

Recebido em:  
27/08/2018

Aceito em:  
12/11/2018

## ESTUDO DE RESISTÊNCIA A CLORETO DE SÓDIO DE BACTERIOCINA DE *Lactobacillus sakei*

Camila Ramão Contessa<sup>1</sup>, Nathieli Bastos de Souza<sup>2</sup>, Guilherme Battú Gonçalo<sup>3</sup>, Luciano dos Santos Almeida<sup>4</sup>, Ana Paula Manera<sup>5</sup>, Caroline Costa Moraes<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Pampa, Curso de Engenharia de Alimentos, Graduanda em Engenharia de Alimentos

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Graduanda em Engenharia de Alimentos

<sup>3</sup> Universidade Federal do Pampa, Curso de Engenharia de Alimentos, Graduando em Engenharia de Alimentos

<sup>4</sup> Universidade Federal do Pampa, Curso de Engenharia de Alimentos, Graduado em Biologia

<sup>5</sup> Universidade Federal do Pampa, Curso de Engenharia de Alimentos, Doutora em Engenharia de Alimentos

<sup>6</sup> Universidade Federal do Pampa, Curso de Engenharia de Alimentos, Doutora em Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: camilaramao@hotmail.com

**RESUMO** – Devido à preocupação com possíveis efeitos adversos à saúde, decorrente da utilização de aditivos químicos, há uma demanda por alimentos seguros, que utilizem aditivos naturais. Neste contexto um bioconservador que tem recebido atenção são as bacteriocinas. Neste trabalho realizou-se a análise de uma bacteriocina obtida de *Lactobacillus sakei*, contra a micro-organismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes* (Gram-positivo) e *Salmonella* spp. (Gram-negativo) e sua estabilidade quanto as concentrações de cloreto sódio permitidas para utilização em queijos. O extrato livre de células foi submetido a concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de NaCl, onde permaneceu por 1 h a uma temperatura de 7°C, o potencial antibacteriano foi avaliado pelo método de microplacas. A bacteriocina sem nenhum tratamento apresentou inibição de 96,8±0,7% sob *Salmonella* spp. e 89,7±2,7% frente a *Listeria monocytogenes*, constatando ainda estabilidade, sem alteração estatística nas concentrações salinas testadas (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%), resultando em 96,3±0,6; 97,1±0,8; 90,2±6,3 e 97,6±0,6 para *Salmonella* spp. e 85,2±2,5; 85,1±0,6; 83,8±2,3 e 83,8±3,4 para *Listeria monocytogenes*. Apresentando-se uma bacteriocina com alternativa viável de bioconservante em produtos com até 2% de NaCl, máxima concentração estudada até o momento.

**Palavras-chave:** Bioconservante. *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. Patógenos. Bactéria ácido láctica.

DOI: 10.5965/24473650412018081

Recebido em:  
27/08/2018

Aceito em:  
12/11/2018

## 1. INTRODUÇÃO

Devido à grande 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).

Comercialmente as únicas bacteriocinas permitidas para utilização em alimentos são, a nisina, obtida a partir de *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis*, e a pediocina PA-1 produzida por *Pediococcus acidilactici*, sendo comercializadas como Nisaplin™ e ALTA™ 2431, respectivamente. Sendo que a nisina é a única considerada pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) como sendo GRAS (*Generally Regarded As Safe*) com uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano. No Brasil é aprovada sua utilização em preparados à base de queijos fundidos e em queijos fundidos, e queijo pasteurizado na concentração máxima de 12,5 mg/kg (BRASIL, 1996; MAPA, 1997; ROSA; FRANCO, 2015).

A nisina é classificada com uma bacteriocina da classe I que se caracteriza como sendo termoestável apresentando de 19 a 50 aminoácidos em sua estrutura e peso molecular inferior a 5 kDa (SILVA, 2007). Seu mecanismo de ação se dá pela despolarização da membrana das células alvo causando a formação de poros (LÓPEZ et al., 2011). Possui especificadamente amplo espectro bactericida para bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, não apresentando, contudo, atividade sob Gram-negativas, leveduras e bolores (OLIVEIRA, 2015). No entanto, existem relatos de que estes patógenos podem adquirir resistência a esta bacteriocina uma vez que apresentam um mecanismo sinalizador da mesma e em consequência um metabolismo de desintoxicação, com isso se tem a busca por novas bacteriocinas, as quais apresentem um espectro de ação mais amplo e eficaz (MARTINS, 2012).

