

ANÁLISE DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACTERIOCINAS NA FORMULAÇÃO DE SOLUÇÕES FILMOGÊNICA.

Nathiéli Souza ¹

Caroline Costa Moraes ²

Resumo:

O uso de bacteriocinas como conservantes de alimentos naturais atende às demandas dos consumidores por alta qualidade e segurança. No entanto, a aplicação de bacteriocinas como aditivos em alimentos podem ser limitados por várias razões, tais como a eficácia da eliminação do patógeno ou o preço alto. O que desenvolve um interesse maior no desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, além da aplicação para preservação de alimentos, pela demanda maior por alimentos de alta qualidade, preocupações ambientais, principalmente com o descarte de materiais não renováveis utilizados como embalagens nos alimentos. Sendo assim este trabalho teve como objetivo a produção de biofilmes com a aplicação de bacteriocinas produzidas pela bactéria *Lactobacillus sakei*, isoladas no "extrato livre de células" (ELC), com objetivo de comparação a ação inibitória em diferentes concentrações do agente antimicrobiano, nas proporções de 25%, 50% e 75%. Para o desenvolvimento do estudo, foram elaborados 4 soluções filmogênicas, sendo elas com diferentes concentrações de extrato contendo bacteriocina, nas proporções de 0, 25, 50 e 75% de extrato, para a análise antimicrobiana das soluções filmogênicas formuladas, foi utilizado técnica de casting para formulação dos filmes e metodologia adaptada de disco-difusão para análise antimicrobiana em placa de petri com Ágar Mueller Hinton sobre a cultura contaminante. Com o estudo observou-se que as concentrações do agente não diferenciaram em relação a inibição do micro-organismo com aproximadamente 9,69 mm de diâmetro de halo de inibição para *E. coli* e 8,42 mm em média para o *S. aureus*. Foi possível concluir com o estudo que as diferentes concentração de extrato estudadas, não apresentam influencia na inibição do micro-organismo Gram-positivo, contudo para uma maior inibição do Gram-negativo, concentrações acima de 50% são mais eficientes. O estudo ilustra a promissora utilização deste extrato de bacteriocina na formulações de soluções filmogênica, ou biofilmes com atividade antimicrobiana que poderão ser utilizados no recobrimento de alimentos perecíveis.

Palavras-chave: Solução filmogênica; bacteriocinas; *Lactobacillus sakei*; patógenos alimentares

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

**ANÁLISE DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACTERIOCINAS NA
FORMULAÇÃO DE SOLUÇÕES FILMOGÊNICA.**

¹ Aluno de graduação. nathieli.souza.1995@gmail.com. Autor principal

² Docente. carolinecmoraes@gmail.com. Orientador

Anais do 10º SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - SIEPE
Universidade Federal do Pampa | Santana do Livramento, 6 a 8 de novembro de 2018

ANÁLISE DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACTERIOCINAS NA FORMULAÇÃO DE SOLUÇÕES FILMOGÊNICA.

1 INTRODUÇÃO

O uso de bacteriocinas como conservantes de alimentos naturais atende às demandas dos consumidores por alta qualidade e segurança. No entanto, a aplicação de bacteriocinas como aditivos podem ser limitados por várias razões, tais como a eficácia da eliminação do patógeno ou o preço alto (CLEVELAND, 2001).

No entanto, o interesse de pesquisa em bacteriocinas continuou nos últimos anos, à medida que os pesquisadores continuam a procurar por novas bacteriocinas assim abordando as preocupações biológicas e econômicas (CLEVELAND, 2001).

Uma estratégia comum para a preservação de alimentos que são consumidos crus ou sem cozimento adicional é a aplicação de filmes comestíveis ou revestimentos contendo substâncias antimicrobianas. A incorporação compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas, em revestimentos e filmes apresenta-se como alternativa interessante assegurar o controle de microrganismos patogênicos em alimentos produtos (IGARASHI, 2010).

O interesse maior no desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, se dá pela demanda maior por alimentos de alta qualidade, preocupações ambientais, principalmente com o descarte de materiais não renováveis utilizados como embalagens nos alimentos (PALMU, 2003).

