



GENOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO ANTIBACTERIANO DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* R 10 FRENTE A CÉLULAS VERO*

Denys SCHULZ**

Thiago CAON***

Carolina Schmanech MUSSI****

Cláudia Maria Oliveira SIMÕES*****

Cleide Rosana Vieira BATISTA*****

■RESUMO: O presente estudo teve como objetivo obter um extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, e investigar sua genotoxicidade frente a células VERO. O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi obtido por técnicas de precipitação de proteínas, centrifugação, diálise e esterilização por filtração. A padronização do teste de genotoxicidade foi realizada pela determinação da concentração de proteínas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. A investigação da genotoxicidade com células VERO ATCC-CCL 81 foi realizada pelo Ensaio do Cometa, utilizando-se 60, 80 e 100µg de proteína do extrato bruto. Como controle positivo utilizou-se lâminas preparadas com células VERO tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 não foi genotóxico para células VERO na concentração de 60µg/mL, porém apresentou genotoxicidade nas concentrações de 80 e 100 µg/mL. O indicativo de genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresentado no Ensaio do Cometa, indica a necessidade da realização de análises toxicológicas *in vivo*.

■PALAVRAS-CHAVE: Genotoxicidade; *Bacillus amyloliquefaciens*; células VERO.

INTRODUÇÃO

O processamento moderno dos alimentos depende de várias tecnologias de conservação para assegurar níveis aceitáveis de qualidade desde a produção até o consumo. Assim, deu-se o início do uso de bioconservadores, onde o desenvolvimento de microrganismos em alimentos é controlado pela adição de substâncias conhecidas como bacte-

riocinas, que são peptídeos antimicrobianos produzidos por uma grande variedade de bactérias, particularmente bactérias lácticas (BAL) e *Bacillus*.^{3, 13, 16}

A natureza química das bacteriocinas e de várias toxinas (hemolisinas) faz com que essas substâncias sejam degradadas no trato gastrointestinal de homens e animais, muitas vezes perdendo sua toxicidade.¹⁴ Segundo Marugg¹⁰, estudos realizados com várias bacteriocinas indicaram que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos. Até o presente, as únicas bacteriocinas produzidas para conservação de alimentos são a nisina e a pediocina PA-1, vendidas com os nomes comerciais de Nisaplin® e Alta®, respectivamente.^{6, 12}

Frente a essa realidade, Schulz²⁰ investigou a citotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 isolado por Batista.²

Em continuidade aos estudos realizados, esse trabalho teve como objetivo investigar a genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, com o intuito de utilizá-lo como conservador natural de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Extrato Bruto Antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi obtido por técnicas de precipitação de proteínas, centrifugação, diálise e esterilização por filtração conforme Figura 1.²⁰

* Trabalho elaborado com apoio financeiro da CAPES, sob a forma de Doutorado em Ciência dos Alimentos do primeiro autor.

** Analista A – Gestão Estratégica de PD&I – Embrapa Cerrados – 73310-970 – Planaltina – DF – Brasil.

*** Programa de Pós-Graduação Mestrado em Biotecnologia – Centro de Ciências Biológicas – UFSC – 88040-900 Florianópolis – SC – Brasil.

**** Estagiária – Laboratório de Virologia Aplicada do Centro de Ciências Biológicas – UFSC – 88040-900 – Florianópolis – SC – Brasil.

***** Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde – UFSC – 88040-900 - Florianópolis – SC – Brasil.

***** Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos – Centro de Ciências Agrárias – UFSC – 88034-001 – Florianópolis – SC – Brasil.

A padronização do teste de genotoxicidade foi realizada pela determinação da concentração de proteínas do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 utilizando o Kit de Ensaio para Dosagem de Proteínas Totais (Análise Diagnóstica - Método de Biureto) por comparação com padrão de albumina de soro bovino (BSA).

A leitura foi feita em espectrofotômetro (Hitachi U2010) a 545 nm.

Todos os ensaios foram realizados com o *pool* de extrato bruto, obtido pela mistura dos extratos brutos extraídos em água destilada. O *pool* foi concentrado por liofilização para obter as concentrações protéicas testadas nesse estudo (Liofilizador Terroni Favel LT1000/8).

