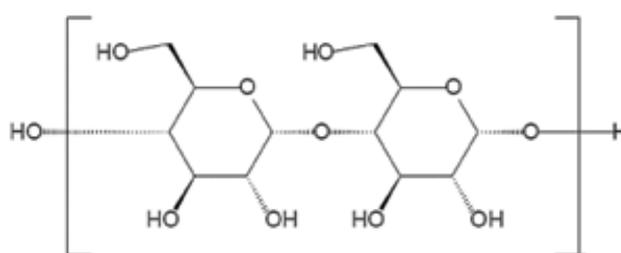


FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MALTODEXTRINA.
FONTE: CACARETO et al., (2010)

Tem sido um importante aditivo em alimentos, sendo aplicado na indústria a aproximadamente 40 anos. É frequentemente utilizada para a encapsulação de

⁴² CHRONAKIS, I.S. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, p. 599-637, 1988.

substâncias/matérias que apresentam oxidação, já que tem mostrado eficiência evitando essa reação, como por exemplo em óleo de linhaça (GRATTARD⁴³ et al., 2002 apud FAVARO-TRINDADE et al., 2008). Encapsulação de corantes também apresentaram bons resultados, como na encapsulação de betacianina de amarantho em spray dryer (CAI; CORKE, 2000).

⁴³ GRATTARD, N.; SALAUN, F.; CHAMPION, D.; ROUDAUT, G.; LeMESTE, M. Influence of physical state and molecular mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate of encapsulated lipids. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 3002-3010, 2002.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foi adquirido o produto Nisaplin (DANISCO – ANEXO 1), que é uma mistura em pó de nisina e cloreto de sódio, onde 2,5% corresponde a nisina pura, sendo que o teor mínimo de nisina presente em 1 mg do produto é de 1.000 Unidades Internacionais (UI).

Como agentes encapsulantes foram utilizados a maltodextrina com DE 15-20 (RoyallIngredients - China) e a carboximetilcelulose sódica (Denver, distribuído pela Synth) e o micro-organismo utilizado como indicador de atividade antimicrobiana foi o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (American Type Culture Collection – EUA), cepa fornecida pela Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR – Campus Centro Politécnico).

4.2 MÉTODOS

A figura 5 apresenta um fluxograma da preparação do material para secagem por aspersão.

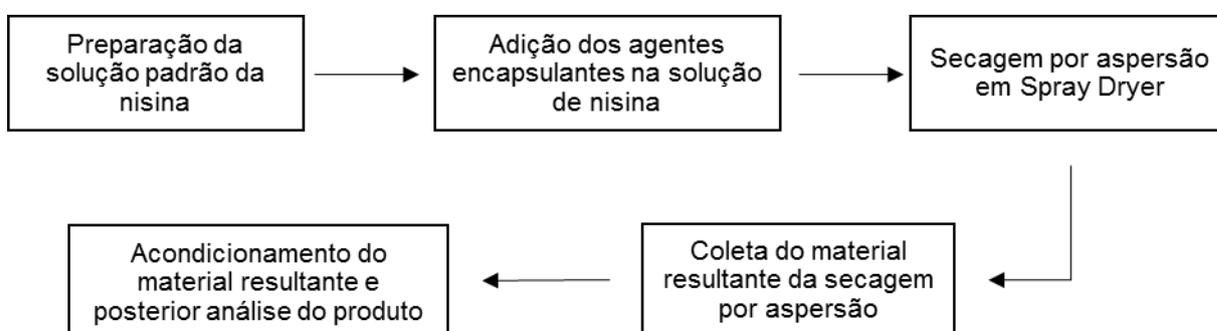


FIGURA 5 – DIAGRAMA DE FLUXO DA PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA SECAGEM POR ASPERSÃO

FONTE: o Autor (2015)

4.2.1 Preparação da solução com agente encapsulante

A solução para a aspersão foi preparada à partir da mistura em pó comercial, dissolvida até a concentração de 72 mg/mL em 40 mL de solução 20 mM HCl e então diluída para uma concentração de 6 mg/mL com 440 mL de água destilada, resultando em uma solução com 0,15 mg/mL de nisina. Essa solução foi preparada a temperatura ambiente em agitador magnético, e após total dissolução foi feito ajuste para pH 7,0 com solução de NaOH 0,5N e NaOH 0,1N. Após ajuste do pH foi adicionado os agentes encapsulantes (maltodextrina e carboximetilcelulose), ainda no agitador magnético, conforme a tabela 3. Após total homogeneização foi realizada a secagem por aspersão em Spray Dryer (CHEN et al., 2014).

TABELA 3 – RELAÇÃO DE NISINA E AGENTE ENCAPSULANTE UTILIZADO EM CADA AMOSTRA.

Amostra	Nisina (mg/mL)	Maltodextrina (mg/mL)	Carboximetilcelulose (mg/mL)	Razão entre nisina e agente encapsulante
A	0,15	6,00	-	1/40
B	0,15	7,50	-	1/50
C	0,15	5,88	0,12	1/40*
D	0,15	7,35	0,15	1/50**
E	0,15	-	0,12	1/0,80
F	0,15	-	0,19	1/1,26

* Sendo 39,2 de maltodextrina e 0,8 de carboximetilcelulose.

** Sendo 49,0 de maltodextrina e 1,0 de carboximetilcelulose

4.2.2 Secagem por aspersão em Spray-dryer

Após a preparação das soluções a secagem por aspersão ocorreu no Spray Dryer, modelo MSD 1.0 da Labmaq do Brasil, do laboratório de Polímeros, no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR – Campus Centro Politécnico), ilustrado na figura 6.



FIGURA 6 - SECADOR POR ASPERSÃO (SPRAY DRYER), MODELO MSD 1.0 DA LABMAQ DO BRASIL.
FONTE: O autor (2015)

Este equipamento tem alimentação de dois fluídos, e os parâmetros utilizados para esta secagem por aspersão foram: vazão de alimentação de 0,3 L/h e vazão do ar de secagem de 30 L/min; utilização de bico de atomização de 1 μm ; ajuste da temperatura de entrada para 105°C que correspondeu a uma temperatura de saída entre 65-70°C durante a aspersão, parâmetros adaptados de Xiao et al. (2011a) que utilizou em seu experimento vazão do ar de secagem de 1680 L/min.

A secagem da nisina comercial com as seis combinações de agentes encapsulantes foram realizadas em duplicata, sendo a combinação de nisina e agente encapsulante na razão (1/1) foi utilizada por Xiao et al. (2011a) e Chen et al. (2014) em seus experimentos, sendo então a razão superior de agente encapsulante maior (1/1,25) utilizada para verificar se haveria diferença no produto final após a secagem por aspersão da nisina comercial.

4.2.3 Análises do produto após secagem por aspersão

4.2.3.1 Rendimento do processo

O rendimento do processo ($\eta\%$) compreende a quantidade em massa de material recolhido após a experiência de secagem por aspersão, com referência à massa de não solvente na correspondente solução (alimentação) utilizado no preparo. O cálculo foi realizado utilizando-se a equação 1, descrita por Xiao et al. (2011a):

$$\eta (\%) = \frac{\text{massa de material coletado}}{(\text{massa encapsulante} + \text{nisina})} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.2.3.2 Determinação da atividade de água

A atividade de água (Aa) foi determinada através da leitura do material coletado após secagem por aspersão no equipamento específico para a finalidade da Aqualab (Pullman, EUA) à temperatura ambiente, segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.2.3.3 Determinação da atividade da nisina

A determinação da atividade antagonista da nisina comercial foi realizada conforme o método *difusão em ágar* (HOSSEINI et al., 2014; XIAO et al., 2011a). Essa técnica é baseada na medida do halo de inibição produzida pela nisina sobre o micro-organismo indicador, o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (ZHAO et al., 2016).

Primeiramente o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi inoculado no meio de cultivo Sal Manitol por 24 h à 37°C, para isolamento de colônias. Foram retiradas entre 2 e 3 colônias isoladas e transferidas para uma solução salina 0,85%, sendo que a

turbidez desta solução bacteriana obtida foi ajustada até uma solução padrão de MacFarland 0,5 e que representa, aproximadamente, 10^8 UFC/mL. Posteriormente, foram adicionadas em uma placa de petri estéril e descartável 50 μ L dessa solução preparada e então vertido nesta mesma placa de petri 20 mL do meio de cultivo líquido, sendo feito a homogeneização através de movimento suaves em forma de 8 realizado sob uma superfície plana e repetidos por 5 vezes em cada sentido.

Após a solidificação do meio de cultivo na placa de petri foi realizada a perfuração dos poços, com uma ponteira cortada e esterilizada, sendo que o diâmetro final deste poço foi de 4-5 mm.

Para a determinação da curva padrão foi preparada uma solução padrão de nisina comercial, que foi preparada pela dissolução de 0,1 g da nisina comercial em 10 mL de HCl 20 mmol/L, sendo que esta solução resultou numa concentração de 100.000 Unidades Internacionais (UI)/mL. E esta solução estoque foi então diluída para as concentrações 10.000 UI/mL, 1.500 UI/mL, 1.000 UI/mL e 500 UI/mL.

Foram então adicionados 20 μ L destas soluções da nisina comercial em poços feitos previamente no ágar e incubadas a 35°C durante 24 horas. Os diâmetros das zonas de inibição no ágar, correspondentes a soluções-padrão, foram determinadas e utilizadas para gerar a equação 2, encontrada por Xiao et al. (2011a):

$$D = a . \log_{10} [nisina] + b \quad (\text{Equação 2})$$

Onde D é o diâmetro da zona de inibição após subtração da linha de base; [Nisina] é a concentração de nisina em UI/mL; a e b são a inclinação e intercepção da regressão linear, respectivamente.

