



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

ESTUDO DA APLICAÇÃO DE NISINA PARA A INATIVAÇÃO DE *Alicyclobacillus acidoterrestris*

J.O, GIROLDO^{*1}; M.S, NASCIMENTO²; J.S, FERREIRA³

¹ Aluna da FEQ/UFU, ² Pesquisadora – ITAL/CCQA, ³ Professor da FEQ/UFU

² Instituto de Tecnologia de Alimentos – Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos.
Caixa Postal 139 – 13070 – 178. Campinas - SP

^{1 e 3} Faculdade de Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia - UFU,
Av. João Naves de Ávila, 2.121, Bloco 1K, Campus Santa Mônica – Uberlândia, MG
email: juliana@feq.ufu.br

RESUMO – A bioconservação de alimentos vem sendo uma alternativa na viabilidade da manutenção de alimentos mais saudáveis. O método consiste na aplicação de antimicrobianos naturais para a inibição da proliferação de microrganismos. Dentre os antimicrobianos estudados, a natamicina e a nisina recebem maior destaque devido à disponibilidade comercial para uso em alimentos. O objetivo desse trabalho consiste na avaliação do efeito da nisina na inativação do *Alicyclobacillus acidoterrestris*, microrganismo acidófilo termodúrico encontrado em sucos industrializados pasteurizados. Para isso, as cepas do microrganismo foram inoculadas em ágar batata dextrose (PDA) e as análises da avaliação da ação da nisina sobre o desenvolvimento do bacilo foram realizadas por dois métodos diferentes. O primeiro foi o método de difusão em ágar em poços e no segundo método, a nisina foi adicionada ao meio de cultura pré-fundido com posterior inoculação do microrganismo. Para esses testes, concentrações diferentes da solução de nisina foram utilizadas: 100 µg/L e 400 µg/L. As análises mostraram o efeito inibidor do crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ao comparar a amostra inoculada com o agente deteriorante e a amostra controle, mostrando que o estudo da aplicação desse antimicrobiano combinado ao tratamento térmico pode ser promissor no processamento de sucos de frutas.

Palavras chave: bioconservação, bacteriocinas, conservação de alimentos.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a indústria de alimentos demanda o desenvolvimento de métodos que permitam a obtenção de alimentos minimamente processados, preservação das características organolépticas e nutricionais e ainda, longa vida de prateleira (Acuña *et al.*,

2011). Além disso, há a crescente demanda da população que vem procurando, cada vez mais, hábitos de alimentação mais saudáveis. (Nascimento *et al.*, 2008, Martinis *et al.*, 2002).

A bioconservação ou biopreservação tem sido aplicada para atender essas necessidades da indústria de alimentos, ao substituir os

*Bolsista PIBIC/CNPq/UFU.

antimicrobianos obtidos por síntese química por antimicrobianos naturais que podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Estudos mostram que estes compostos podem ser empregados isoladamente ou em combinação com novas técnicas de conservação de alimentos ou no caso de bacteriocinas produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas (Acuña *et al.*, 2011, Gautam e Sharma, 2009, Tiwari *et al.*, 2009, Black *et al.* 2008, Silva *et al.* 2012).

Com relação às bacteriocinas, apesar de haver uma diversidade de compostos como subtilina, cereína, turicina, plantaricina, pediocina, dentre outras, a nisina é a única que até o momento apresenta o status GRAS do FDA (Estados Unidos) (Gautam e Sharma, 2009, Nascimento *et al.*, 2008). A nisina é um antibacteriano natural, é um metabólico produzido por uma bactéria láctea, *Lactococcus lactis*, que não é patogênica para o consumo humano. (Cleveland, 2001).

O efeito da nisina para conservação de queijos e derivados foi comprovado ao ser substituir o nitrato empregado no preparo destes alimentos, para prevenção da proliferação do *Clostridium tyributyricum* (Hurst, 1981, Hugenholz e de Veer, 1991).

Para que seja considerado um antibacteriano natural, a concentração de nisina utilizada nos testes em alimentos não pode ser maior do que os níveis de outras bacteriocinas que possam ser produzidas por outras bactérias já presentes no alimento e nem ser originária de bactérias modificadas geneticamente. (Cleveland, 2001). No Brasil, que é um país pioneiro na utilização da nisina em produtos cárneos, a adição deste antimicrobiano também é aprovada para uso em queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg de produto final (Melo *et al.*, 2005).

