

DETERMINAÇÃO DA CMI E CBM DE BACTERIOCINA FRENTE A SALMONELLA SPP. E LISTERIA MONOCYTOGENES

Camila Ramão Contessa¹

Guilherme Battú Gonçalo²

Luciano Almeida³

Caroline Costa Moraes⁴

Ana Paula Manera⁵

Resumo:

Em decorrência à ampla oferta de alimentos processados e com grande utilização de aditivos químicos, surge a preocupação com possíveis efeitos adversos à saúde, e por consequência a demanda por alimentos seguros visando assim uma alimentação saudável e uma maior qualidade de vida. O estudo teve por objetivo extração de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*, e o seu estudo quanto a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM) frente a bactérias patogênicas como *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Foram realizadas dez diluições do ELC para as análises de CMI e CBM e todas avaliadas quanto a atividade inibitória pelo método de microplacas. Onde se constatou a inibição no desenvolvimento de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* no extrato sem nenhum tratamento preliminar, apresentando inibição de $28,05 \pm 3,38\%$ e $6,7 \pm 0,5\%$ respectivamente. Foi constatado ainda a estabilidade do extrato frente a baixas concentrações do mesmo, apresentando $28,05 \pm 3,38\%$ de inibição sob *Salmonella* e $6,7 \pm 0,5\%$ frente a *Listeria monocytogenes*, ambos na concentração de 1:11, avaliada como sendo a concentração mínima inibitória (CMI), porém não apresentou efeito bactericida.

Palavras-chave: Bactéria láctica, patógenos, conservante natural

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

DETERMINAÇÃO DA CMI E CBM DE BACTERIOCINA FRENTE A SALMONELLA SPP. E LISTERIA MONOCYTOGENES

¹ Aluno de graduação. camilacontessa@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. guibattu10@gmail.com. Co-autor

³ Técnico administrativo . almeidahades@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. caroline.moraes@unipampa.edu.br. Orientador

⁵ Docente. ana.manera@unipampa.edu.br. Co-orientador

DETERMINAÇÃO DA CMI E CBM DE BACTERIOCINA FRENTE A *Salmonella* spp. E *Listeria monocytogenes*

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência à ampla oferta de alimentos processados e com grande utilização de aditivos químicos, surge a preocupação com possíveis efeitos adversos à saúde, e por consequência a demanda por alimentos seguros e que não sejam submetidos a um processamento intenso, visando assim uma alimentação saudável e uma maior qualidade de vida (CASTRO et al., 2011).

Grande parte dos alimentos de origem vegetal e animal possuem uma curta vida de prateleira, sendo muito suscetíveis à degradação microbiana. Por essa razão em muitos produtos são utilizados conservantes, os quais buscam impedir ou retardar a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas (BRASIL, 1997; NISINA, ...2016). Em resposta a possível potencialidade de efeitos tóxicos de conservantes químicos se tem a perspectiva de substituição de aditivos sintéticos por naturais, que segundo Gerhardt et al., (2012) apresentam-se como alternativas viáveis.

A utilização de bactérias ácido lácticas (BAL) em alimentos fermentados é uma forma de bioconservação devido a sua habilidade de produção de alguns compostos antimicrobianos como as bacteriocinas que são de natureza proteica, possuindo ação bacteriostática ou bactericida sob bactérias incluindo as patogênicas (DRECHSEL et al., 2011; FERREIRA, 2005; KLAENHAMMER, 1993).

Seu efeito bactericida ou bacteriostático se dá pela ação na parede celular do organismo alvo, inibindo a biossíntese ou acarretando na formação de poros na mesma, resultando na morte celular. A formação de poros ocorre em duas fases, no primeiro momento há o envolvimento das cargas positivas e resíduos polares da bacteriocina com os fosfolípidios de carga negativa, presentes na camada lipídica da membrana alvo, neste momento a bacteriocina se torna sensível ao ataque de enzimas proteolíticas. Contudo no segundo momento se tem a formação dos poros nas células alvo, ocorrendo desta forma a morte da célula (KLAENHAMMER, 1993).

Segundo Oliveira et al. (2009), a atividade antibacteriana de um agente pode ser avaliada a partir da menor quantidade necessária para inibir o crescimento de uma bactéria teste, sendo esta quantidade denominada concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, constatando-se seu efeito bacteriostático. Já o efeito bactericida é verificado como sendo a concentração mínima necessária que resulta na morte celular, ou seja, a concentração bactericida mínima (CBM).

Diante do exposto objetivou-se a extração de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*, e o seu estudo quanto a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM) frente a bactérias patogênicas como *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Uma vez que é de suma importância a averiguação destas concentrações para se estabelecer a quantidade necessária para uma futura adição em produtos alimentícios.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção do extrato livre de células

O presente trabalho foi inteiramente desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos na Universidade Federal do Pampa campus Bagé, onde inicialmente se realizou a ativação da cepa de *Lactobacillus sakei*, a qual havia sido previamente isolada pelo grupo de estudos e criopreservada a -14°C, essa reativação foi

possível a partir da utilização de caldo *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) a uma temperatura de 32°C e agitação de 150 rpm por um tempo de 24 h, após o processo de fermentação fez-se a centrifugação por 5500 rpm/15 minutos para remoção das células, visto que as bacteriocinas são compostos extracelulares, obtendo assim o extrato livre de células (ELC).

