

DETERMINAÇÃO DA MENOR CONCENTRAÇÃO DE BACTERIOCINA COM AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE *Staphylococcus aureus*

SOUZA, N.B.¹, CONTESSA, C. R.¹, GONÇALO, G. B.¹, ALMEIDA, L.¹, MANERA, A. P.¹,
MORAES, C. C.¹

¹Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) – Bagé – RS – Brasil
E-mail para contato: nathieli.souza.1995@gmail.com

RESUMO – Algumas classes de agente naturais podem ser empregadas na substituição de agentes químicos nos alimentos, dentre estes, tem-se as bacteriocinas. Estas são formadas por um grupo heterogêneo de peptídeos ou proteínas sintetizadas ribossomicamente que apresentam ação antimicrobiana contra uma vasta gama de micro-organismos patogênicos. Objetivou-se com este estudo a extração de uma bacteriocina produzida e excretada para o meio de cultivo, por *Lactobacillus sakei*, assim como a determinação da sua concentração mínima inibitória (CMI), frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus*. Após a obtenção do composto e a sua extração do meio de cultivo fermentado, diluiu-se em água peptonada estéril o extrato em um gradiente de concentrações de 1:2 até 1:12, assim todas as diluições e o extrato bruto foram testados pelo método de análise antimicrobiana em microplacas, contra o micro-organismo de interesse. A partir da análise dos resultados foi possível observar que o extrato apresenta uma ação bactericida no extrato bruto e na diluição de 1:2, a concentração mínima inibitória do composto foi encontrada na diluição de 1:9, na qual ainda apresente inibição do crescimento microbiano. Observa-se a produção de uma bacteriocina pelo *Lactobacillus sakei* assim como a extração deste composto do meio fermentado e sua ação antimicrobiana eficiente contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Vários agentes químicos ou sintéticos utilizados para inibição de micro-organismo em alimentos, estão sendo substituídos por agentes naturais. Estes com a mesma ação dos antimicrobianos químicos e sintéticos, todos com a finalidade de matar ou inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis no alimento (OLIVEIRA, *et al.*, 2009).

A concentração mínima de um agente antimicrobiano pode ser determinada como sendo a menor quantidade deste composto que será necessária para inibir o crescimento de um micro-organismo escolhido, esta quantidade pode ser denominada como concentração mínima inibitória (CMI). São feitos testes com variação da concentração do agente antimicrobiano, quando esta concentração for a menor possível e ainda apresentar inibição do crescimento do contaminante, essa é definida como CMI (OLIVEIRA, *et al.*, 2009).

Dentro da classe de agentes naturais que podem ser utilizados na substituição de agentes químicos e sintéticos nos alimentos tem-se as bacteriocinas, esta classe de agentes naturais é formada por um grupo heterogêneo de peptídeos ou proteínas sintetizadas ribossomicamente, que apresentam ação antimicrobiana contra uma vasta gama de micro-organismos patogênicos. Estas bacteriocinas podem ser utilizadas em alimentos, pois diferenciam dos antibióticos no seu espectro e modo de ação, à toxicidade e seus mecanismos de resistência, além da diferença na sua síntese (BISCOLA, 2011).

Conforme Eckner (1992) algumas bacteriocinas podem ser proteínas simples, porém outras produzidas por *Staphylococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus* podem conter grupamentos ativos de proteínas, lipídeos e carboidratos. As moléculas das bacteriocinas possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, responsáveis pelas interações com a superfície das células microbianas. Segundo Ecker (1992) e Desmazeaud (1997), a ação de bacteriocinas ocorre em duas fases, na primeira ocorre a absorção da bacteriocina pela membrana celular da célula sensível, nesta etapa a absorção é reversível e não há nenhum dano letal a célula. Em um segundo estágio a bacteriocina causa lesões letais a célula, com danos irreversíveis, no caso de micro-organismos Gram-positivos é possível observar anormalidades no transporte da membrana e/ou permeabilidade da membrana.

As bacteriocinas agem na formação de poros na membrana celular de células sensíveis, esta ação interfere em uma série de fatores importantes para a estabilidade das células, resultando no esvaziamento dos constituintes celulares e privam a célula de fontes essenciais de energia, com o colapso da célula, ocorre a paralisação de todas as reações, levando a morte celular (ARAUS, *et al.*, 2009).