Neste contexto, a proposta deste trabalho foi avaliar a ação inibitória da nisina sobre o *Alicyclobacillus acidoterrestris*, que é um microrganismo acidófilo (pH entre 2,5 e 6) formador de esporo e termorresistente que deteriora sucos de frutas submetidos a tratamento térmico devido à formação de compostos como guaiacol e halofenóis (Witthuhn *et al.*, 2007).

Além disso, dois métodos foram empregados para avaliação da sensibilidade A.

acidoterrestris à nisina: o primeiro adicionando solução de nisina sobre o meio previamente inoculado com o microrganismo e o outro pelo método de difusão por perfuração em ágar, segundo Nascimento (2007).

Segundo Ostrosky *et al.* (2007) o teste de difusão em ágar é limitado a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. O método é físico e avalia-se o crescimento dos microrganismos em um meio contendo a substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido em placas e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância ensaiada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Serão apresentados a seguir os procedimentos adotados para manutenção e preparo da solução de *Alicyclobacillus acidoterrestris* usados nos testes de avaliação do efeito da nisina. Para todos os ensaios, as vidrarias e os meios foram devidamente esterilizados por 20 minutos a 121 °C e os procedimentos foram feitos usando câmara de fluxo laminar.

Cultivo do bioindicador

O *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi cultivado em meio composto de Batata Dextrose Ágar (PDA), que foi preparado seguindo as instruções do fabricante e disposto em placas de Petri. Repiques foram feitos periodicamente e as placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica sob temperatura de 50°C por 48 horas. Após esse tempo, algumas placas de Petri foram mantidas a 4°C até o próximo repique e outras foram usadas para o preparo da solução de esporos.

Preparo da “solução-mãe” de *Alicyclobacillus acidoterrestris* e contagem para determinação da concentração da mesma

Para o preparo da “solução-mãe”, algumas placas de Petri foram inoculadas com o *Alicyclobacillus acidoterrestris* e esse inóculo foi suspenso das placas com uma solução salina 0,85 % NaCl e com o auxílio de

uma alça de Drigalski. Em cada placa, foram adicionados de 3 a 5 mL de solução salina. Essa solução contendo o inóculo foi transferida para um frasco do tipo Shot. O volume completado para 100 mL com a mesma solução salina. (Albernaz, 2006)

Para a contagem e determinação da concentração da “solução-mãe”, foram feitas diluições seriadas (Silva *et al.*, 2010). Tais diluições foram feitas da seguinte forma: transferiu-se 1 mL da “solução-mãe” para um tubo de ensaio ao qual se adicionou 9 mL de água peptonada, obtendo-se a diluição 10^{-1} . O tubo foi agitado em Vórtex para total homogeneidade da solução. Este procedimento foi repetido sucessivamente até se ter a diluição de 10^{-9} , como pode ser observado na Figura 1.



Figura 1 – Tubos de ensaios contendo as diluições seriadas da “solução-mãe” de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, de 10^{-1} a 10^{-9} .

O método de contagem biológica foi do tipo “Spread Plate”, ou seja, por superfície segundo Silva *et al.* (2010). As placas de Petri eram previamente preparadas com aproximadamente 20 mL de meio PDA. Após solidificação do meio, 1 mL de cada uma das diluições foi adicionado no centro da placa e espalhado com o auxílio da alça de Drigalski. Para cada diluição foi feito o plaqueamento em duplicata. A concentração foi determinada de acordo com a contagem de UFC’s (Unidades Formadoras de Colônias) selecionando as placas que permitiram a contagem das UFC’s, o que correspondeu às placas preparadas com as diluições de 10^{-5} a 10^{-7} , como se pode observar na Figura 2.