As amostras resultantes da secagem por aspensão foram preparadas com a mesma metodologia das diluições utilizadas para a nisina comercial, utilizada como padrão, e foram incubados em conjunto com as soluções padrão em 35°C por 24 horas, sendo feitos dois poços para cada diluição da amostra, e realizado em dois meios de cultivo distintos, o Ágar Sal Manitol e o Ágar Muller Hinton.

Com os resultados obtidos das placas com o ágar Mueller Hinton da nisina comercial, utilizando as diluições de 10000 UI/mL, 1500 UI/mL, 1000 UI/mL e 500

UI/mL, foi possível gerar a curva padrão (ANEXO 7) e a equação da reta (equação 3), onde y é \log [nisina comercial] (UI/mL) e x é diâmetro do halo de inibição (mm).

$$y = 0,2265x + 0,6083 \quad (\text{Equação 3})$$

A partir da média da medida dos halos de inibição das seis amostras (ANEXO 6), após a secagem por aspersão, foi possível calcular a concentração de nisina presente em cada uma destas amostras com base na equação da reta da curva padrão. Foram utilizados para este cálculo os valores obtidos com as diluições de 10000 UI/mL, 1500 UI/mL e 1000 UI/mL, sendo desconsiderados os valores obtidos na diluição de 500 UI/mL já que algumas amostras não apresentaram este resultado.

O cálculo foi feito com a média do diâmetro dos halos, já desconsiderando o diâmetro do poço, sendo então este valor utilizado na equação 3 para obter-se o valor de y . Foi então feito o antiLog de y e o valor resultante foi utilizado em uma regra de três para comparação direta com os valores do antiLog obtidos com o padrão de nisina comercial, calculado desta mesma maneira. Todos os valores apresentados nos resultados levaram em consideração a mesma quantidade de nisina comercial e do produto resultante da secagem por aspersão.

4.2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada uma pequena amostra do pó resultante da secagem por aspersão no Spray Dryer, que foi então colada diretamente sobre uma fita adesiva de cobre e revestida com uma camada de ouro, no metalizador modelo SCD 030, da Balzers Union FL9496, conforme trabalhos realizados por Xiao et al. (2011a) e Hosseini et al. (2014), para posterior análise no equipamento TESCAN, modelo VEGA 3, no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR – campus Centro Politécnico).

4.2.4 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e uma análise de variância (ANOVA – fator único) foi aplicada para estabelecer se haviam diferenças significativas ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) entre os valores obtidos nas análises de rendimento do processo de secagem por aspersão, da atividade de água após a secagem por aspersão e na determinação da concentração de nisina no produto final, em comparação com a nisina comercial, utilizando o Microsoft Excel (2013 - Versão 15.0.4753.1003). Já o teste de Tukey, realizado no software ACTION (ESTATCAMP, São Carlos/SP).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DA ENCAPSULAÇÃO E ATIVIDADE DE ÁGUA

Após a secagem por aspersão foi calculado o rendimento de produção do material e o resultado obtido foi entre 44 e 64%, dependendo da quantidade e do tipo do material encapsulante, sendo que as amostras encapsuladas com maltodextrina (A, B, C e D) apresentaram valores entre 56 e 64% de rendimento, e os encapsulados somente com carboximetilcelulose (E e F) apresentaram valores entre 44 e 48%. Os valores resultantes da ANOVA (ANEXO 2) estão apresentados na tabela 4, demonstrando que o material utilizando como encapsulante influencia, de forma significativa, no rendimento do produto coletado.

TABELA 4 - RENDIMENTO (η) E DA ATIVIDADE DE ÁGUA (Aa) DAS AMOSTRAS SECAS POR ASPERSÃO.

Amostra	η (%) [*]	Atividade de Água (Aa)
A	63,44 ^a	0,289 ^a
B	64,59 ^a	0,280 ^a
C	56,81 ^b	0,252 ^a
D	63,89 ^a	0,281 ^a
E	44,63 ^c	0,361 ^b
F	48,73 ^c	0,272 ^a

* média do rendimento

A - nisina comercial + maltodextrina, na razão 1 / 40 entre nisina e agente encapsulante.

B - nisina comercial + maltodextrina, na razão 1 / 50 entre nisina e agente encapsulante..

C - nisina comercial + (maltodextrina + CMC), na razão 1 / 40 entre nisina e agente encapsulante, sendo o agente encapsulante resultante da mistura de maltodextrina (39,2) e CMC (0,8).

D - nisina comercial + (maltodextrina + CMC), na razão 1 / 50 entre nisina e agente encapsulante, sendo o agente encapsulante resultante da mistura de maltodextrina (49) e CMC (1,0).

E - nisina comercial + carboximetilcelulose, na razão 1 / 0,80 entre nisina e agente encapsulante.

F - nisina comercial + carboximetilcelulose, na razão 1 / 1,26 entre nisina e agente encapsulante.

Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).

DMS (5%) do rendimento = 5,49289; DMS (5%) da Atividade de água = 0,05161

Os resultados do rendimento (η) demonstraram que a utilização de carboximetilcelulose como único encapsulante (E e F) resultou em um rendimento inferior do que quando houve sua utilização juntamente com a maltodextrina (C e D)

ou quando o único material encapsulante utilizado foi a maltodextrina (A e B). Entre amostras contendo como agente encapsulante a maltodextrina (A, B, C e D) houve diferença significativa somente na amostra C, já com as amostras contendo como agente encapsulante somente a carboximetilcelulose (E e F) não ocorreu diferenciação, sendo que as demais combinações entre as amostras apresentaram diferença significativa quando utilizado um nível de significância de 5% (ANEXO 3).

Os resultados encontrados foram inferiores quando comparados aos apresentados por Xiao et al. (2011a), onde o rendimento de produção foi de 67% utilizando zeína para encapsular a nisina, na mesma concentração de encapsulante e com as mesmas condições do Spray Dryer.

O material produzido com os diferentes agentes encapsulantes, em diferentes concentrações e combinações apresentaram valores de atividade de água (Aa) inferiores a 0,37, mas houve diferença significativa da amostra E com os demais tratamentos (ANEXO 4 e 5), sendo este o tratamento que apresentou a maior atividade final, não havendo uma razão para isto ter ocorrido, já que a amostra F utiliza o mesmo agente encapsulante e apresentou Aa próxima as demais amostras (A, B, C e D). Mesmo com essa diferença apresentada pela amostra E, esse reduzido valor de atividade água indica uma baixa disponibilidade de água para reações químicas e crescimento microbiano em todas as amostras, o que é favorável para estabilidade de produtos desidratados (BELITZ et al., 2009).

5.2 TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NISINA

Foram utilizados dois meios de cultivo distintos para testar diferença entre metodologias. O ágar Sal Manitol não foi eficiente no teste de atividade antimicrobiana, não apresentando halo de inibição em diversas placas (ANEXO 6). No entanto, o ágar Mueller Hinton apresentou resultados satisfatórios e a atividade da bacteriocina foi observada em quase todas as diluições e amostras testadas.

Os resultados obtidos, a partir do cálculo descrito no item 4.2.3.3, variaram de 32,90% a 82,64% (tabela 5), confirmando que o agente encapsulante e sua concentração interferem significativamente na quantidade de nisina presente no produto final (ANEXO 8 e 9), sendo que uma maior concentração nas amostras com

maltodextrina apresentaram maior atividade antimicrobiana, deferente das amostras E e F que apresentaram maiores resultados com menor concentração de encapsulante utilizado.

TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DA NISINA, EM %, QUANDO COMPARADA COM MESMA QUANTIDADE DE MISTURA DE NISINA COMERCIAL UTILIZADA COMO PADRÃO.

Amostra	Concentração (%) de nisina
A	48,60 ^a
B	63,77 ^b
C	32,90 ^c
D	65,38 ^b
E	82,64 ^d
F	49,09 ^a

A - nisina comercial + maltodextrina, na razão 1/40 entre nisina e agente encapsulante.
 B - nisina comercial + maltodextrina, na razão 1/50 entre nisina e agente encapsulante..
 C - nisina comercial + (maltodextrina + CMC), na razão 1/40 entre nisina e agente encapsulante, sendo o agente encapsulante resultante da mistura de maltodextrina (39,2) e CMC (0,8).
 D - nisina comercial + (maltodextrina + CMC), na razão 1/50 entre nisina e agente encapsulante, sendo o agente encapsulante resultante da mistura de maltodextrina (49) e CMC (1,0).
 E - nisina comercial + carboximetilcelulose, na razão 1/0,80 entre nisina e agente encapsulante.
 F - nisina comercial + carboximetilcelulose, na razão 1/1,26 entre nisina e agente encapsulante.
 Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).
 DMS (5%) = 10,57308

De modo geral, houve uma diferença significativa, ao nível de significância de 5%, entre os tipos de encapsulante e suas concentrações utilizadas quanto a atividade final do produto, não havendo uma homogeneidade no tipo de encapsulante e no resultado final. O teste de Tukey foi aplicado e o resultado aponta que as amostras C e E diferiram estatisticamente das demais, sendo que A e F, e B e D, apresentaram igualdade estatística entre si, respectivamente.

Na amostra **A** onde ocorreu a secagem por aspensão com a maltodextrina como agente encapsulante na razão de nisina /encapsulante de 1/40, o resultado final obtido foi de 48,60% das Unidades Internacionais (UI), quando comparado com a mesma massa de nisina comercial. Esse resultado foi muito parecido com o encontrado por Chen et al. (2014) que obteve após 24 horas, o mesmo tempo que nosso trabalho, uma atividade de 46% da atividade remanescente, após a glicação da nisina comercial com maltodextrina, nas mesmas proporções utilizadas em nosso experimento, mas utilizando o liofilizador como metodologia de secagem. O resultado encontrado é igual estatisticamente ao encontrado na amostra F, onde o agente encapsulante utilizado é

o CMC na razão de 1/1,26 de nisina e agente encapsulante, e diferindo significativamente das demais.