As embalagens são utilizadas com a função principal de garantir a qualidade e segurança aos produtos alimentícios durante o seu armazenamento e transporte até a chegada a mesa do consumidor (RHIM; PARK; HA, 2013). Desta forma prolongam a vida de prateleira impedindo o seu contato com fatores ou condições desfavoráveis, que possam vir a interferir nas características dos alimentos como micro-organismos, contaminantes químicos, oxigênio, luz e umidade (HEMPEL et al., 2013; RHIM; PARK; HA, 2013).

Estes filmes antimicrobianos são compostos de resina sintética ou natural, adicionados de agentes antimicrobianos com o objetivo de retardar ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos, por migração destes agentes para a superfície do produto ou até mesmo apenas pelo contato (OLIVEIRA, 2002).

A forma mais comum de aplicação de aditivos antimicrobianos é diretamente na formulação dos produtos alimentícios, com finalidade de controlar o crescimento microbiano. Contudo esta forma de aplicação pode não ser eficiente, em casos que a capacidade de proteção do agente antimicrobiano seja neutralizada por reações ou ainda por interações com os demais constituintes. Apesar deste, outro parâmetro como homogeneização do antimicrobiano, pela aplicação direta na formulação, pode interferir na ação na superfície do alimento, onde as reações de deterioração ocorrem com maior frequência, assim uma concentração maior do agente na superfície seria necessária para combate da contaminação superficial (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Atualmente a Nisina é a bacteriocina mais conhecida, a única reconhecida como conservante natural para alimentos, biologicamente segura pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e permitida pela Legislação brasileira para uso em queijos (Brasil, 1996). Contudo vários estudos vêm sendo desenvolvidos para a descoberta de novas bacteriocinas, como as produzidas pelo micro-organismo *Lactobacillus sakei*, como a Sakacina e Lactocina S. Estas bacteriocinas, conforme observado por Rosa et al. (2002) e Mortvedt et al. (1995) apresenta potencial de bioconservação quando utilizada no controle de *Listeria monocytogenes*.

Apesar dos benefícios da utilização da Nisina como conservante natural, esta quando utilizada em baixas concentrações, alguns micro-organismos podem apresentar resistência (MARTINS, 2012) justificando a busca por novas cepas de bactérias que apresentem as características de produção desses compostos com potencial antimicrobiano contra micro-organismo como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, patógenos comumente encontrados na indústria de alimentos.

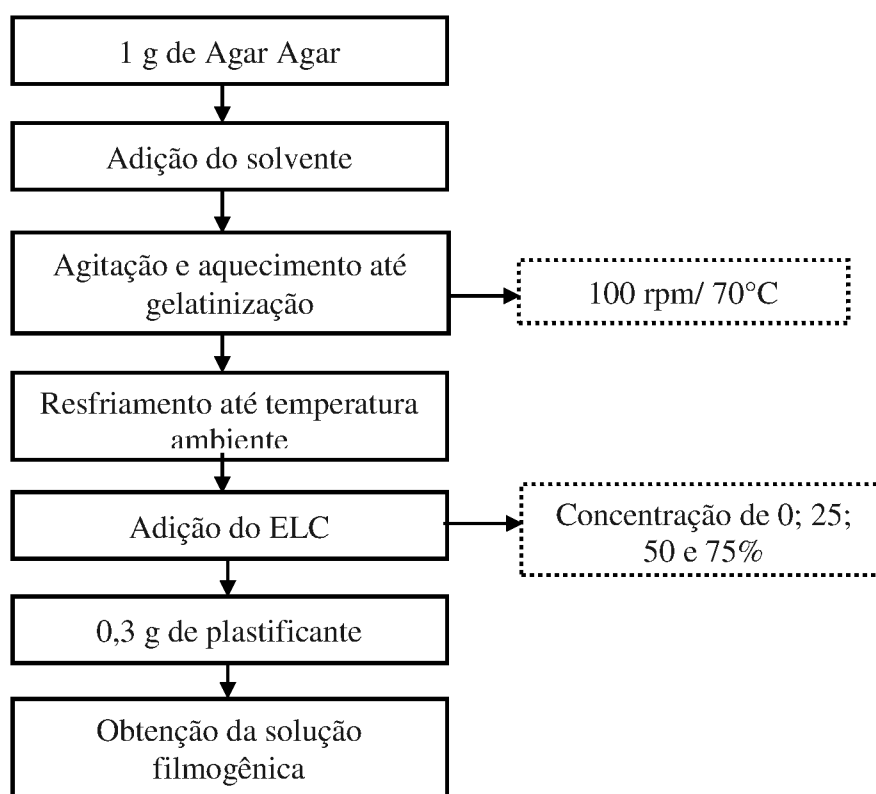
Sendo assim este trabalho teve como objetivo a produção de biofilmes com a aplicação de bacteriocinas produzidas pela bactéria *Lactobacillus sakei*, isoladas no “extrato livre de células” (ELC), com objetivo de comparação a ação inibitória em diferentes concentrações do agente antimicrobiano, nas proporções de 25%, 50% e 75%.