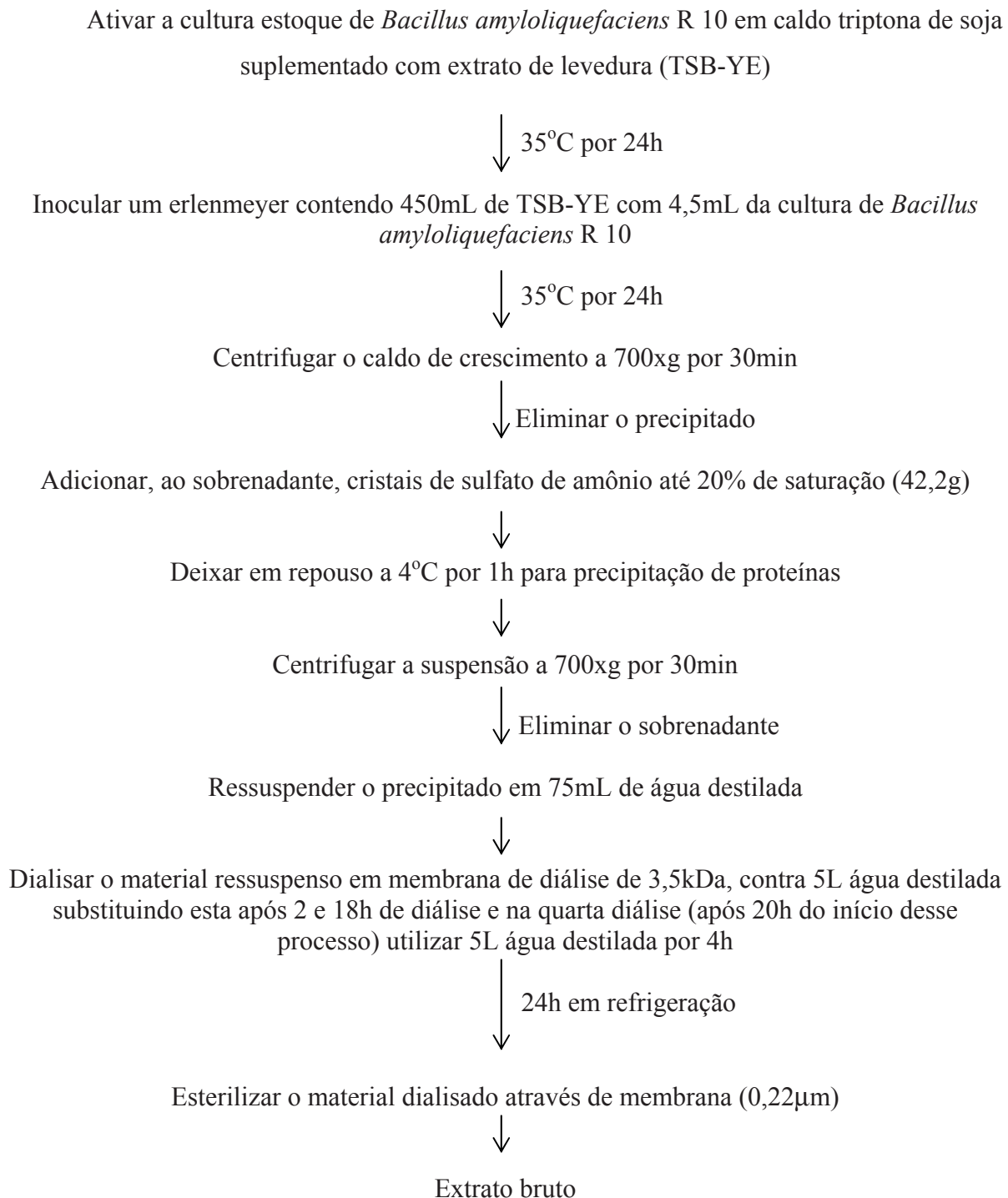


FIGURA 1 – Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. Fonte: Schulz,²⁰ com algumas modificações.