Bromberg et al., (2006) relataram ainda, que a nisina não se apresenta ideal como bioconservante por apresentar uma baixa solubilidade, sendo assim não possui uma distribuição uniforme ao produto apresentando e por consequência um alimento com baixa estabilidade.

Estas estruturas bioativas podem ser encontradas em bactérias Gram-negativas, como as colicinas obtidas de *Escherichia coli*, as quais foram as primeiras bacteriocinas descritas em 1925 por André Gratia e em bactérias Gram-positivas representado pelos lantibióticos produzidos pelas bactérias do ácido lácticas (NASCIMENTO et al., 2008; RILEY; WERTZ, 2002). Lima (2002),

Recebido em:  
27/08/2018

Aceito em:  
12/11/2018

constatou em seus estudos a efetividade de bacteriocinas obtidas de diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis*, apresentando atividade bacteriocinogênica sob diferentes cepas de *E. coli* assim como *Salmonella enteritidis* e *S. aureus*. Bromberg et al. (2006), contataram efeito positivo de uma bacteriocina obtida de *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 contra o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*.

Diante da necessidade de busca por novas bacteriocinas que apresentem atividade antibacteriana contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos assim como estabilidade nas condições dos alimentos permitidos para sua utilização objetivou-se a produção de bacteriocina a partir de uma cepa de *Lactobacillus sakei* previamente isolada de salame italiano bem como seu efeito bacteriano sob *Listeria monocytogenes* (Gram-positivo) e *Salmonella* spp. (Gram-negativo) e sua estabilidade quanto à concentrações de cloreto de sódio permitidas para utilização em queijos.

## 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 Atividade antibacteriana

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.

Recebido em:  
27/08/2018

Aceito em:  
12/11/2018

## 2.3 Estabilidade a cloreto de sódio

O ELC e a amostra controle foram submetidos a concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de cloreto de sódio, onde permaneceram nestas condições por 1 h a uma temperatura de 7°C conforme Camargo (2011). As concentrações escolhidas referem-se ao conteúdo de sal utilizado em queijos, o qual segundo Perry (2003) varia de 0,5 a 2%, tendo em vista a utilização de nisina neste produto, considerou-se essas concentrações de estudo. Como constatação da resistência as concentrações testadas, foram realizadas análises antibacterianas conforme descrito no item 2.2 sob os mesmos micro-organismos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da metodologia empregada se alcançou os resultados apresentados na Tabela 1, onde se constatou a inibição no desenvolvimento de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, na concentração de 0% de cloreto de sódio, 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.

Tabela 1 – Porcentagem de inibição do ELC submetido a diferentes concentrações de cloreto de sódio frente a microbiota testada

	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%
<i>Salmonella</i> spp.	96,8±0,7 <sup>a</sup>	96,3±0,6 <sup>a</sup>	97,1±0,8 <sup>a</sup>	90,2±6,3 <sup>a</sup>	97,6±0,6 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	89,7±2,7 <sup>a</sup>	85,2±2,5 <sup>a</sup>	85,1±0,6 <sup>a</sup>	83,8±2,3 <sup>a</sup>	83,8±3,4 <sup>a</sup>
controle	Não apresentou indícios de inibição				

**Nota:** Letra iguais na linha representam valores de inibição sem diferenças significativas com  $p < 0,05$ , em teste Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autores (2018).

Pegoraro et al. (2016), avaliaram o espectro de ação de bacteriocinas produzidas por 36 diferentes cepas de BAL isoladas de 6 diferentes queijos coloniais, sendo que apenas 5 das bacteriocinas analisadas apresentaram inibição sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas simultaneamente. 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.

Assim como ilustrado na Tabela 1, pode-se perceber que o extrato não apresentou alteração estatística na porcentagem de inibição de ambos micro-organismos quando submetido aos tratamentos, constatando que a bacteriocina se mostrou resistente as concentrações de cloreto

Recebido em:  
27/08/2018

Aceito em:  
12/11/2018

de sódio usadas, não alterando sua efetividade. Percebe-se também que a amostra controle (caldo MRS nas concentrações de NaCl analisadas) não apresentou indícios de inibição, o que vai de acordo com Hoffmann (2001) que relata que *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. conseguem se desenvolver em concentrações em média de até 15% e 8% de cloreto de sódio respectivamente, ressaltando que a concentração de sal utilizada por si só não acarretou para com os resultados obtidos, sendo responsabilidade apenas da ação do ELC.