2 METODOLOGIA

Inicialmente foi obtida a bacteriocina por fermentação submersa com *Lactobacillus sakei* em caldo *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) em erlenmeyer com 250 mL de meio de cultura, sob agitação de 150 rpm a 32°C durante 24 horas de cultivo. Para obtenção do extrato a ser utilizado na produção dos filmes, o caldo fermentado foi centrifugado a 5500 rpm por 15 minutos a 4°C para remoção das células, visto que as bacteriocinas são compostos extracelulares. O sobrenadante será denominado de extrato livre de células (ELC), tendo o pH ajustado para 7,0 a fim de não afetar na atividade de inibição do extrato (SOUZA, 2017).

Para a produção dos filmes biodegradáveis a base de gelatina incorporados de bacteriocina o ELC foi adicionado a formulação do filme conforme o fluxograma mostrado na Figura 1, as concentrações de ELC que foram variadas também estão ilustradas na mesma figura.

Figura 1 - Fluxograma de produção de biofilme incorporado de ELC



Fonte: Autores, 2018

Os filmes foram desenvolvidos a partir da técnica de *casting*, onde como matriz da solução filmogênica utilizou-se Ágar-Ágar como geleificante, devido ao seu alto poder de formação de gel, o qual é oriundo de uma mistura de dois polissacarídeos (agarose e agarpectina), como plastificante hidrofílico será utilizado o glicerol, sendo necessário para melhorar a flexibilidade e aumentar a resistência do filme, água destilada estéril como solvente e o ELC nas concentrações de 0; 25; 50 e 75%, de forma a se obter um volume de 50 mL de solução filmogênica (ALVES, 2015; CORREIA, 2016; DUARTE et al., 2014). Após a obtenção da solução filmogênica essa foi utilizada para as análises antimicrobianas.

Para a caracterização microbiológica dos filmes produzidos foi avaliada a atividade microbiológica desses através de metodologia adaptada de disco-difusão descrito pela NCCLS (2003), este método consiste na adição em da cultura microbiana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), padronizada com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, em placa de Petri na proporção de 0,1 mL da cultura e adição de ágar Mueller Hinton sobre a cultura contaminante, sendo que após a solidificação do ágar foram abertos orifícios de 6 mm de diâmetro e adicionadas as soluções filmogênica na concentrações de 0; 25; 50 e 75% de ELC, as placas foram incubadas a 35°C/24 h (LOPES et al., 2014). Após o tempo de incubação das placas os resultados foram observados pela formação de halos translúcidos ao redor do orifício no ágar, foram realizadas medidas de tamanho de halo de inibição.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1, ilustra os diâmetros de halos de inibição formados no com a aplicação das soluções filmogênicas nos orifícios do ágar contaminado com *E. coli* e *S. aureus*.

Tabela 1 – Halos de inibição dos micro-organismos contaminantes conforme a concentração de extrato adicionada na solução filmogênica.

Micro-organismo	Concentração 0% (mm)	Concentração 25% (mm)	Concentração 50% (mm)	Concentração 75% (mm)
<i>E. coli</i>	0,00	7,34 ^a	9,33 ^b	9,69 ^b
<i>S. aureus</i>	0,00	8,34 ^a	8,41 ^a	8,52 ^a

Fonte: Autores, 2018

Através dos resultados ilustrados na Tabela 1, foi possível observar, como já era esperado, que a solução filmogênica que não recebeu adição do extrato antimicrobiano não apresentou nenhuma formação de halo de inibição frente aos micro-organismos testados. Contudo observa-se que a medida que a concentração de extrato foi aumentada, o halo de inibição aumentou consequentemente.

Para *E. coli* a diferença entre as soluções com 25% de extrato antimicrobiano apresentou diferença significativa a um nível de significância de 95% em teste Tukey, em relação as soluções com 50 e 75% de extrato, onde o maior halo de inibição observado foi de 9,69 mm para a solução com 75%.