O processo de diálise foi monitorado qualitativamente com o reagente de Nessler, objetivando o controle da remoção de todo o sulfato de amônio utilizado no processo de precipitação.⁷

Triagem da Atividade Antibacteriana do Extrato Bruto

Listeria monocytogenes NCTC 098630 foi ativada em TSB-YE a 35°C por 24h. Para detecção da atividade inibitória do extrato bruto foram preparadas placas contendo ágar Triptona de Soja (Oxoid) suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura (Difco) - TSA-YE que, após solidificado, foi inoculado, por semeadura em superfície, com 0,1 mL de *Listeria monocytogenes* na concentração de 10⁵ UFC/mL.

Volumes de 10 µL do extrato bruto foram aplicados na superfície das placas de TSA-YE. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30min para difusão do extrato bruto no ágar e depois incubadas a 35°C por 24h. Após incubação foi realizada a leitura para observação dos halos de inibição. Esta triagem da atividade antibacteriana do extrato bruto foi realizada a cada extração e após o processo de liofilização.^{2, 20}

Genotoxicidade

Para avaliação da genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 foi utilizado o Ensaio do Cometa, segundo a técnica alcalina originalmente proposta por Singh et al.,²² com algumas modificações na preparação das lâminas propostas por Klaude et al.⁸ e de acordo com as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*.²³

O Ensaio do Cometa é um método de eletroforese em microgel, utilizado para a detecção e quantificação de quebras das fitas de DNA, em células individuais, usando microscopia.²²

a) Procedimento

As células VERO ATCC-CCL 81, foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 10⁵ células/mL, 1mL/cavidade), formando uma monocamada confluenta em 24h a 37°C/5% de CO₂. Essas células foram cultivadas em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100U/mL de estreptomicina/penicilina/fungizona. Após o tapete formado, cada uma das amostras foi adicionada à placa (500µL/cavidade), a qual foi incubada durante 90min, a 37°C/5% CO₂, para avaliação da indução de genotoxicidade por exposição aguda das células ao extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. As concentrações utilizadas do extrato bruto foram 60, 80 e 100µg de proteína. A amostra liofilizada testada continha 1000µg de proteína do extrato bruto.

Os controles positivos foram lâminas preparadas com células VERO tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 200 e 100µM, durante 90min, a 37°C/5% CO₂. A titulação da solução a 30% de H₂O₂ por permanganometria, foi realizada periodicamente, para garantir a concentração dos controles positivos. Os controles

negativos foram lâminas preparadas com células VERO não tratadas, ou seja, contendo apenas meio de manutenção, submetidas ao mesmo tratamento que as demais.

b) Preparação da suspensão celular

Após os tratamentos, o tapete celular de cada cavidade das placas foi lavado três vezes com 300µL de tampão fosfato de sódio (PBS) e então tripsinizado. Em cada cavidade, foram adicionados 150µL da solução de tripsina (0,05%):EDTA (0,02%), deixando-se agir por até 5min, para a obtenção da suspensão celular e a ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio MEM/5% soro fetal bovino - SFB (500µL/cavidade). A suspensão celular foi recolhida com auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugada a 350xg por 3min em tubo Falcon. Após o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram ressuspendidas com 200µL de meio MEM de forma a obter uma suspensão de aproximadamente 1x10⁸ células/mL. Essa suspensão celular foi, posteriormente, adicionada à agarose de baixo ponto de fusão (Gibco BRL) para formar a segunda camada sobre as lâminas. Foram utilizadas duas lâminas por tratamento.

c) Preparação das lâminas

Conforme as modificações propostas por Klaude et al.,⁸ foram utilizadas lâminas de microscópio foscas apenas numa das extremidades, desengorduradas, e que já tiveram uma primeira camada de agarose formada com uma solução de agarose de ponto de fusão normal (Gibco BRL) a 1,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio e deixadas à temperatura de 4°C para secagem. Após coloração e análise, as lâminas podem, ainda, ser secadas novamente e guardadas sem que haja perda importante de material ou alteração na aparência dos cometas.