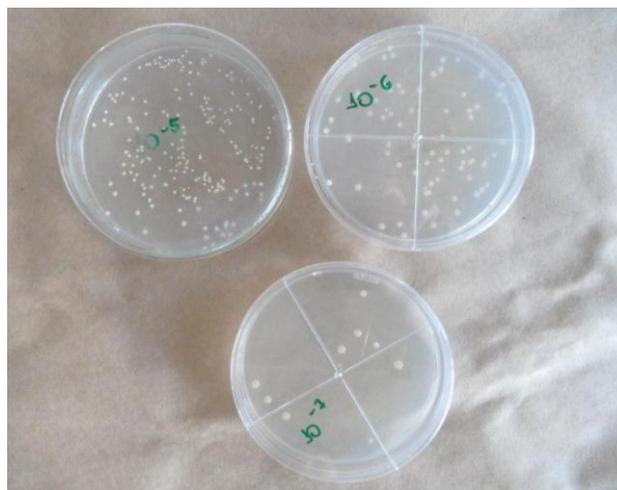


Figura 2 – Placas de Petri inoculadas com o *Alicyclobacillus acidoterrestris* em soluções diluídas de 10^{-5} a 10^{-7} .

Avaliação da sensibilidade do *Alicyclobacillus acidoterrestris* à nisina

As soluções estoques de 10^4 IU/mL de nisina foram preparadas adicionando 0,1 g de composto em 10 mL de 0,02 N HCl contendo 0,75 % NaCl (Black *et al.*, 2008). Dessa solução estoque foram feitas diluições em água peptonada, de forma a se ter duas soluções de nisina com concentrações diferentes para os testes, 100 e 400 $\mu\text{g/L}$.

A avaliação da sensibilidade foi feita empregando dois métodos. Para ambos os métodos, placas de Petri contendo meio PDA foram inoculadas com o microrganismo na concentração de 10^{-5} . O Método 1, no qual 0,1 mL da solução de nisina foi colocado sobre o meio e espalhado com o uso de uma alça de Drigalski; e o Método 2, conhecido como difusão por perfuração em ágar (Nascimento, 2007), para esse foram feitos poços de aproximadamente 6 mm de diâmetro no meio já inoculado, como mostrados na Figura 3, e em cada um desses poços foi colocado 50 μL da solução de nisina. Nos dois métodos, a nisina foi testada nas duas concentrações previamente preparadas e citadas acima.

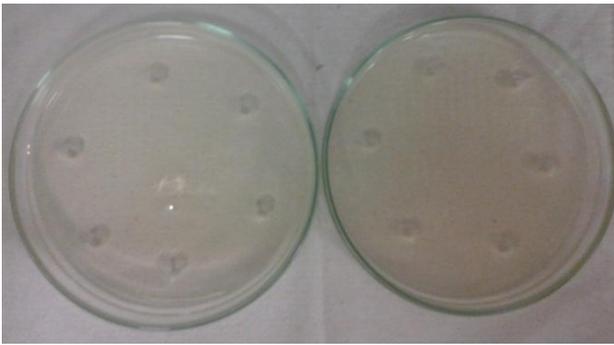


Figura 3 – Placas de Petri com o meio PDA já inoculado e endurecido, com os poços que receberam a solução de nisina previamente preparados.

Duas placas foram inoculadas com o *Alicyclobacillus acidoterrestriis* sem adição de nisina para serem usadas como controle. Tanto as placas do controle, quanto as placas contendo o antimicrobiano foram incubadas em estufa bacteriológica a 50 °C por 48 horas, e os resultados foram analisados após esse período.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 4 são apresentadas as placas controle, a placa na qual a nisina foi adicionada e espalhada sobre o meio inoculado e a placa com o método de difusão por perfuração em ágar, com a nisina adicionada na concentração de 400 µg/L.