Já na amostra **B** onde a razão de nisina /maltodextrina foi de 1/50 o resultado obtido foi de 63,77% das UI/mL, demonstrando que uma quantidade maior do agente encapsulante (maltodextrina) foi eficiente na atividade final do material, diferindo significativamente com a amostra A, que apresenta menor quantidade do mesmo agente encapsulante. Quando comparado com as demais amostras, a amostra B apresenta resultado estatisticamente diferente, sendo igual somente com a amostra D, sendo que esta última contém em sua composição de agentes encapsulante 0,15 mg/mL de carboximetilcelulose (2% do total dos agentes encapsulantes).

No caso da amostra **C**, onde ocorreu a secagem por aspersão com ambos os agentes encapsulantes (maltodextrina e carboximetilcelulose) na razão de 1/40 de nisina e mix de agentes encapsulantes, sendo este último composto de 98% de maltodextrina e 2% de CMC, o resultado final foi de 32,9% das Unidades Internacionais (UI/mL), sendo este o menor resultado entre as 6 combinações de agentes encapsulantes testadas e sendo estatisticamente diferente das demais amostras. Em seus experimentos Chen et al. (2014) obteve o menor resultado da atividade remanescente com a utilização da lactose, onde seu valor ao final das 24 horas foi de apenas 28%, inferior ao nosso resultado.

Na amostra **D**, onde a secagem ocorreu também com ambos os componentes, mas na razão nisina/mix de agentes encapsulantes de 1/50, este mix com a mesma composição da amostra C (98% de maltodextrina e 2% de CMC), o resultado obtido foi de 65,38%, demonstrando novamente que uma razão maior de agente encapsulante é mais efetiva na atividade final do material seco. Esse resultado foi estatisticamente igual a amostra B e diferente das demais amostras.

Os resultados obtidos quando foi utilizado o CMC como único agente encapsulante não seguiram o mesmo padrão apresentado nas amostras A, B, C e D, onde uma razão superior do agente encapsulante (maltodextrina ou maltodextrina + CMC), em comparação com a nisina, apresentou uma atividade final superior, já que uma maior quantidade do encapsulante consegue agir eficientemente prendendo a nisina em seu interior. O CMC apresenta uma característica física mais viscosa que a maltodextrina, quando estão dissolvidas em solução aquosa, e uma quantidade maior de CMC dificulta a interação entre outros elementos contidos nesta solução, dificultado o aprisionamento da nisina no interior da estrutura formada após a

secagem por aspersão, como podemos visualizar nas micrografias da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Na amostra **E** onde a razão da nisina / agente encapsulante era de apenas 1/0,80 a atividade final do material após a secagem por aspersão foi de 82,64%, sendo este o maior resultado obtido entre os testes realizados, e diferindo estatisticamente das demais amostras, mas por outro lado foi também a amostra que apresentou o menor rendimento (44,63%). Esse resultado foi superior ao maior resultado apresentado por Chen et al. (2014) que foi de 77% de atividade, com a utilização de dextrina em uma concentração de 6 mg/mL.

E a amostra **F** apresentou atividade final de 49,09%, quando foram utilizados uma razão de nisina/CMC de 1/1,26. A utilização de maior concentração de CMC apresentou menor atividade final, demonstrando que a quantidade do agente encapsulante interfere significativamente na atividade final do material após secagem por aspersão. Essa amostra obteve resultado estatisticamente diferente das demais amostras, apresentando igualdade somente a amostra A, sendo que nesta última foi utilizado como agente encapsulante somente a maltodextrina e em razão muito superior de nisina/agente encapsulante.

O trabalho apresentado por Xiao et al. (2011a) de encapsulamento de nisina, mas desta vez utilizando como agente encapsulante a zeína, resultou em 54% da atividade, demonstrando que os resultados são dependentes do tipo e da concentração do agente encapsulante utilizado, já que cada material utilizado tem suas características e interação própria com os demais componentes do meio em que se encontram, mesmo utilizando as mesmas padronizações do equipamento utilizado na secagem do material.

Desta forma o melhor resultado, levando em consideração os parâmetros de rendimento do processo e atividade final da bacteriocina, os melhores resultados foram apresentados pelas amostras B e D com rendimento de 64,59% e 63,89%; e concentração final de atividade de 63,77% e 65,38%, respectivamente, sendo estes estatisticamente iguais em ambos os resultados dos experimentos.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Através da micrografia eletrônica de varredura foi possível observar a estrutura final do material resultante da secagem por aspersão da bacteriocina comercial, quais as diferenciações resultantes da concentração e do material encapsulante utilizado.

A microestrutura da nisina comercial antes de passar pelo processo de secagem, pode ser observada na figura 7, onde é possível observar compostos como fibras (flechas verticais), cristais (flechas horizontais), com diferentes formas. Essa composição estrutural é devido a presença do cloreto de sódio, e outros componentes em menor concentração na nisina comercial (ANEXO 1).

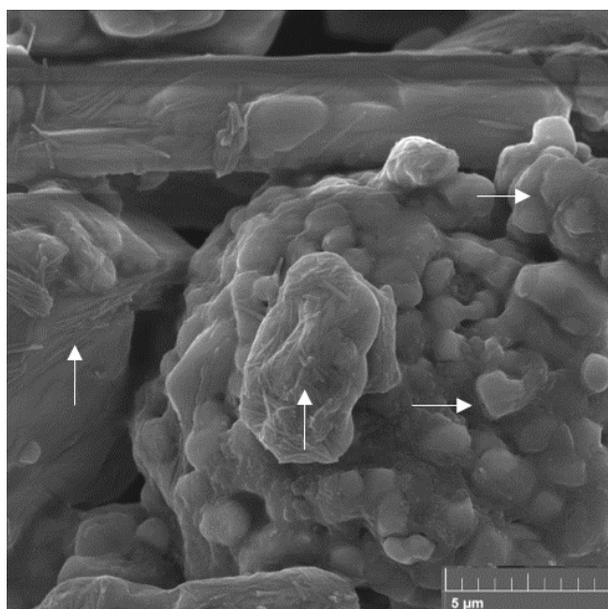


FIGURA 7 - MICROGRAFIA DA NISINA COMERCIAL AUMENTADA 15000 VEZES (FLEXAS VERTICAIS COMO FIBRAS E HORIZONTAIS COMO CRISTAIS)
FONTE: O autor (2015)

Na figura 8 é possível observar a característica da estrutura da nisina comercial após secagem por aspersão sem o acréscimo de nenhum agente encapsulante, só demonstrando as alterações resultantes da temperatura, velocidade de alimentação, fatores estes relacionados ao equipamento de secagem.

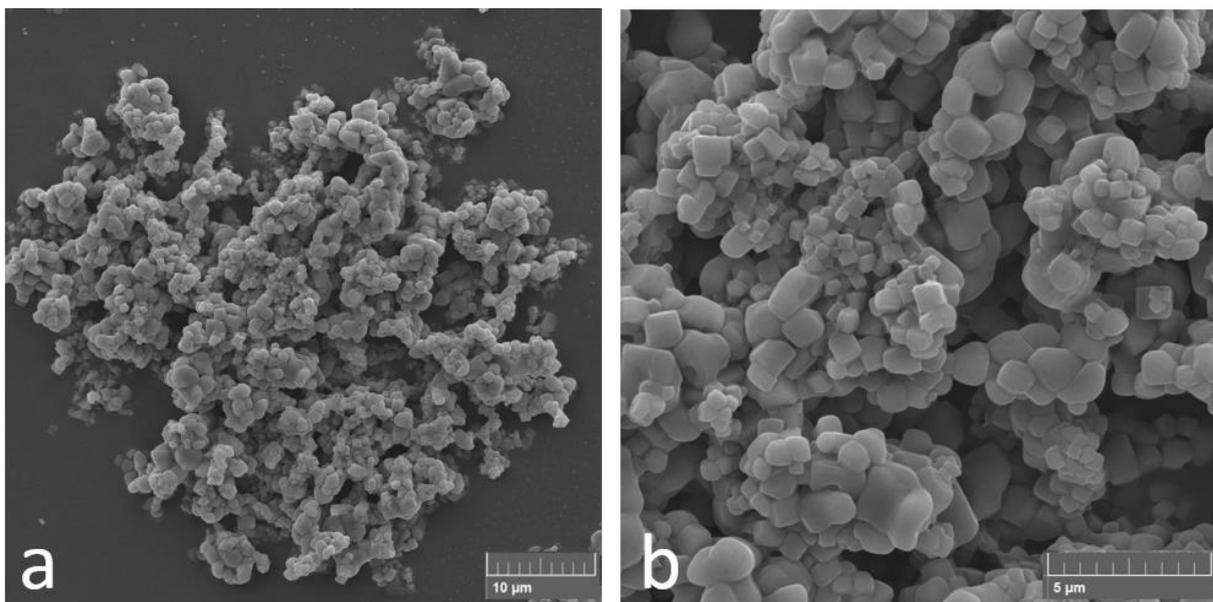


FIGURA 8 - MICROGRAFIA DA NISINA COMERCIAL APÓS SECAGEM POR ASPERSÃO A 105 °C, SEM AGENTE ENCAPSULANTE, AUMENTADA 5000 VEZES (A) E 15000 VEZES (B)
FONTE: O autor (2015)

A micrografia apresentada na figura 9 é do agente encapsulante carboximetilcelulose (CMC), que apresenta uma estrutura mais lisa, sem grumos aparentes, mesmo contendo sal em sua composição os cristais não ficam aparentes como acontece com a nisina comercial.