2.2 Diluição do ELC

Foram realizadas dez diluições do ELC para as análises de CMI e CBM, utilizando como diluente água peptonada estéril, assim como todo o material utilizado, onde que na primeira diluição tinha-se 1 mL do ELC para 2 mL totais, e assim sucessivamente (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10) (OLIVEIRA et al., 2009), sendo assim todas as diluições foram avaliadas quanto a atividade inibitória.

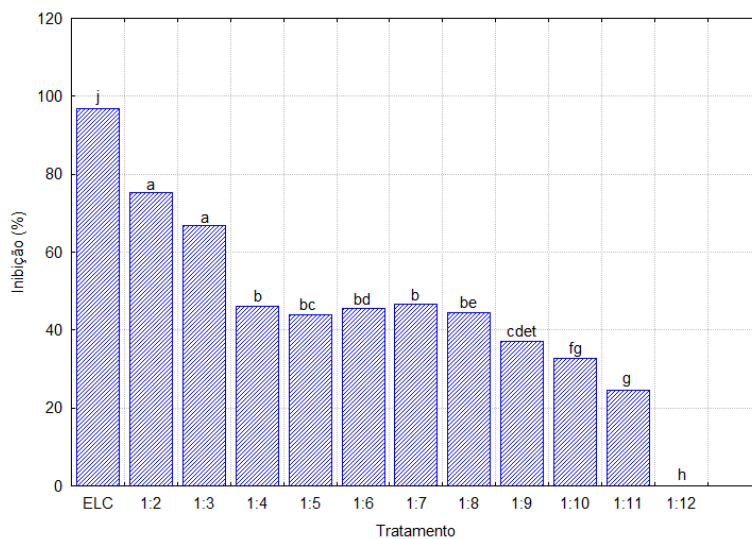
2.3 Atividade inibitória

O potencial antibacteriano foi realizado frente a *Salmonella* (isolada de um alimento) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) a partir da metodologia descrita na NCCLS (2003) pelo método de microplacas, a qual descreve uma adição de 145 µL de caldo Müller Hinton, 135 µL de extrato e 20 µL de cultura microbiana contaminante padronizada com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em cada poço da microplaca. O crescimento microbiano foi avaliado pela capacidade de turvação do meio, onde se utilizou-se de leitora de absorbância a um comprimento de onda de 630 nm, as leituras foram realizadas no tempo 0 e 16 h de incubação. Para avaliação dos resultados foi considerada a diferença da leitura inicial com a realizada após 16h, onde que os poços com menor variação de leitura indicaram possível ação antimicrobiana do extrato sob os micro-organismos, a diferença destes chamou-se de porcentagem de inibição.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A partir da metodologia empregada se alcançou os resultados apresentados nas Figuras 1 e 2, onde se constatou a inibição no desenvolvimento de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, no ELC, ou seja, o extrato sem nenhum tratamento preliminar, apresentando uma alta porcentagem de inibição em ambos os micro-organismos testados. Resultado promissor, uma vez que na grande maioria das bacteriocinas analisadas pela literatura, não se tem resultados positivos sob as duas estruturas de parede celular conhecidas (Gram-negativa e Gram-positiva). Barbosa (2013), por exemplo, ao utilizar uma bacteriocina produzida por "*Lactobacillus sakei* MBSa1" não observou atividade inibitória ao desenvolvimento de *Escherichia coli* em seus estudos, obtendo, contudo, resultado positivo contra diversas cepas de *Listeria monocytogenes* analisadas.

Figura 1 - Ação inibitória do extrato frente a *Salmonella*



Nota: Letras iguais

valores sem diferença significativa com $p < 0,05$ em teste Tukey.