Com o aumento da frequência de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) tanto por micro-organismos patogênicos como por intoxicações por compostos químicos e alergênicos, tem-se procurado por compostos naturais que tenham ação semelhante aos químicos e que sejam seguros ao consumo humano (NOGUEIRA e MIGUEL, 2009). Neste sentido, observa-se a eficiência na utilização de bacteriocinas e a necessidade de mais estudos na área de compostos naturais. Com base nestas informações objetivou-se a extração de uma bacteriocina produzida e excretada para o meio, por *Lactobacillus sakei*, assim como a determinação da concentração mínima inibitória do composto frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus*.

2. METODOLOGIA

2.1. Produção de bacteriocina pelo micro-organismo

A bacteriocina foi produzida por uma cepa de *Lactobacillus sakei* isolada de salame italiano, pelo grupo de estudos. Esta bactéria ácido láctica foi mantida criopreservada (-14°C) até ser utilizada, em meio de cultivo caldo MRS com 20% de glicerol, após realizou-se a reativação da bactéria em caldo MRS a 32°C, com agitação de 150 rpm por 12 horas.

2.2. Separação do composto de interesse

O caldo fermentado pela bactéria ácido láctica foi centrifugado a 5500 rpm na temperatura de 4°C por 15 min., para a separação das células e a permanência do composto no

meio sobrenadante restante da centrifugação, o precipitado rico em células foi então descartado. Este caldo fermentado sem a presença das células foi denominado de “Extrato livre de células”.

2.3. Diluição do extrato bruto

Para análise mais detalhada da atividade do composto produzido pelo micro-organismo foram feitas onze diluições sucessivas (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12) na qual a primeira diluição continha 1 mL de extrato bruto para 2 mL totais, mantendo-se sempre o volume inicial de extrato constante e aumentando o volume de diluente, neste caso água peptonada.

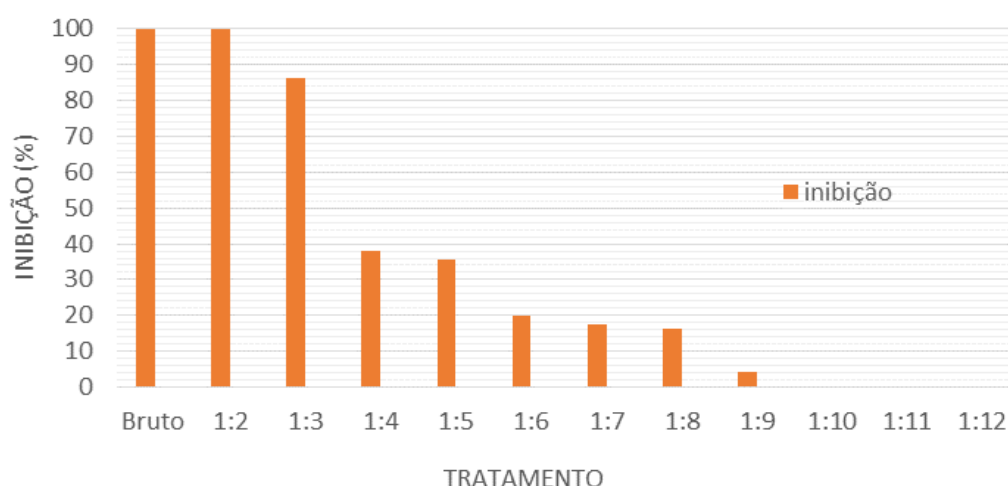
2.4. Análise antimicrobiana dos extratos

Foram feitas análise de microplacas baseadas na metodologia da NCCLS (2003) estas feitas com o extrato bruto (extrato livre de células sem diluição) e com as 11 diluições realizadas. Para as análises adicionou-se caldo Müeller Hinton, extrato a ser testado e microbiota *Staphylococcus aureus* ATCC® (12598). Foram feitas leituras de absorvância na faixa de 630nm em leitora de microplacas, estas foram feitas imediatamente após a inoculação do micro-organismo e 16±2h após a incubação da microplaca em estufa bacteriológica a 35°C, tempo de adaptação até a completa fase log do micro-organismo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 são mostrados os resultados de inibição do extrato bruto assim como as do gradiente de concentrações do extrato diluído, frente ao micro-organismo *S. aureus*.