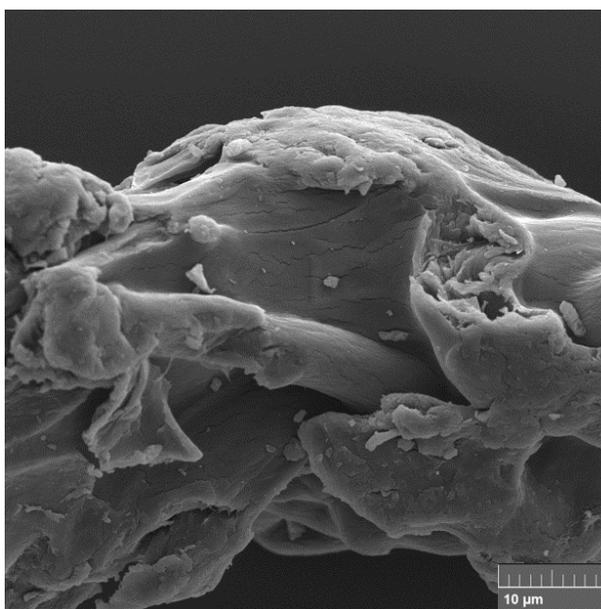


FIGURA 9 - MICROGRAFIA DO AGENTE ENCAPSULANTE CARBOXIMETILCELULOSE AUMENTADO 5000 VEZES
FONTE: O autor (2015)

A micrografia apresentada na figura 10 é do agente encapsulante maltodextrina com grau de hidrólise e DE (equivalente de dextrose) 15-20, que apresenta também uma estrutura mais lisa, sem a presença de cristais.

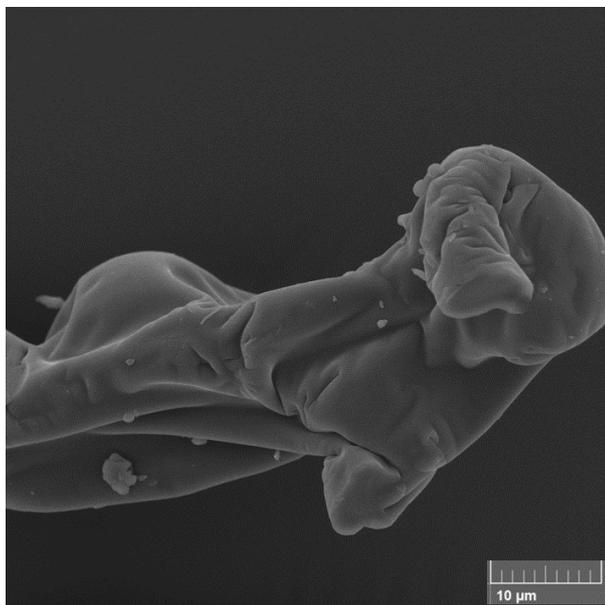


FIGURA 10 - MICROGRAFIA DO AGENTE ENCAPSULANTE MALTODEXTRINA DE 15-20 AUMENTADO 5000 VEZES

FONTE: O autor (2015)

Com base nestas micrografias dos materiais utilizados (figuras 7, 8, 9 e 10) podemos avaliar as amostras secas por aspersão, com seus respectivos tipos e concentrações de agentes encapsulantes utilizados. A primeira amostra (**A**), onde foi utilizada somente a maltodextrina como agente encapsulante, na razão de 1/40 de nisina e agente encapsulante, apresentou a micrografia apresentada na figura 11 (A).

É possível observar a presença de cristais no material resultante desta secagem, o que significa que a nisina está presente nesta amostra, já que os agentes encapsulantes não apresentam essa característica e o que também foi comprovado através do teste antimicrobiano, onde esta amostra apresentou atividade final de 48,60% quando comparada com a nisina comercial. Não ocorreu a formação de cápsulas separadas, mas um aglomerado.

A amostra **B** é composta de nisina e a maltodextrina como único agente encapsulante na razão de 1/50, respectivamente. A micrografia resultante desta amostra pode ser conferida na figura 11 (B), onde é possível visualizar os cristais presentes na nisina comercial, mas em menor quantidade quando comparados com a amostra A, o que sugere que o agente encapsulante, por estar em maior quantidade,

conseguiu revestir mais a nisina comercial. Nesta amostra é possível a visualização de algumas estruturas capsulantes, o que pode sugerir que estas aprisionaram efetivamente a nisina e com isto a atividade da mesma foi superior, como observado no teste de atividade final (63,77%).

A amostra **C** é composta da nisina e como agentes encapsulantes numa razão de 1/40, sendo os agentes encapsulante um mix de maltodextrina (98%) e o CMC (2%) do total de encapsulante. A micrografia 11 (C) apresenta uma característica diferente das amostras anteriores, apresentando poucos aglomerados. Nesta amostra os cristais não são tão visíveis, e a disposição da amostra é diferente também, apresentando poucas estruturas na forma de cápsulas, podendo ser este o motivo da atividade tão baixa apresentada anteriormente (32,90%).

A amostra **D** é composta da nisina e como agentes encapsulantes a maltodextrina e o CMC na razão de 1/50, sendo o CMC correspondente a 2% do total dos agentes encapsulantes. Nesta amostra uma concentração maior de agente encapsulante, quando comparada com a amostra C, resultou em uma atividade final da nisina superior (65,38%) e quanto a estrutura apresentada na micrografia ela é parecida com a encontrada na amostra B, e sendo visível a formação de pequenas cápsulas, como observado na figura 11 (D), podendo ser este o motivo pela atividade superior quando comparado a amostra C.

A amostra **E** é composta da nisina e como agente encapsulante somente a carboximetilcelulose (CMC), na razão de 1/0,80. A figura 11 (E) demonstra como as estruturas formadas são totalmente diferentes das resultantes da secagem por aspersão utilizando como agente encapsulante a maltodextrina, ou a combinação de maltodextrina com CMC. Aqui o material resultante da secagem apresenta um aglomerado de grumos, aparentemente soltos, diferente da massa que foi formada quando foi utilizado a maltodextrina. Essa quantidade de CMC resultou na melhor atividade final encontrada (82,64%). Com este encapsulante é possível também visualizar os cristais presente na solução de nisina comercial.

A amostra **F** é dos mesmos materiais da amostra E, diferindo somente na razão nisina/agente encapsulante, que neste caso é 1/1,26. Como pode ser observado na figura 11 (F) a disposição é muito semelhante a encontrada na amostra E, diferindo somente na apresentação de aglomerados maiores, podendo ser este o fator determinante para o resultado da atividade da nisina inferior (49,09%).