Camargo (2011) também obteve resultados satisfatórios quanto a resistência de 7 isolados de BAL produtoras de bacteriocina nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de NaCl, nas mesmas condições de tempo e temperatura apresentadas neste trabalho. Poffo e Silva (2011) analisaram BAL isoladas de pescado marinho quanto a resistência em diferentes concentrações de sal, constatando que *Lactobacillus homohiochii* e *Lactobacillus mesenteroides* resistiram a concentrações de 5% de NaCl no meio e *Lactobacillus intestinalis* tolerou uma concentração de 7,5%, evidenciando que não somente algumas bacteriocinas obtidas de *Lactobacillus* como também os próprios micro-organismos produtores destas, apresentam-se com tolerância a meios salinos, podendo assim ter uma atuação no prolongamento da vida útil de alimentos desta natureza.

O estudo de resistência a concentração de sal é relevante devido ao crescimento microbiano se manter muitas vezes afetado em determinadas concentrações, sendo importante a estabilidade de micro-organismos produtores de bacteriocinas assim como as próprias, pois devem permanecer na sua forma viável durante o período de armazenagem do alimento, uma vez que alguns micro-organismos patógenos, podem se desenvolver em algumas concentrações salinas, os bioconservantes devem se apresentar estável a estas concentrações para que permaneçam atuando como inibidores (FURTADO, 1991).

Sendo assim a bacteriocina obtida no presente trabalho apresenta grande potencial antagônico ao desenvolvimento das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa testadas, apresentando-se como uma alternativa viável de bioconservante em produtos com até 2% de NaCl, máxima concentração estudada até o momento.

#### 4. CONCLUSÃO

Através das análises realizadas constatou-se que a bacteriocina obtida da cepa de *Lactobacillus sakei* estudada, apresenta-se como uma boa alternativa de bioconservante, uma vez que exibe atividade antibacteriana frente a micro-organismos patógenos, tanto Gram-negativo como Gram-positivo, exibindo uma inibição de  $96,8 \pm 0,7\%$  sob *Salmonella* spp. e  $89,7 \pm 2,7\%$  frente a *Listeria monocytogenes*. Foi constatado ainda a estabilidade, sem alteração estatística nas concentrações salinas testadas (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%), resultando em  $96,3 \pm 0,6\%$ ;  $97,1 \pm 0,8\%$ ;  $90,2 \pm 6,3\%$  e  $97,6 \pm 0,6\%$  para *Salmonella* spp. e  $85,2 \pm 2,5\%$ ;  $85,1 \pm 0,6\%$ ;  $83,8 \pm 2,3\%$  e  $83,8 \pm 3,4\%$  quando o extrato foi analisado sob *Listeria monocytogenes*, constatando assim o potencial da bacteriocina em atuar como bioconservante em produtos com até 2% de NaCl, que é a máxima quantidade permitida para adição em queijos.

Recebido em: 27/08/2018
Aceito em: 12/11/2018

## 5. 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.

## 6. 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.

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.

BROMBERG, R. et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 26(1): 135-144, 2006.

CAMARGO, R. J. **Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento de vida de prateleira de mortadela fatiada.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 2011.

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.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo.** 2 ed., 297 p., 1991.

Recebido em: 27/08/2018
Aceito em: 12/11/2018

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

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes a proliferação de micro-organismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, v. 9, 2001.

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

LIMA, G. M. S. **Ocorrência de bacteriocinas e caracterização molecular de linhagens de *Zymomonas mobilis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

LÓPEZ, M. M. et al. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, n.12, p. 1205-1220, 2011.

MAPA. PORTARIA Nº 359, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesõn**. 4 set. 1997.

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

NASCIMENTO, M. S. et al. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of food technology**, v. 11, p. 120-127, 2008.

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, p. 19087-1898, 2003.

NISINA UM CONSERVANTE ALIMENTÍCIO NATURAL. **Aditivos & Ingredientes**.

Disponível em:

<[http://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201610/2016100943561001477573436.pdf](http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201610/2016100943561001477573436.pdf)>. Acesso em: 14 agos. 2018.

OLIVEIRA, C. B. **Efeito dos materiais de parede sobre a atividade antimicrobiana da nisina encapsulada em spray-dryer em relação ao *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2015.

PEGORARO, K.; et al. **Espectro de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coloniais**. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvore que sustenta a vida, 2016.

Recebido em:  
27/08/2018

Aceito em:  
12/11/2018

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 2, n. 31 p. 303-307, 2011.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, p. 357–364, 2002.

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.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Revista científica UNINOVE**, v. 1, p. 9-15, 2015.

SILVA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** Varela, 3. ed. 536 p., São Paulo, 2007.