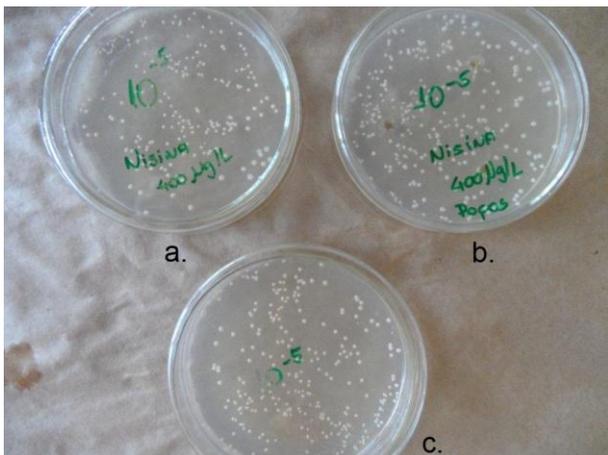


Figura 4 – Placas de Petri dos experimentos para testar a inativação. a) nisina aplicada conforme Método 1. b) nisina aplicada conforme Método 2. c) placa controle, com diluição 10^{-5} e concentração da solução-mãe: $6,35 \times 10^8$ UFC/mL.

Os resultados dos testes de avaliação da sensibilidade do microrganismo à nisina mostraram que o crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestriis* foi reduzido quando a concentração do antimicrobiano de 400 µg/L no Método 1, ou seja, quando a nisina foi espalhada sobre o meio PDA previamente inoculado com o bioindicador. A redução foi menor que 1 ciclo logarítmico, o que talvez não fica muito nítido na imagem (Figura 4), mas indicando que a nisina pode ser usada para inibir o crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestriis*.

A falta de evidências que mostrem a ação da nisina pelo Método 2, pode se explicar pela dificuldade que a nisina encontra em difundir no meio solidificado, já que não se observam halos sem crescimentos de unidades formadoras de colônias relevantes ao redor de cada poço. Além disso, devem-se empregar concentrações superiores àquelas avaliadas neste trabalho (> 400 µg/L).

Ao comparar a ação da nisina pelo Método 1 para diferentes concentrações da bacteriocina, conforme ilustrado na Figura 5, é evidente o efeito inibidor quando a concentração foi de 400 µg/L. Para o meio inoculado e preparado com solução de 100 µg/L não foi observado redução do número de UFC.

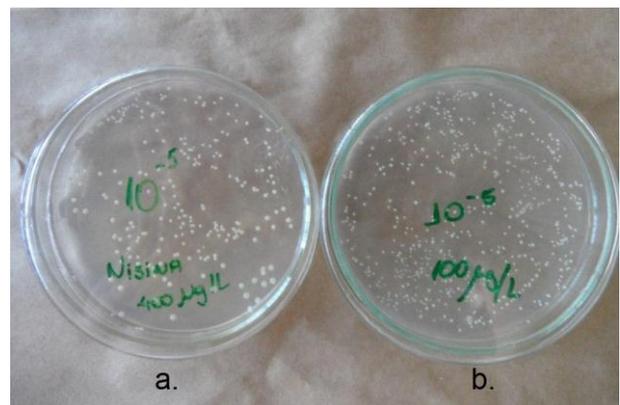


Figura 5 – Placas de Petri com meio PDA inoculado com o *A. acidoterrestrii*. a) Método 1 com solução de nisina 400 µg/L. b) Método 1 com solução de nisina 100 µg/L.

É necessário um estudo mais aprofundado para determinar a concentração mínima de nisina para a inibição do crescimento do *Alicyclobacillus*

acidoterrestris. Para isso, devem ser empregadas técnicas específicas para a obtenção da Concentração Mínima de Inibição (CMI) (Ostrosky *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho indicaram que o microrganismo *Alicyclobacillus acidoterrestris* é sensível à nisina. Dos métodos apresentados para esses testes, com as concentrações de soluções de nisina empregadas (100 e 400 µg/L), o que se apresentou mais viável e satisfatório foi o Método 1, que avaliou o efeito do antimicrobiano adicionando nisina diretamente sobre o meio inoculado.