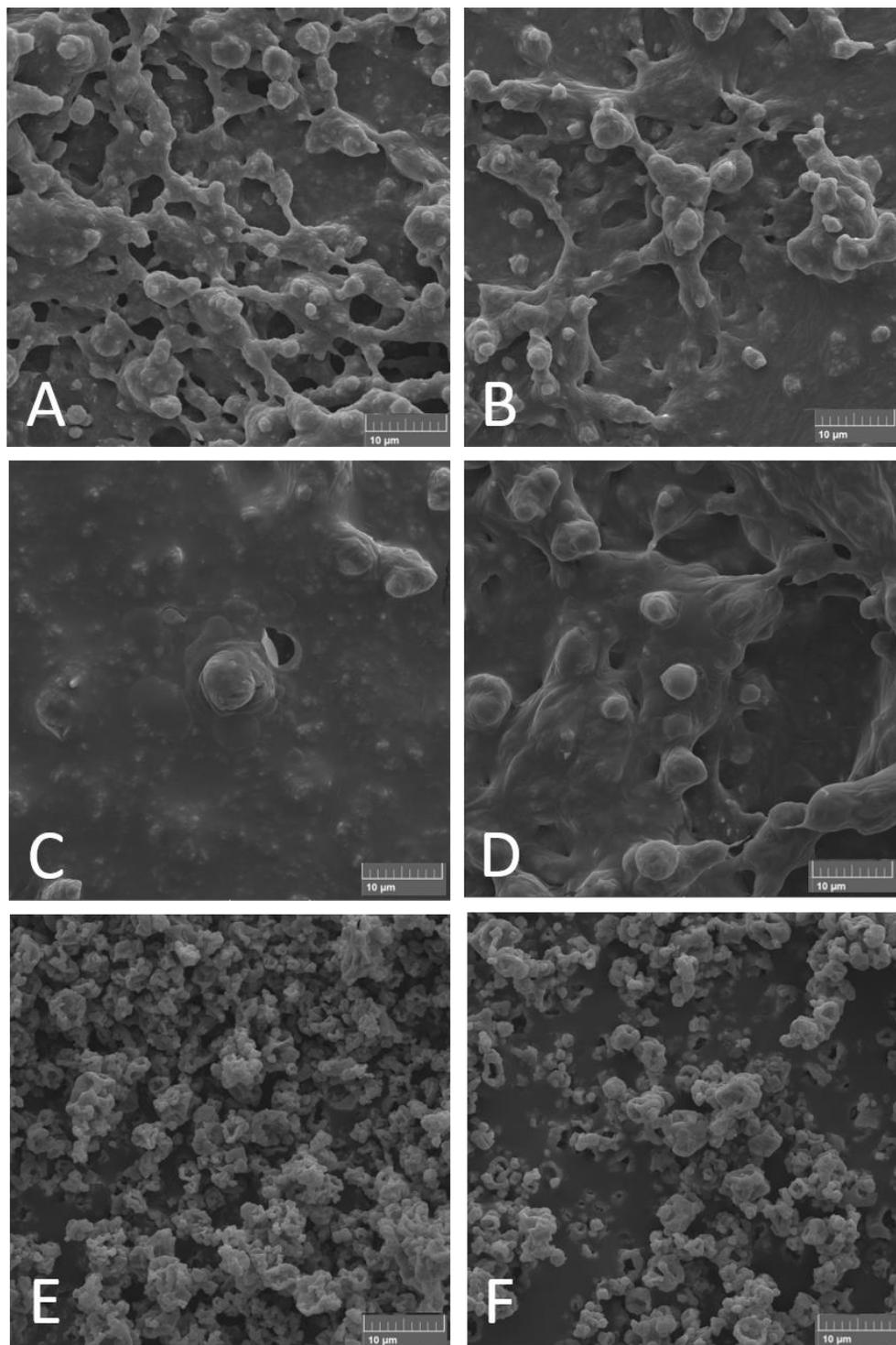


FIGURA 11 - MICROGRAFIAS DAS AMOSTRAS APÓS SECAGEM POR ASPERSÃO, COM AUMENTO DE 5000 VEZES, SENDO A **AMOSTRA A** DE NISINA COM MALTODEXTRINA (RAZÃO DE 1/40 ENTRE NISINA E AGENTE ENCAPSULANTE); **AMOSTRA B** DE NISINA COM MALTODEXTRINA (RAZÃO DE 1/50 ENTRE NISINA E AGENTE ENCAPSULANTE); **AMOSTRA C** DE NISINA COM MALTODEXTRINA E CMC (RAZÃO DE 1/40 ENTRE NISINA E AGENTES ENCAPSULANTE – SENDO ESTE ÚLTIMO RESULTANTE DA MISTURA DE MALTODEXTRINA (39,2) E CMC (0,8)); **AMOSTRA D** DE NISINA COM MALTODEXTRINA E CMC (RAZÃO DE 1/50 ENTRE NISINA E AGENTES ENCAPSULANTE – SENDO ESTE ÚLTIMO RESULTANTE DA MISTURA DE MALTODEXTRINA (49,0) E CMC (1,0)); **AMOSTRA E** DE NISINA COM CMC (RAZÃO DE 1/0,8 ENTRE NISINA E CMC) E **AMOSTRA F** DE NISINA COM CMC (RAZÃO DE 1/1,26 ENTRE NISINA E CMC)

FONTE: O autor (2015)

As micrografias demonstraram que a estrutura resultante da secagem por aspersão da nisina comercial somente com o CMC como agente encapsulante (amostras E e F) são próximas a encontrada por Xiao et al. (2011a), quando utilizou a zeína como agente encapsulante. A aglomeração de pequenas esferas irregulares foi característica no trabalho Xiao et al. (2011a), diferindo no fato das estruturas apresentarem uma porosidade grande, quase como se fosse um aglomerado de esferas, e as demonstradas aqui apresentam uma estrutura não porosa, como pode ser observado na figura 12.2.

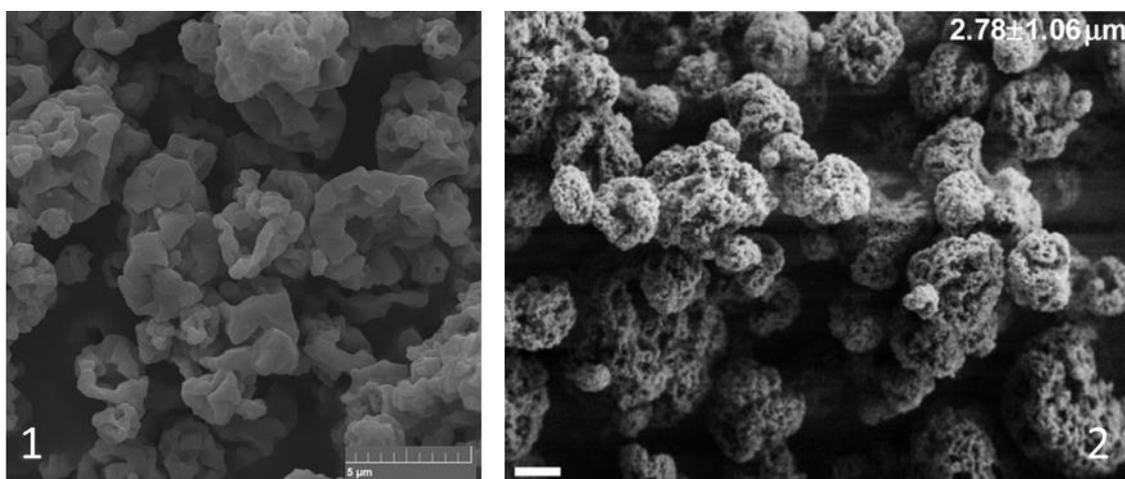


FIGURA 12 – MICROGRAFIA DA AMOSTRA E **(1)** DE NISINA COM CMC (RAZÃO DE DE 1 / 0,80 DE NISINA E CMC), COM AUMENTO DE 15000 VEZES E **(2)** MICROGRAFIA DE XIAO (2011a) DE SECAGEM POR ASPERSÃO DE NISINA UTILIZANDO COMO ENCAPSULANTE A ZEÍNA

FONTE: O autor (2015 – 12.1) e Xiao (2011a – 12.2)

As amostras B, C e D apresentaram em suas micrografias estruturas capsulantes, sendo a amostra D quem apresentou estruturas em maior quantidade. Estas duas últimas amostras (C e D) foram secas por aspersão utilizando como agente encapsulante a maltodextrina e a CMC, demonstrando que esta combinação, nas concentrações testadas é favorável para a formação de estruturas capsulantes definidas, diferentemente do observado nas amostras onde foram utilizados somente a maltodextrina como agente encapsulante (A e B), onde ocorreu a secagem com formação de um aglomerado dos componentes.

6 CONCLUSÃO

- A combinação de agentes encapsulantes e suas concentrações influenciam significativamente no rendimento final do produto quando submetido a secagem por aspersão, à 105°C. O menor rendimento foi obtido quando a carboximetilcelulose (CMC) foi utilizado como único agente encapsulante (44,63%) na razão de 1/0,80 de nisina e CMC. Já o maior rendimento foi obtido utilizando como agente encapsulante somente a maltodextrina (64,59%), na razão de 1/50 de nisina e maltodextrina.
- As micrografias da secagem por aspersão demonstraram que não houve uma completa encapsulação da nisina comercial. As amostras que obtiveram melhores resultados foram aquelas tratadas com maltodextrina e CMC, que apresentaram encapsulação visível em microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- O melhor resultado, considerando todos os parâmetros analisados, foi obtido com a amostra D que apresentou rendimento do processo de 63,89%, concentração da atividade final de 65,38%, atividade de água de 0,281 e apresentou estruturas capsulantes nas micrografias.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria DETEN/MS nº 29 de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão de uso da NISINA com a função de conservador para queijos pasteurizados. Diretor: Marcelo Azalim. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15983&word=>> Acesso em: 12 mar. 2014.

AKHTAR, M.; PARK, C. E.; RAYMAN, K. Effect of urea treatment on recovery of staphylococcal enterotoxin A from heat-processed foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3274-3276, set. 1996.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.

ARAUZ, L. J. **Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454 em biorreator**. 2011. 148 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n 2, p. 38–43, abril 2010.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4 ed. Berlim: Springer, 2009.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 111-118.

BENECH, R. O.; KHEADR, E. E.; LARIDI, R.; LACROIX, C.; FLISS, I. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3683-3690, ago. 2002.

BIERBAUM, G.; SAHL, H. G. Lantibiotics: Mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 2-18, 2009.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. Staphylococcus enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 71-86, jan./jun. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 22 de Janeiro de 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC, nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 2 de Janeiro de 2001. Seção I, p. 45-53, 2001.

CACARETO, N. D. D.; MONTEIRO FILHO, E. S.; PESSÔA FILHO, P. A.; MEIRELLES, A. J. A. Water activity of aqueous solutions of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers and maltodextrins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n.1, p. 173-181, jan./março 2010.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1248-1252, 2000.

CANCELA, M. A.; ÁLVAREZ, E.; MACEIRAS, R. Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 419-424, 2005.

CASTRO, M. P.; PALAVECINO, N. Z.; HERMAN, C.; GARRO, O. A.; CAMPOS, C. A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, v. 87, p. 321-329, 2011.

CHAPAVAL, L.; AGUIAR, V. M. P.; SOUSA, A. P. B.; MIRANDA, K. P.; MORORÓ, A. M.; MAGALHÃES, D. C. T. **Cultura, crescimento e identificação de bactérias do gênero Staphylococcus aureus em leite de cabra**. Sobral: EMBRAPA, 2009. 5 p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 41). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPC-2010/23045/1/ct41.pdf>>. Acesso em: 15 junho 2015.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 82-100, 2003.

CHEN, H.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsion prepared thereof. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 75-81, 2014.

CHOIŃSKA-PULIT, A.; MITUŁA, P.; ŚLIWKA, P., ŁABA, W.; SKARADZIŃSKA, A. Bacteriophage encapsulation: trends and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 212-221, 2015.

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

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins – A viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 95-105, fev. 2013.

DE MARTINIS, E. C. P., ALVES, V. F., FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p.114-119, 2003.

DE KWAADSTENIET, M.; TEN DOESCHATE, K.; DICKS, L. M. T. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a news lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 547-549, 2008.

DE VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292-302, 2010.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; NASIS, P.; GALIOTOU, M.; METAXOPOULOS, J. Growth and bacteriocina production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Journal of applied Microbiology**, v. 99, p. 1314-1323, 2005.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **21 Code of Federal Regulations**, Rockville, 2003. v. 3, sec. 184.1444, p. 523. Disponível em: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=957d9148996f9ddf7680ae6a4d5b37e2&ty=HTML&h=L&mc=true&r=SECTION&n=se21.3.184_11444>. Acesso em: 15 de junho de 2015.