Para cada lâmina foram usados 40µL da suspensão celular, previamente preparada e tratada, e 60µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio, mantida a 37°C. Uma lamínula de 24x60mm foi colocada sobre cada lâmina, imediatamente, para que a agarose não secasse, antes de se espalhar por toda lâmina. As lâminas foram deixadas a 4°C, por 15min, para a solidificação da agarose.

d) Lise celular

Em seguida, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram submersas em 100mL de solução de lise gelada (4°C), recém-preparada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris-HCl 10mM, qsp de NaOH 10N para obter pH 10) adicionada de 10% DMSO e 1% Triton X-100. As lâminas podem permanecer nesta solução, no mínimo, por 1h e, no máximo, por 30 dias.

e) Tratamento alcalino e eletroforese

Após a lise celular, as lâminas foram lavadas com PBS gelado com auxílio de uma pipeta Pasteur e submetidas ao tratamento alcalino em solução tampão de pH 13 (300mM NaOH e 1mM EDTA), previamente refrigerada, por 30min, em banho de gelo. A corrida de eletroforese foi feita numa cuba horizontal disposta num banho de gelo, com voltagem constante (25Volts) e amperagem de 280-

300mA, por 30min. Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA.¹⁵

f) Neutralização

Após eletroforese, as lâminas foram lavadas três vezes com uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), por 5min cada, sendo em seguida secadas e posteriormente colocadas numa cuba com etanol absoluto por alguns segundos. Após secagem, as lâminas foram submetidas à coloração.

g) Coloração

As lâminas foram coradas com 30µL de uma solução aquosa de brometo de etídeo a 20µg/mL e cobertas com lamínulas. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV.¹⁷

h) Análise dos cometas

Após coradas, as lâminas foram avaliadas, imediatamente, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm, com aumento de 400X.

A análise dos cometas foi realizada visualmente, conforme classificação proposta por Kobayashi et al.,⁹ seguindo algumas modificações introduzidas por Miyamae et al.¹¹

Através da análise microscópica, os cometas foram classificados em cinco categorias: classe I, sem cauda; classe II, cometas com pequenas caudas (comprimento da cauda menor que 25% do diâmetro da cabeça); classe III, cometas com caudas médias (comprimento da cauda entre 25 e 100% do diâmetro da cabeça); classe IV, cometas com caudas longas (comprimento da cauda maior do que o diâmetro da cabeça); e classe V, cometas mal definidos ou com cabeças pequenas.⁹

Cinquenta células foram analisadas, ao acaso, na região central de cada lâmina e diferenciadas visualmente em cinco classes, utilizando-se um escore, onde foram atribuídos valores 0, 1, 2, 3 e 4 para as classes I, II, III, IV e V, respectivamente, conforme Figura 2.^{4, 5, 21} Os cometas localizados nas bordas do gel não foram quantificados a fim de evitar resultados falso-positivos.

Análise Estatística

Os resultados da avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa foram submetidos ao teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de significância de 5%. Os dados foram obtidos de três ensaios independentes, cada um em duplicata. Os valores referentes às repetições foram obtidos mediante somatório dos resultados experimentais, para as diferentes classes de cometas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagem de Proteínas do Extrato Bruto

O pool de extratos brutos obtido em água apresentou 283,88µg de proteína/mL.

Triagem da Atividade Antibacteriana do Extrato Bruto

O pool de extratos brutos apresentou atividade antibacteriana frente *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, tanto antes quanto após a liofilização.

Genotoxicidade

O extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amylo-liquefaciens* R 10 não foi genotóxico para células VERO na concentração de 60µg/mL, haja vista que não se diferenciou, estatisticamente, do controle negativo. As demais concentrações testadas, 80 e 100 µg/mL, foram genotóxicas para células VERO (Tabela 1).

Analisando-se a Tabela 1, constata-se que o extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 na concentração de 100µg/mL foi altamente genotóxico para células VERO, pois não se diferenciou, estatisticamente, dos controles positivos. Já na concentração de 80µg/mL apresentou uma genotoxicidade intermediária, pois se constatou uma diferença estatística significativa, tanto em relação ao controle negativo, quanto em relação aos controles positivos.