Além disso, este estudo indica que o espectro de aplicação da nisina pode ser ampliado, podendo ser empregada na inibição de microrganismos deterioradores de sucos de frutas que possuem resistência a meios ácidos e são termorresistentes, portanto resistindo ao tratamento térmico de pasteurização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AÇUÑA, L., MORENO, R.D., BELLOMIO, A., (2011), Development of Wide-Spectrum Hybrid Bacteriocins for Food Biopreservation. Food Bioprocess Technol. V 4, p. 1029 – 1049.
- ALBERNAZ, L.C. (2006), Substância antimicrobiana de amplo espectro de Tabebuia caraiba. UnB, Brasília, DF (Dissertação de mestrado). p. 105.
- AVIDOS, M.F.D., FERREIRA, L.D. (2000), Frutos de Cerrado. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 3, n. 15, p. 36 – 41.
- BEUCHAT, L.R., PITT, J.I. (2001), Detection and Enumeration of Heat-Resistant Molds. In: Downes, F.P., Ito, K (ed). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. p. 217-222.
- BLACK, E.P., LINTON, M., McCALL, R.D., CURRAN, W., FITZGERALD, G.F., KELLY, A.L., PATTERSON, M.F. (2008), The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk, Journal of Applied Microbiology. p. 105, 78-87.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F & CHIKINDAS, L.M. (2001), Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. v 71 p. 1 – 20.
- CORBO, M.R., BEVILCQUA, A., CAMPANIELLO, D., D'AMATO, D., SPERANZA, B., SINIGAGLIA, M. (2009), Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches – a review. International Journal of Food Microbiology. v., n., 44, p. 223–241.
- DEVLEIGUERE, F.; VERMEIREN, L. & DEBEVERE, J. (2004), New preservation technologies: Possibilities and limitations. International Dairy Journal 14 p. 273–285.
- ESTEVEZ, D. A., da SILVA, M. A., KIECKBUSH, T. G. (2012), Estudo Experimental da Inativação de *Bacillus subtilis* inoculados em placas de aço inoxidável pelo uso de CO₂ em Ambiente Supercrítico. Anais de XX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP.
- FERREIRA, E.H.R., MASSON, L.M.P., ROSENTHAL, A., SOUZA, M.L., TASHIMA, L., MASSAGUER, P.R. (2011), Termoresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. Brazilian Journal of Food Technology. v. 14, n. 3, p. 164-171.
- GAUTAN, N., SHARMA, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. Indian J Microbiol. 49: p. 204–211.
- HUGENHOLTZ, J.; de VEER, G. J. C. M. (1991), Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. Nisin and Novel Lantibiotics.
- HURST, A. (1981), Nisin, Advanced Applied Microbiology, p. 85 – 123.
- MARTINIS, E.C.P., ALVES, V.F., FRANCO, B.D.G.M. (2002), Bioconservação de alimentos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Revista eletrônica. n. 29.

- MELO, N.R., SOARES, N.F.F., GONÇALVES, M.P.J. (2005). Nisina: um conservante natural para alimentos. *Revista Ceres*. v. 52, n. 303, p. 921-938.
- MILLER, G.L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*.v. 31, n. 3, p. 426–428.
- NASCIMENTO, M.S. (2007), Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo minas frescal. UNICAMP, Campinas, SP. (Tese de doutorado). p. 208.
- NASCIMENTO, M.S., MORENO, I., KUAYE, A.Y. (2008), Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. *Brazilian Journal of Food Technology*. v. 11, n. 2, p. 120-127.
- OLIVEIRA, R.G, GODOY, H.T., PRADO, M.A. (2010), Otimização de metodologia colorimétrica para a determinação de ácido ascórbico em geléias de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 30, n. 1, p. 244-249.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. (2008), Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2): p. 301 – 307.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. (2008), *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2): p. 301 – 307.
- SILVA, M.A., BIERHALZ, A.C.K., KIECKBUSCH, T.G. (2012) Modelling natamycin release from alginate/chitosan active films. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, p. 740-746.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. (2010), *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. 4ª Edição. São Paulo. p. 41-42, 52-55, 364-368, 374-377, 519.
- TIWARI, B.K., VALDRAMIDIS, V P., O' DONNELL, C.P., MUTHUKUMARAPPAN, K., BOURKE, P., CULLEN, P. J. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 57, p. 5987-6000.
- TRIGUI, M., HSOUNA, A. B., TOUNSI, S., JAOUA, S. (2003), Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsute* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products* 41. p. 150 – 157.
- WITTHUHN, R.C., DUVENAGE, W., GOUWS, P.A. (2007). Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. *Letters in Applied Microbiology*. 45. p. 224 – 229.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica Bolsas de Iniciação Científica (IC-CNPQ2013-0425). Agradecem também a DANISCO pelo fornecimento da nisina.