FREITAS, M. F. L.; LUZ, I. S.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; DUARTE, D. A. M.; VASCONCELOS, A. M. M.; RIBEIRO, A. R.; MOTA, R. A.; BALBINO, T. C. L.; STAMFORD, T. L. M. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 375-378, abr./jun. 2009.

FURTADO, D. N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1541-1550, 2014

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin – based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GARDE, S.; ÁVILA, M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis of Hispánico cheese manufactured using lacticin 481- *producing Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INI 639. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 840-849, 2006.

GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, p. 327-360, 1989.

GHANDI, A.; POWELL, I. B.; BROOME, M.; ADHIKARI, B. Survival, fermentation activity and storage stability of spray dried *Lactococcus lactis* produced via different atomization regimes. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 83-90, 2013.

GHANDI, A.; POWELL, I. B.; CHEN, X. D.; ADHIKARI, B. Drying kinetics and survival studies of dairy fermentation bacteria in convective air drying environment using single droplet drying. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 405-417, 2012a.

GHANDI, A.; POWELL, I. B.; HOWES, T.; CHEN, X. D.; ADHIKARI, B. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: A laboratory and pilot scale study. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 194-200, 2012b.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.

GUIMARÃES, F. F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; PANTOJA, J. C. F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase –positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2866-2872, maio 2013.

GUSTAFSON, J. E.; MUTHAIYAN, A.; DUPRE, J. M.; RICKE, S. C. (no prelo) Staphylococcus aureus and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. **Food Control**, p. 1-14, 2015.

HENG, N. C. K.; WESCOMBRE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. **Bacteriocins: ecology and evolution**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. p. 45-83.

HERNANDEZ, P. E.; RODRIGUEZ, J. M.; CINTAS, L. M.; MOREIRA, W. L.; SOBRINO, O. J.; FERNANDEZ, M. F.; SANZ, B. Utilizacion de bacterias lácticas em el control de microorganismos patógenos de los alimentos. **Microbiologia SEM**, Madri, v. 9, n. 3, p. 37-48, 1993.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 343-362, jan. 1995.

HOSSEINI, S. M.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; GERMAN, J. B.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; KHAKSAR, R. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 573-580, 2014.

JAY, J. **Modern food microbiology**, 6 th ed, Maryland: An Aspen publication, 2000. 635 p.

JOZALA, A. F.; ANDRADE, M. S.; ARAUZ, L. J.; PESSOA JR., A.; PENNA, T. C. V. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 515-528, 2007.

JYOTHY SRI, S.; SEETHADEVI, A.; SURIA PRABHA, K.; MUTHUPRASANNA, P.; PAVITRA, P. Microencapsulation: a Review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 1, p. 509-531, março 2012.

KLANDER, O., Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.49, p. 209-224, 1983.

KOPERMSUB, P.; MAYEN, V.; WARIN, C. Potencial use of niosomes of encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. **Food Research International**, v. 44, p. 605-612, 2011.

LARIDI, R.; KHEADR, E. E.; O BENECH, R.; VUILLEMARD, J. C.; LACROIX, C.; FLISS, I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 325–336, 2003.

MAQUEDA, M.; GALVEZ, A.; BUENO, M. M.; SANCHEZ-BARRENA, M. J.; GONZALEZ, C.; ALBERT, A.; RICO, M.; VALDIVIA, E. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 5, n. 5, p. 399-416, 2004.

MARCHAL, L. M.; BEEFTINK, H. H.; TRAMPER, J. Towards a rational design of comercial maltodextrins. **Trends in Food Science & Techonology**, v. 10, p. 345-355, 1999.

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

METLITSKAYA, A.; KAZOKOV, T.; KOMMER, A.; PAVLOVA, O.; PRAETORIUS-IBBA, M.; IBBA, M.; KRASHENINNIKOV, I.; KOLB, V.; KHMEL, I.; SEVERINOV, K. Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C. **The Journal of Biological chemistry**, v. 281, n. 26, p. 18033–18042, jun. 2006.

NARSAIAH, K.; JHA, S. N.; WILSON, R. A.; MANDGE, H. M.; MANIKANTAN, M. R. Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum. **Journal Food of Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 4054-4059, dez. 2014.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. Review article. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n. 2, p. 120-127, abr./jun. 2008.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593–604, maio-jun. 2002.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641-650, ago./set. 2010.

PARKS, W. M., BOTTRILL, A. R., PIERRAT, O. A., DURRANT, M. C.; MAXWELL, A. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. **Biochimie**, v. 89, n. 4, p. 500–507, abril 2007.

PENNA, T. C. V.; JOZALA, A. F.; GENTILE, T. R.; PESSOA JR., A.; CHOLEWA, O. Detection of nisin expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the effects of nisin with EDTA. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 334-346, 2006.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 12, 2007.

PILIZOTA, V.; SUBARIC, D.; LOVRIC, T. Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. **Food Technology and Biotechnology**, v. 34, v. 2-3, p. 87-90, 1996.

PODKOWIK, M.; PARK, J. Y.; SEO, K. S.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 34-40, 2013.

REDDY, K. V.; ARANHA, C.; GUPTA, S. M.; YEDERY, R. D. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. **Reproduction**, v. 128, p. 117-126, 2004.

RILLA, N.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ, A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. **Journal of Food Protection**, Des Mones, v. 67, n. 5, p. 928-933, 2004.

RODRIGUES, F. M.; SANTOS, O.; GELATTI, L. C. Staphylococcus aureus: uma revisão. **Revista Fasem Ciências**, v. 2, n. 2, p. 90-101, jul./dez. 2012.

ROSE, N. L.; SPORNS, P.; STILES, M. E.; McMULLEN, L. M. Inactivation of nisin by glutathione in fresh meat. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 759–762, 1999.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p. 1288-1294, 1990.

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

SADEGHI, A.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S. A.; MAHALATI, M. N. Evaluation of different parameters effect on maltodextrina by α -amylase Termamyl 2-x. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, n. 1, p. 34-39, 2008.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, jul./set. 2010.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1-13, 2008.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 58-64, maio 1996.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, jan./mar. 2003.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 1-20, 1990.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 722-756, set. 1976.

TEERAKARN, A.; HIRT, D. E.; ACTON, J. C.; RIECK, J. R.; DAWSON, P. L. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 3019–3025, out. 2002.

VALDUGA, A. T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J. R. D. Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 184-189, mai/ago 2003.

VENKATA NAGA JYOTHI, N.; MUTHU PRASANNA, P.; NARAYAN SAKARKAR, S.; K. PRABHA, S.; SEETHA RAMAIAH, P.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/215520624_Microencapsulation_techniques_factors_influencing_encapsulation_efficiency>. Acesso em: 10 março 2015.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin productions by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 271-280, 1996.

WIRAWAN, R. E.; KLESSE, N. A.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1148-1156, 2006.

XIAO, D.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1977-1985, 2011a.

XIAO, D.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Spray-dried zein capsules with coencapsulated nisin and thymol as antimicrobial delivery system for enhanced antilisterial properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7393-7404, 2011b.

ZHAO, X.; MENG, R.; SHI, C.; LIU, Z.; HUANG, Y.; ZHAO, Z.; GUO, N.; YU, L.
Analysis of the gene expression profile of *Staphylococcus aureus* treated with nisin.
Food Control, v. 59, p. 499-506, 2016.

ANEXOS

ANEXO 1 - Ficha técnica da nisina comercial – NISAPLIN.....	69
ANEXO 2 - Tabela da ANOVA para a determinação do rendimento do processo de secagem por aspersão (realizado com Microsoft Excel 2013).....	72
ANEXO 3 - Tabela do Teste de Tukey para a determinação do rendimento do processo de secagem por aspersão (realizado no software ACTION - ESTATCAMP, São Carlos/SP).....	73
ANEXO 4 - Tabela da ANOVA para a atividade de água nas 6 amostras após a secagem por aspersão (realizado no Microsoft Excel 2013).....	74
ANEXO 5 - Tabela do Teste de Tukey para a atividade de água nas 6 amostras após a secagem por aspersão (realizado no software ACTION - ESTATCAMP, São Carlos/SP).....	75
ANEXO 6 - Diâmetro do halo de inibição das amostras no teste de atividade antimicrobiana sobre <i>S. aureus</i>	76
ANEXO 7 - Curva padrão do halo de inibição da nisina comercial sobre o <i>Staphylococcus aureus</i>	77
ANEXO 8 - Tabela da ANOVA para a determinação da concentração de nisina no produto final da secagem por aspersão (realizado no Windows Excel 2013)	78
ANEXO 9 - Tabela do Teste de Tukey para a determinação do da concentração de nisina no produto final da secagem por aspersão (realizado no software ACTION – ESTATCAMP, São Carlos/SP).....	79

ANEXO 1 – Ficha técnica da Nisina Comercial - NISAPLIN

CULTURES DIVISION
 food.protection@danisco.com
 www.danisco.com

Página 1 / 3

DANISCO

First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 214210-4.0PT

Código do material 114374

Nisaplin®

Natural Antimicrobial; Food protectant; 1 kg.

Descrição

Nisaplin® é um antibacteriano natural baseado em nisina, a qual é um polipeptídeo produzido por fermentação utilizando cepas de 'Lactococcus lactis' subsp 'lactis'.

Áreas de aplicação

Nisaplin® é efetivo em uma variedade de produtos alimentícios em uma ampla faixa de pH (3,5-8,0), incluindo queijos processados e queijos espalháveis (cheese spreads), club cheese, queijos blendados, queijos frescos diretamente acidificados, queijos maturados; produtos cremosos assim como aromatizadas, batidas, espessadas, sour cream, etc.; sobremesas lácteas à base de gordura, iogurte e leite aromatizado e leite recombinado; preparações de frutas e de vegetais incluindo polpa, sucos de fruta pasteurizados, bebidas à base de proteína vegetal e leite de côco; molhos e snacks; produtos de ovo líquido pasteurizado; molhos de baixo pH e coberturas incluindo maionede e molhos para saladas; sopas e molhos pasteurizados; vegetais enlatados; carnes processadas; pratos quentes de produtos à base de farinha como crumpets; processo fermentativo; e produto de fermentação como cerveja.