Os resultados encontrados para *S. aureus* demonstram o potencial de inibição do extrato, na redução de micro-organismos, demonstrando que as concentrações de extrato aplicadas não diferenciaram significativamente, permitindo assim a aplicação de apenas 25% de extrato na formulação da solução filmogênica, com um halo de inibição de

aproximadamente 8,42 mm. Resultado este que corrobora com os estudos de Furtado (2010), quando estudou 6 cepas de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas, observou-se halos de inibição menores que 2 mm quanto testadas frente a *E. coli* ATCC 4157, porem quando analisadas as mesmas cepas contra *S. aureus* ATCC 6538, observou inibição em 4 das 6 cepas com halos de aproximadamente 10 mm. Os resultados encontrados neste estudo corroboram como os encontrados por Furtado (2010) quando analisada frente ao micro-organismo Gram positivo, porem os resultados com a cepa de *E. coli* ilustram que a bacteriocina isolada no presente estudo, apresenta ação diferenciada contra esse micro-organismo, o que ilustra uma vasta ação desta bacteriocina.

Lima (2002) quando analisou linhagens de *Z. mobilis*, observou atividade bacteriocinogênica contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *S. enteritidis*) indicando o amplo espectro de ação deste inibidor. Com os resultados exposto por Lima, observa-se que assim como a bacteriocina isolada no presente estudo, outras bacteriocinas produzidas por diferentes micro-organismos, também apresentam um espectro de ação amplo contra micro-organismos Gram-positivo e negativo.

Assim a eficiência da bacteriocina foi comprovada contra o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizados na análise pela formação de um halo de inibição translucido ao redor da circunferência do orifício feito no ágar contaminado, sendo mais pronunciada a atividade antimicrobiana contra o micro-organismo Gram-positivo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A solução filmogênica utilizada para a produção de biofilmes comestíveis com propriedades antimicrobianas nas concentrações de extrato estudadas, apresentou feito positivo na inibição dos dois micro-organismos analisados, com a formação de halos de inibição de 9,69 mm de diâmetro para *E. coli* e 8,42 mm em média para o *S. aureus*. Foi possível concluir com o estudo que as diferentes concentrações de extrato estudadas, não apresentam influencia na inibição do micro-organismo Gram-positivo, contudo para uma maior inibição do Gram-negativo, concentrações acima de 50% são mais eficientes. O estudo ilustra a promissora utilização deste extrato de bacteriocina na formulações de soluções filmogênica, ou biofilmes com atividade antimicrobiana que poderão ser utilizados no recobrimento de alimentos perecíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq pelo apoio a pesquisa, ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos pelo espaço físico e a Universidade Federal do Pampa pela oportunidade de divulgação da pesquisa.

REFERENCIAS

- APPENDINI, P; HOTCHKISS, J. H. Imobilização de lisozima de polímeros em contacto com alimentos, como potenciais filmes antimicrobianos. *Packaging Technology and Science*, v. 10, n. 5, p. 271-279, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, 11 mar. 1996.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

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. 92 pag. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, 2010.

HEMPEL, A. W; et al. Use of smart packaging technologies for monitoring and extending the shelf-life quality of modified atmosphere packaged (MAP) bread: application of intelligent oxygen. *European Food Research and Technology*, v. 237, p. 117–124, 2013.

IGARASHI, M. C. Uma estratégia comum para a preservação de alimentos que são consumidos crus ou sem cozimento adicional é a aplicação de filmes comestíveis ou revestimentos contendo substâncias antimicrobianas. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, 2010.

LIMA, G. M. S. Ocorrência de bacteriocinas e caracterização molecular de linhagem de *Zymomonas mobilis*. 85 pag. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de produtos bioativos). 2002.

MARTINS, E. Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal. 49f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MORTVEDT, C. I. A; et al. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sakei* L45. *Applied Environmental Microbiology*, v. 61, n. 1, p. 175-179, 1995.

OLIVEIRA, L.M. Filmes plásticos incorporados de agentes antimicrobianos. *Boletim Técnico do Centro de Tecnologia de Embalagem*, v. 14, n. 2, p. 4-7, 2002.

PALMU, P. S. T. Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo. 244f. 2003. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.

RHIM, J. W; PARK, H.M; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, v. 38, n. 10-11, p. 1629–1652, 2013.