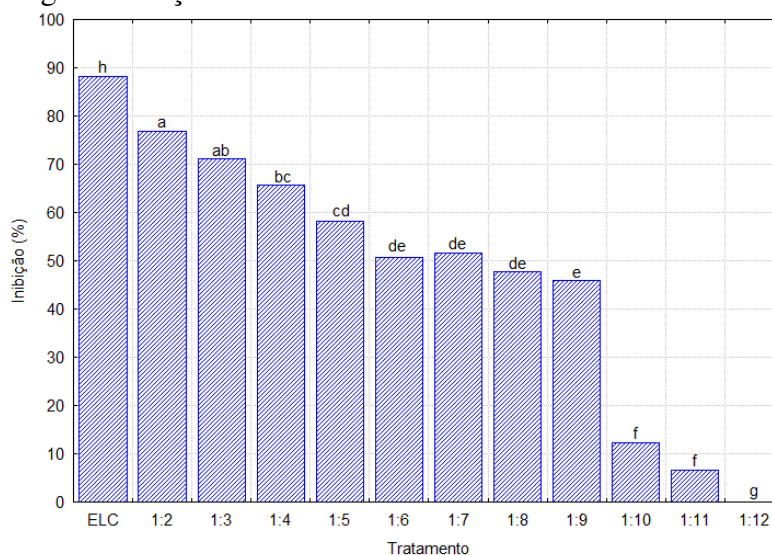
Fonte: Autores

representam

A partir da Figura 1 pode-se observar que o extrato não apresentou efeito bactericida sob a bactéria *Salmonella*, uma vez que apresentou $97,7 \pm 0,66\%$ de inibição no ELC (sem tratamento), porém o extrato se mostrou eficiente apresentando atividade inibitória até a diluição 1:11, resultado semelhante ao encontrado por Souza et al. (2017), que constatou em seus estudos uma CMI de extrato de bacteriocina na concentração de 1:9 frente a *Staphylococcus aureus*, porém no mesmo estudo constatou também atividade bactericida frente ao mesmo micro-organismo até a diluição de 1:3, diferente do analisado no presente estudo.

Gelinski (2003) também obteve em seus estudos resultados satisfatórios com extrato de bacteriocina obtida a partir de *Lactobacillus sake* 2a, o qual foi testado sob várias cepas de *Salmonellas*, apresentando resultado positivo sob todas as linhagens utilizadas bem como quando combinado o extrato da bacteriocina a outros antimicrobianos como, ácido cítrico, EDTA e lisozima.

Figura 2 - Ação inibitória do extrato frente a *Listeria monocytogenes*



Nota: Letras iguais representam valores sem diferença significativa com $p < 0,05$ em teste Tukey.

Fonte: Autores

A partir da Figura 2 pode-se observar que o extrato mostrou o mesmo comportamento frente a *Listeria monocytogenes*, apresentando a CMI na diluição 1:11 e não exibido atividade bactericida frente a este patógeno uma vez que o ELC apresentou uma inibição de $89,75 \pm 3,75\%$. Já, Rosa (2001) analisou a atividade de uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake* 2a, isolada de linguiça frescal, onde constatou o efeito bactericida contra *Listeria monocytogenes* porém ao analisar seu efeito sob *Escherichia coli* O157H7 não obteve resultados satisfatórios. Barbosa (2013) obteve resultados também positivos quando utilizado cepas de bacteriocinas isoladas de salame frente a diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*.

Nota-se ainda que a diminuição da porcentagem de inibição está diretamente proporcional a diminuição da concentração do ELC, porém constata-se que o extrato se manteve eficiente até a diluição de 1:11, ou seja, uma parte de extrato para 10 totais, evidenciando uma baixa concentração do mesmo, constatando que a concentração mínima inibitória para o extrato da bacteriocina foi na concentração 1:11 para os dois micro-organismos testados, apresentando $28,05 \pm 3,38\%$ e $6,7 \pm 0,5\%$ para *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* respectivamente nesta diluição.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises realizadas constatou-se que a bacteriocina obtida da cepa de *Lactobacillus sakei* estudada, exibe atividade antibacteriana frente a micro-organismos patógenos, tanto Gram-negativo como Gram-positivo, exibindo uma inibição de $97,7 \pm 0,66\%$ sob *Salmonella* e $89,75 \pm 3,75\%$ frente a *Listeria monocytogenes* no extrato sem tratamento. Foi constatado ainda a estabilidade do extrato frente a baixas concentrações do mesmo, apresentando $28,05 \pm 3,38\%$ de inibição sob *Salmonella* e $6,7 \pm 0,5\%$ frente a *Listeria monocytogenes*, ambos na concentração de 1:11, avaliada como sendo a concentração mínima inibitória (CMI), porém não apresentou efeito bactericida.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao CNPq Processos 310385/2013-0 e 453878/2014-8 pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa e ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos pelo espaço físico.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, M. S. **Bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em salame: isolamento, caracterização, encapsulação e aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em salame experimentalmente contaminado.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 28 de outubro de 1997.

CASTRO, M. P. et al. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin

production. **Meat Science**, Barking, v. 87, p. 321-329, 2001.

DRECHSEL, M. M. et al. Biossíntese e atividade de Bacteriocinas, e mecanismos bacterianos de autoimunidade. **Microbiologia in foco**, v. 4, p. 11-16, 2011.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de Enterococcus**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2005.

GELINSKI, J. M. L. N. **Bacteriocina de *Lactobacillus sake* 2a: potencial de aplicação em combinação com outras substâncias antimicrobianas na inibição de cepas de Salmonella de origem alimentar**. Tese (Doutorado em Bromatologia), Universidade de São Paulo, 2003.

GERHARDT, C.; et al. Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. **Food Technology**. p. 11-17, 2012.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**, n. 12, p. 39–85, 1993.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NISINA UM CONSERVANTE ALIMENTÍCIO NATURAL. **Aditivos & Ingredientes**. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201610/2016100943561001477573436.pdf>. Acesso em: 5 set. 2018.

OLIVEIRA, T. F. et al. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 20 p., 2009.

ROSA, C. M. **Purificação e mecanismo de ação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a isolado de linguiça frescal**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 2001.

SOUZA, N. B. et al. Determinação da menor concentração de bacteriocina com ação inibitória sobre *Staphylococcus aureus*. In: XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 5 p., 2017. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2017.