Benefícios potenciais

- Inibe efetivamente o crescimento de uma vasta gama de bactérias Gram-positivas
- Aumenta a vida de prateleira
- Atende a demanda dos consumidores por produtos naturais
- Melhora a qualidade do produto

Dosagens

A dosagem recomendada de Nisaplin® está na faixa de 25-500 mg por kg ou litro de alimento. A dosagem exata não pode ser determinada pois depende da natureza do produto para o qual o uso é pretendido.

Instruções de uso

Nisaplin® deve ser adicionado a alimentos processados pelo calor em uma dispersão no substrato do alimento antes do processo de aquecimento.

Nisaplin® pode ser adicionado diretamente ao alimento como um pó seco ou como uma pré suspensão em água ou em leite.

Em algumas situações de processamento pode haver necessidade de adicionar Nisaplin® por outros métodos, como mergulho ou alternativamente depois do processo de fermentação, ex. iogurte batido. Recomendações para estas áreas de aplicação específicas em alimentos devem ser requisitadas se necessário.

Composição

Nisaplin® é composto por:

Nisina / Nisina preparación	mín. 1000 iu por mg
Cloreto de sódio	mín. 50 %

Todas as porcentagens são por peso.

Especificações físico-químicas

Forma à 25°C	pó
Cor	creme a marrom claro
pH de solução 10%	3.3-3.8
Umidade (LOD)	aprox. 1 %

Variações de cor podem ocorrer de lote para lote.

Especificações microbiológicas

Bactérias aeróbicas mesofílicas	máx. 10 UFC/g
Escherichia coli	Ausente em 25 g
Salmonella	Ausente em 25 g
Staphylococcus coagulase-positiva	Ausente em 25 g

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 214210-4.0PT

Código do material 114374

Nisaplin®

Natural Antimicrobial; Food protectant; 1 kg.

Especificações de metais pesados

Arsênio (As)	máx. 1 ppm
Mercúrio (Hg)	máx. 1 ppm
Chumbo (Pb)	máx. 1 ppm
Metais pesados como chumbo	máx. 2 ppm
Outros metais	
Cobre	máx. 50 ppm
Zinco	máx. 25 ppm
Cobre + zinco	máx. 50 ppm

Dados nutricionais

Valores aproximados para rotulagem nutricional por 100g. Contribuição energética é insignificante nos níveis de uso recomendados.

Energia	200 kJ/100g
Proteína	4.9 g/100g
Carboidrato	6.4 g/100g
Gordura	0.3 g/100g
Cinzas	87.3 g/100g
Umidade	1.1 g/100g
Sódio total	32.7 g/100g

Estocagem

Condições:

Armazenar fechado entre 4-25°C em local seco, protegido de luz solar direta.

Quando aberto, armazenar entre 4-25°C em embalagem original em local seco, protegido de luz solar direta.

Validade é de 24 meses quando armazenado de acordo com as recomendações.

Embalagem

Nisaplin® está disponível em frascos de polietileno de 1 kg, com selos de proteção.

Pureza e legislação

A nisina em Nisaplin® é de grau alimentício e cumpre com o Código de Regulamentações Federais dos Estados Unidos.

Esta versão do certificado Kosher Pareve de Nisaplin® contém nisina, e está de acordo com as especificações de pureza estabelecidas pela FAO/WHO, UE, Food Chemicals Codex e FDA. A legislação que governa o uso de nisina varia consideravelmente nos países onde é aprovada.

Legislação local alimentícia e/ou de ração animal deve ser sempre consultada relacionado ao status deste produto, já que legislação referente ao uso deste em alimentos ou ração animal pode variar dependendo do país. Aconselhamento referente ao status legal deste produto está disponível sob requisição.

Segurança e manuseio

Uma Ficha de Segurança de Produtos Químicos está disponível se requisitada.

País de origem

Reino Unido

Status Kosher

Este produto é certificado pela União Ortodoxa (Manchester Beth Din, Reino Unido) como kosher pareve.

Status Halal

Este produto é certificado Halal pelo Islamic Food Council da Europa.

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 214210-4.0PT

Código do material 114374

Nisaplin®

Natural Antimicrobial; Food protectant; 1 kg.

Status GMO

De acordo com a legislação CE nos. 1829/2003 e 1830/2003:

As matérias-primas e coadjuvantes de processo utilizados na produção deste produto não contêm ou consistem em OGMs, e não são produzidos a partir de OGMs.

Questionário foi utilizado como documentação.

Alergênicos

A tabela abaixo indica a presença (como componente adicionado) dos seguintes alergênicos e produtos destes:

Sim	Não	Alergênicos	Descrição dos componentes
	X	trigo	
	X	outros cereais que contêm glúten	Cevada usada como ingrediente nutriente para a fermentação
	X	Crustáceos	
	X	Ovos	
	X	Peixe	
	X	Amendoim	
	X	Soja	
	X	Leite (incluindo lactose)	
	X	Nozes	
	X	Aipos	
	X	Mostarda	
	X	Sementes de gergelim	
	X	Dióxido de enxofre e sulfitos (>10 mg/kg)	
	X	Tremoço	
	X	Moluscos	

Utilizado como nutriente para fermentação. O produto final é submetido ao teste de glúten através do método R5/Mendez e o resultado não é detectável (nível de detecção: 10 ppm). A Danisco determinou que nutrientes para fermentação estão fora do escopo dos requisitos legais de rotulagem de alergênicos dos Estados Unidos e Europa. Legislação local referente a requisitos legais de rotulagem de alergênicos deve ser sempre consultada já que pode haver variações dependendo do país. Legislação local referente a requisitos legais de rotulagem de alergênicos deve ser sempre consultada já que pode haver variações com dependendo do país.

ANEXO 2 – Tabela da ANOVA para a determinação do rendimento do processo de secagem por aspersão (realizado no Microsoft Excel 2013).

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	2	126,87500	63,43750	0,11815
Coluna 2	2	129,18210	64,59105	4,07534
Coluna 3	2	113,61111	56,80556	1,50704
Coluna 4	2	127,77778	63,88889	2,67918
Coluna 5	2	89,25325	44,62662	2,36602
Coluna 6	2	97,45283	48,72642	0,67689

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	736,2	5	147,24469	77,34369	2,300 E-05	4,38737
Dentro dos grupos	11,42	6	1,90377			
Total	747,6	11				

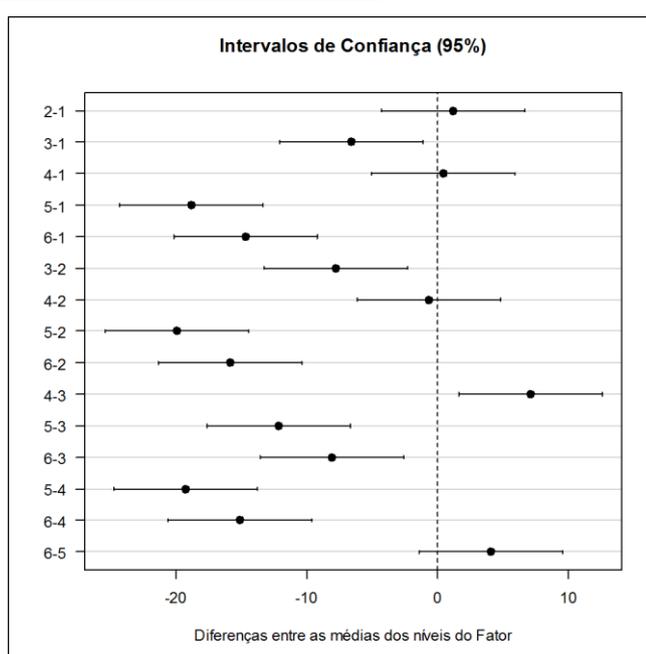
ANEXO 3 – Tabela do Teste de Tukey para a determinação do rendimento do processo de secagem por aspensão (realizado no software ACTION - ESTATCAMP, São Carlos/SP).

TESTE DE TUKEY

<i>Tabela da Anova</i>					
	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	5	736,2234412	147,2446882	77,34369587	0,000023002382
Resíduos	6	11,42262623	1,903771039		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
2-1	1,15354926	-4,337732235	6,644830755	0,949362458
3-1	-6,6319445	-12,12322599	-1,140663005	0,021593848
4-1	0,45138865	-5,039892845	5,942670145	0,999208540
5-1	-18,8108765	-24,30215797	-13,31959499	0,000079253
6-1	-14,711085	-20,20236644	-9,219803455	0,000322525
3-2	-7,78549376	-13,27677525	-2,294212265	0,009952938
4-2	-0,70216061	-6,193442105	4,789120885	0,993769656
5-2	-19,9644257	-25,45570723	-14,47314425	0,000055839
6-2	-15,8646342	-21,3559157	-10,37335272	0,000210146
4-3	7,08333315	1,592051655	12,57461464	0,015807330
5-3	-12,178932	-17,67021347	-6,687650485	0,000930839
6-3	-8,07914045	-13,57042194	-2,587858955	0,008267238
5-4	-19,2622651	-24,75354662	-13,77098364	0,000069008
6-4	-15,1624736	-20,65375509	-9,671192105	0,000271748
6-5	4,09979153	-1,391489965	9,591073025	0,151331452

<i>Amostra</i>	<i>Médias</i>	<i>Grupos</i>
2	64,59	a
4	63,89	a
1	63,44	a
3	56,81	b
6	48,73	c
5	44,63	c



ANEXO 4 – Tabela da ANOVA para a atividade de água nas 6 amostras após a secagem por aspersão (realizado no Microsoft Excel 2013).