Cabe ressaltar, que mesmo em função da ausência de genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano na concentração de 60µg/mL, não devemos descartar o indicativo de genotoxicidade apresentado nas demais concentrações

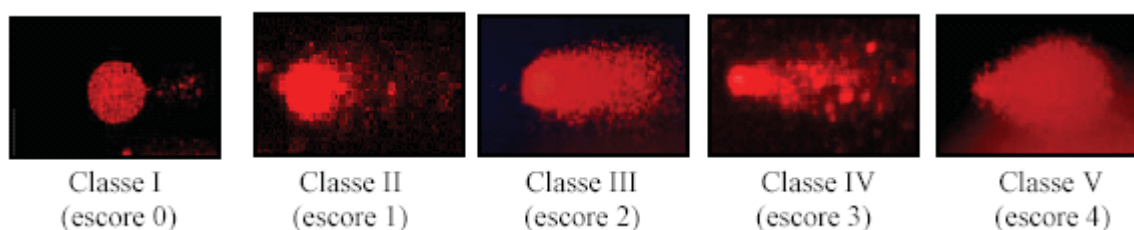


FIGURA 2 – Diferenciação das classes dos cometas em ensaios de genotoxicidade.

Fonte: Savi.¹⁹

Tabela 1 – Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 utilizando-se células VERO.

Concentração	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média	Desvio-padrão	Tratamento Estatístico
100µg/mL	215	162	144	173,67	36,91	a
80µg/mL	120	126	89	111,67	19,86	b
60µg/mL	81	46	38	55,00	22,87	c
C (+) 100 µM	160	147	174	160,33	13,50	a
C (+) 200 µM	197	151	189	179,00	24,58	a
C (-)	34	34	37	35,00	1,73	c

Os valores referentes às repetições foram obtidos mediante somatório dos resultados experimentais, para as diferentes classes de Cometa, seguindo-se as classificações de Silva et al.²¹. C(+). Controle positivo; C(-) Controle negativo. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os grupos; teste SNK.

testadas. Assim, esses resultados foram importantes para justificar a realização dos estudos toxicológicos *in vivo* do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10.

Poucos estudos de genotoxicidade *in vitro* têm sido realizados com bacteriocinas para uso em alimentos. Esses ensaios conseguem detectar a maioria das substâncias ou seus metabólitos genotóxicos, porém os resultados positivos precisam ser confirmados com ensaios de toxicidade *in vivo*.¹

Tanto os ensaios de genotoxicidade quanto os de toxicidade de dose repetida são fundamentais para avaliação da segurança dos aditivos alimentares, sendo importantes na predição de toxicidade e identificação dos alvos de toxicidade. Em alguns casos, quando constatada toxicidade em tecidos ou órgãos-alvos, torna-se necessário à realização de ensaios complementares para investigação definitiva da segurança desses compostos.¹

Levando-se em consideração a crescente resistência ao uso de nisina e outras bacteriocinas em alimentos por certos países, principalmente da União Européia, deve-se considerar a necessidade de estudos sistemáticos de mutagenicidade, teratogenicidade, de efeitos alérgicos, genotoxicidade, bem como de ação dessas substâncias na microbiota intestinal, haja vista a possibilidade de resistência cruzada desses antimicrobianos com os antibióticos utilizados rotineiramente no combate a infecções.²⁴

Recentemente, Sasaki et al.¹⁸ investigaram a genotoxicidade *in vivo* de 39 aditivos alimentares em uso, pertencentes a seis categorias: (1) corantes, (2) fixadores de cor, (3) conservantes, (4) antioxidantes, (5) fungicidas e (6) adoçantes. No estudo foram testados grupos de quatro camundongos machos tratados por via oral com cada aditivo na dose de até 0,5xDL₅₀ ou dose limite (2.000mg/kg). Os animais foram sacrificados 3 e 24h após o tratamento e suas

visceras (estômago, cólon, fígado, rins, bexiga, pulmão, cérebro e medula óssea) submetidas ao Ensaio do Cometa. De todos os aditivos, os corantes foram os mais genotóxicos, induzindo danos no DNA do estômago, cólon e/ou bexiga. Todos os corantes induziram danos no DNA dos órgãos gastrintestinais nas doses mais baixas testadas (10 ou 100mg/kg). Dois antioxidantes, três fungicidas e quatro adoçantes também induziram danos no DNA dos órgãos gastrintestinais. Os autores acreditam que são necessárias avaliações de genotoxicidade *in vivo* em larga escala para os aditivos alimentares, em função do elevado número de pessoas expostas diariamente aos mesmos.