Figura 1: Ação inibitória do composto frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus*



Através da figura é possível observar que a diminuição na porcentagem de inibição do micro-organismo está diretamente relacionada a diminuição da concentração do agente antimicrobiano no extrato utilizado. Observa-se que o agente antimicrobiano teve ação bacteriostática (o extrato inibe o crescimento, mas não destrói o patógeno) a partir da diluição

1:3 até a 1:9 (1 mL de extrato para 9 mL totais), pois até a diluição de 1:3 o agente antimicrobiano tem ação bactericida sobre o contaminante. A partir desta concentração o composto encontrasse muito diluído no meio e não apresenta ação inibitória contra o micro-organismo, ocorrendo o crescimento do mesmo na microplaca após as 16h.

Biscola (2011) em seus estudos descreveu alguns exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos, no estudo foram isoladas 7 cepas diferentes de *Lactobacillus sakei* produtoras das bacteriocinas Lactocina S, Sakacina K, Sakacina P, Sakacina A, Bavaricina MN, no entanto, nenhuma delas apresentou ação contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus*, contudo, todas tiveram ação contra outro micro-organismo contaminante de alimentos, o que ilustra que a bacteriocina isolada no presente estudo tem ação diferente das descritas por Biscola (2011).

Rosa (2001) observou em seus estudos que uma bacteriocina produzida por cepa de *Lactobacillus sakei*, isolado de linguiça frescal, apresentou efeito antagônico contra *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria innocua*, contudo não apresentou resultados satisfatórios contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7. Assim observa-se que a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei* isolada no presente estudo tem ação diferente da bacteriocina produzida pela cepa isolada por Rosa (2001), observando-se assim a ampla gama de compostos produzidos por diferentes cepas deste micro-organismo.

Observa-se que o composto em baixas concentrações no extrato, apresenta potencial bacteriostático da diluição de 1:3 até a 1:9, sendo esta última a CMI. Também pode-se verificar que o extrato apresenta potencial bactericida quando utilizado na forma pura e na diluição 1:2, com isso observa-se a eficácia do agente, pois mesmo diluído no dobro do volume apresenta a mesma ação do composto inicialmente concentrado.

Lewus, *et al.* (1991) em seus estudos apresenta que bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas apresentam atividade bactericida contra uma série de micro-organismo patogênicos, tais como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, assim como os resultados encontrados neste estudo,

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observa-se a produção de uma bacteriocina pelo *Lactobacillus sakei* assim como a extração deste composto do meio fermentado e sua ação antimicrobiana eficiente contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus*. Assim, através dos resultados encontrados, é possível concluir que o extrato além de ser eficiente no extrato bruto este permanece com ação bactericida na concentração 1:2 e tem como concentração mínima inibitória, nas condições estudadas, a diluição de 1:9, posteriormente a esta o gradiente de diluição não demonstra mais ação bacteriostática sobre o micro-organismo testado.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa e ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos pelo espaço físico.

5. REFERÊNCIAS

- ARAUZ, L. J., JOZALA, A. F., MAZZOLA, T. C. PENNA, V. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in food Science and Technology*, v.20, p. 16-154, 2009.
- BISCOLA, V. *Interações entre bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e a microbiota autóctone de charque*. Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências dos Alimentos. 75 p. 2011.
- ECKNER, K. F. Bacteriocins and food applications. *Dairy Food Environ. Sanit.*, Ames, v.12, n.4, p. 204-209, 1992.
- DESMAUZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. *Tecnol. Lactea Latinoam*. Buenos Aires, v.28, n.8, p. 38-43, 1997.
- LEWUS, C. B., KAISER, A., MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.6, p. 1683-1688, 1991.
- NCCLS: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada – Ed.6,v. 23, nº. 2, 2003.
- NOGUEIRA, J. M. R., MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G., AMENDOEIRA, M. R. R. (orgs.) *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, p. 221- 397, 2009.
- OLIVEIRA, T. F., FERREIRA, J. S., SORTE, P. M. F. B., REIS, V. M., BADANI, J. I., SCHWAB, S. *Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibiótico para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia*. Boletim de pesquisa e desenvolvimento – Embrapa. 1ª ed., 20 p, 2009.
- ROSA, C. M. *Purificação e mecanismo de ação de uma bacteriocina produzida por Lactobacillus sakei 2a isolada de linguiça frescal*. Tese para obtenção de grau de Doutor em Ciência dos Alimentos, p. 98, 2001