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	2	0,577	0,2885	8,45E-05
Linha 2	2	0,564	0,282	0,000162
Linha 3	2	0,505	0,2525	0,0002645
Linha 4	2	0,563	0,2815	4,5E-06
Linha 5	2	0,723	0,3615	0,0001805
Linha 6	2	0,545	0,2725	0,0003125

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,014	5	0,00278515	16,57005454	0,001869473	4,387374187
Dentro dos grupos	0,001	6	0,000168083			
Total	0,015	11				

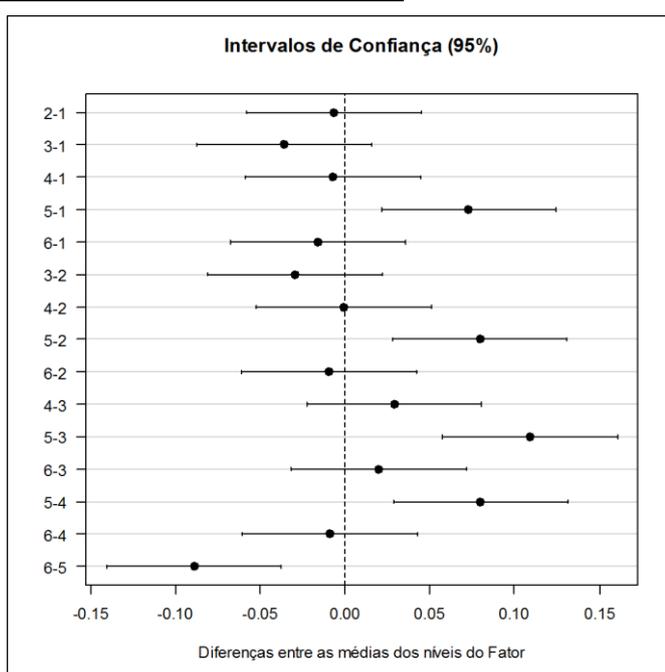
ANEXO 5 – Tabela do Teste de Tukey para a atividade de água nas 6 amostras após a secagem por aspersão (realizado no software ACTION - ESTATCAMP, São Carlos/SP).

TESTE DE TUKEY

Tabela da Anova					
	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	5	0,0139	0,00278515	16,57005454	0,001869473
Resíduos	6	0,001	0,000168083		

Níveis	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor
2-1	-0,006	-0,058	0,045097502	0,994175965
3-1	-0,036	-0,088	0,015597502	0,188246407
4-1	-0,007	-0,059	0,044597502	0,991874288
5-1	0,073	0,0214	0,124597502	0,010058264
6-1	-0,016	-0,068	0,035597502	0,808108123
3-2	-0,03	-0,081	0,022097502	0,326710664
4-2	-5E-04	-0,052	0,051097502	0,999999998
5-2	0,0795	0,0279	0,131097502	0,006538971
6-2	-0,01	-0,061	0,042097502	0,969968381
4-3	0,029	-0,023	0,080597502	0,340374185
5-3	0,109	0,0574	0,160597502	0,001217928
6-3	0,02	-0,032	0,071597502	0,655420577
5-4	0,08	0,0284	0,131597502	0,006332325
6-4	-0,009	-0,061	0,042597502	0,975957412
6-5	-0,089	-0,141	-0,037402498	0,003635955

Fator	Médias	Grupos
5	0,3615	a
1	0,2885	b
2	0,282	b
4	0,2815	b
6	0,2725	b
3	0,2525	b



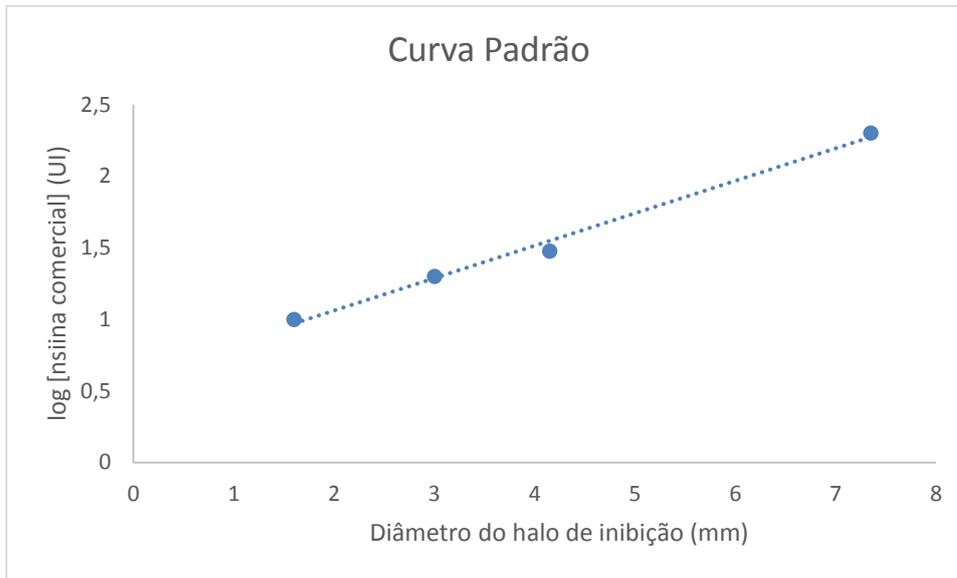
ANEXO 6 – Diâmetro (mm) do halo de inibição das amostras no teste de atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* com os meios de cultivo testados com objetivo de escolher o melhor meio para este teste.

Diluição UI/mL	Amostra	Ágar Sal Manitol		Ágar Muller Hinton	
		Halo de inibição (mm) ¹	Halo de inibição (mm) ²	Halo de inibição (mm) ¹	Halo de inibição (mm) ²
100.000	Padrão	9	8	9,7	9,5
10.000	Padrão	8	6	9	8,7
1.500	Padrão	-	1	5,4	5,7
1.000	Padrão	-	-	4,7	5
500	Padrão	-	-	2,5	3
100.000	A	9,5	13	9,4	8,8
10.000	A	7,5	-	6	6
1.500	A	-	-	3	2,5
1.000	A	-	-	1,5	1,7
500	A	-	-	1	1,5
100.000	B	9	11	9	9,2
10.000	B	5	7	6,3	7
1.500	B	-	-	2,8	3,5
1.000	B	-	-	2	2,2
500	B	-	-	-	-
100.000	C	9	15	9,4	10
10.000	C	6	8	5	6
1.500	C	-	-	1,3	2
1.000	C	-	-	0,8	1
500	C	-	-	-	-
100.000	D	10	11	9,25	9,5
10.000	D	-	8,5	6,2	6,7
1.500	D	-	-	3	3,6
1.000	D	-	-	2,2	2,4
500	D	-	-	-	-
100.000	E	6	12	8,2	8,5
10.000	E	8	-	6,5	7,3
1.500	E	2	-	3,7	3,9
1.000	E	-	-	2,8	2,6
500	E	-	-	-	2,5
100.000	F	5	7	7,5	7,7
10.000	F	5	8	6	5,7
1.500	F	-	-	2,7	3
1.000	F	-	-	1,7	1,7
500	F	-	-	-	-
Controle Negativo		-	-	-	-

¹ – Primeira análise

² – Repetição da análise

ANEXO 7 – Curva padrão do halo de inibição da nisina comercial sobre o *Staphylococcus aureus*.



$$y = 0,2265x + 0,6083; R^2 = 0,9926$$

ANEXO 8 – Tabela da ANOVA para a determinação da concentração de nisina no produto final da secagem por aspersão (realizado no Microsoft Excel 2013).

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
1	3	145,8240522	48,60801741	0,540177081
2	3	191,3141686	63,77138953	26,40822165
3	3	98,69959671	32,89986557	30,23051417
4	3	196,1444607	65,3814869	12,88119466
5	3	247,9133803	82,63779342	10,69660641
6	3	147,2617745	49,08725816	8,427528897

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	4461,67805	5	892,33561	60,03317949	4,49964E-08	3,105875
Dentro dos grupos	178,3684857	12	14,86404048			
Total	4640,046536	17				

ANEXO 9 – Tabela do Teste de Tukey para a determinação do da concentração de nisina no produto final da secagem por aspensão (realizado no software ACTION - ESTATCAMP, São Carlos/SP).

TESTE DE TUKEY

Tabela da Anova					
	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	5	4461,7	892,33561	60,03317949	4,49964E-08
Resíduos	12	178,37	14,86404048		

Níveis	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor
2-1	15,16337212	4,5898	25,73696496	0,0043541170523
3-1	-15,7081518	-26,28	-5,134559002	0,0032876471403
4-1	16,77346949	6,1999	27,34706232	0,0019152628763
5-1	34,02977601	23,456	44,60336885	0,0000018162227
6-1	0,479240746	-10,09	11,05283358	0,9999850862555
3-2	-30,871524	-41,45	-20,29793113	0,0000051898064
4-2	1,610097362	-8,963	12,1836902	0,9946807115759
5-2	18,86640389	8,2928	29,43999672	0,0006884147015
6-2	-14,6841314	-25,26	-4,110538543	0,0055881527249
4-3	32,48162132	21,908	43,05521416	0,0000030077189
5-3	49,73792785	39,164	60,31152068	0,0000000254254
6-3	16,18739258	5,6138	26,76098542	0,0025742733375
5-4	17,25630652	6,6827	27,82989936	0,0015055754514
6-4	-16,2942287	-26,87	-5,720635906	0,0024384836984
6-5	-33,5505353	-44,12	-22,97694243	0,0000021188818

Fator	Médias	Grupos
5	82,63779342	a
4	65,3814869	b
2	63,77138953	b
6	49,08725816	c
1	48,60801741	c
3	32,89986557	d