A genotoxicidade *in vivo* nem sempre resulta em carcinogenicidade, haja vista que esse ensaio detecta o dano no DNA após administração de dose única relativamente alta, enquanto carcinogenicidade é detectada após longo tratamento com doses relativamente menores. O desenvolvimento de tumores em órgãos-alvos não depende somente do nível inicial de dano induzido no DNA ou do seu reparo, mas também de outros fatores, como a produção de metabólitos reativos, sua distribuição e seus efeitos na proliferação celular.¹⁸

CONCLUSÃO

O extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 apresentou genotoxicidade frente a células VERO, indicando a necessidade da realização de análises toxicológicas *in vivo*.

SCHULZ, D.; CAON, T.; MUSSI, C.S.; SIMÕES, C.M.O.; BATISTA, C.R.V. Genotoxicity of the antibacterial crude extract from *Bacillus* as R 10 against VERO cells. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 19, n. 2, p. 153-158, abr./jun. 2008.

■**ABSTRACT:** The present study aims to obtain one antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10, and investigate its genotoxicity against VERO cells. The antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was obtained by techniques of precipitation of proteins, centrifugation, dialysis, sterilization and filtration. The standardization of genotoxicity test was performed by determining the concentration of protein in antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10. The investigation of genotoxicity with VERO ATCC-CCL 81 cells was realized by Comet assay, using 60, 80 and 100 µg of protein of the extract the crude. As positive control is used slides prepared with VERO cells treated with a solution of hydrogen peroxide (H₂O₂). The antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 was not genotoxic to VERO cells in the concentration of 60µg/mL, but showed genotoxicity in the concentrations of 80 and 100 µg/mL. The indicative of genotoxicity of antibacterial crude extract of *Bacillus amyloliquefaciens* R 10 presented in the Comet assay, indicates the need for the realization of toxicological analysis in vivo.

■**KEYWORDS:** Genotoxicity; *Bacillus amyloliquefaciens*; VERO cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARLOW, S. M. et al. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, Leicester, v. 40, p. 145-191, 2002.
2. BATISTA, C. R. V. **Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and on anthagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*.** 1993. 157 f. Tese (Doutorado) – University of Strathclyde, Glasgow, 1993.
3. CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 71, p. 1-20, 2001.
4. COLLINS, A. R. et al. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat. Res.**, v. 375, p. 183-193, 1997.
5. DA SILVA, A. G. Propriedades gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento.** Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p. 1-14.
6. DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Int. Dairy J.**, Cork, v. 16, p. 1058-1071, 2006.
7. FARMACOPÉIA brasileira: generalidades e métodos de análise. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 360p.
8. KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.
9. KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 2, n. 3, p. 103-115, 1995.
10. MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. **Food Biotechnol.** New York, v. 5, n. 3, p. 305-312, 1991.
11. MIYAMAE, Y. et al. Evaluation of a tissue homogenization that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutat. Res.**, v. 418, p. 131-140, 1998.
12. MORENO, I. et al. Efeito e modo de ação das bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1999.
13. PALMER, M. Cholesterol and activity of bacterial toxins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 238, p. 281-289, 2004.
14. PIARD, J. C. et al. Purification and parcial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNR 481. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 58, p. 279-284, 1992.
15. ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Review: single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J. Chromatogr. B**, v. 722, p. 225-254, 1999.
16. ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **Int. J. Food Microbiol.**, Cork, v. 2489, p. 1-14, 2002.
17. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3rd ed. New York: CSHL, 2001. 2100p.
18. SASAKI, Y. F. et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutat. Res.**, Hachinohe, v. 519, p. 103-119, 2002.
19. SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidante de compostos fenólicos.** 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
20. SCHULZ, D. **Caracterização parcial do extrato bruto produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* e ensaios preliminares de citotoxicidade.** 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
21. SILVA, J. et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.**, v.40 p.941-947, 2002.
22. SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.
23. TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.35, p. 206-221, 2000.
24. WESSELS, S.; JELLE, B.; NES, I. **Bacteriocins of the lactic acid bacteria: an overlooked benefit for food.** Horsholm: CHR Hansen, 1998. 85p.