

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES BIODEGRADÁVEIS INCORPORADOS COM SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus curvatus* P99

JULIANA DE LIMA MARQUES¹; GRACIELE DAIANA FUNCK²; GUILHERME DA SILVA DANNENBERG²; CLAUDIO EDUARDO DOS SANTOS CRUXEN²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA²; ÂNGELA MARIA FIORENTINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – ju_marques@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gracifunck@yahoo.com.br, gui.dannenberg@gmail.com, cbrcruxen@hotmail.com, wladimir.padilha2011@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são relevantes na indústria de alimentos, pois diversas espécies são utilizadas em alimentos como bioprotetoras, inibindo a multiplicação de bactérias patogênicas e deteriorantes, pela produção de metabólitos antimicrobianos, principalmente bacteriocinas (HOLZAPFEL et al., 2011).

Lactobacillus curvatus se destaca por fazer parte da microbiota de muitos produtos fermentados e por sua atividade bacteriocinogênica (TODOROV et al., 2013). Nesse sentido, a aplicação de bacteriocinas é uma alternativa promissora na biopreservação de alimentos, visto que não causam alterações sensoriais nos produtos (FERNANDEZ et al., 2003).

As substâncias antimicrobianas quando produzidas por bactérias, em caldo, podem ser separadas por centrifugação, obtendo-as no sobrenadante livre de células (SLC). A vantagem de usar SLC está na possibilidade de outros metabólitos, biologicamente ativos, estarem presentes e causarem efeitos sinérgicos (HARTMANN et al., 2011).

Dessa forma, a incorporação de SLC em filmes biodegradáveis pode trazer contribuição tecnológica para a indústria de alimentos, já que além de reduzir a contaminações por patógenos, poderá auxiliar na separação das fatias de alimentos, como queijo e presunto. Nos últimos anos, pesquisas sobre filmes antimicrobianos biodegradáveis têm sido desenvolvidas a fim de reduzir a contaminação em produtos prontos para o consumo (SANTIAGO-SILVA et al., 2009). Os filmes biodegradáveis são produzidos a partir de polímeros naturais, como o amido e, contribuem como uma alternativa à redução da poluição ambiental, aliado ao seu baixo custo e ampla disponibilidade (HALAL et al., 2015). Com base nisso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de filmes biodegradáveis de amido de batata incorporado com substâncias antimicrobianas produzidas por *L. curvatus* P99.

2. METODOLOGIA

Foi objeto deste estudo um isolado de BAL, denominado *L. curvatus* P99, proveniente de alimentos. O isolado pertence à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Através de análises prévias, foi identificado que esse isolado apresenta potencial bacteriocinogênico. O

SLC produzido pelo isolado P99 foi obtido conforme descrito por BISCOLA et al. (2013), e utilizado nos testes posteriores.

O espectro de ação foi realizado através do teste *spot-on-the-lawn* (BISCOLA et al., 2013). Os micro-organismos indicadores testados foram: *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644, Scott A, Siliken), *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* CLIP 12612, isolados de alimentos de *L. monocytogenes* (L6P4, L80P2, L89P2, L101P5, L115P2, L136P8, L137P2, L142Q2, L148Q5, L149Q2, L164P5, L167Q5, L177P4, L190Q5, L194P5), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Escherichia coli* (O157:H7 and ATCC 43895), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella Enteretidis* ATCC 13076 e *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028. Os testes foram realizados em duplicata.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2012). O micro-organismo indicador utilizado foi *L. monocytogenes* Scott A. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir da transferência de alíquotas de 10 µL de cada poço, onde houve inibição no teste de CIM, para ágar Oxford. A CBM foi considerada como a menor concentração onde não houve multiplicação microbiana neste novo meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata.

Foram elaborados filmes a base de amido de batata, incorporados com o SLC de *L. curvatus* P99, a partir da técnica de *casting* (Soares, 1998). Duas concentrações do SLC (CIM e CBM) foram testadas e um filme sem adição de SLC foi utilizado como controle negativo. Foram preparadas duas repetições de cada tratamento.

A atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com SLC de *L. curvatus* P99 foi avaliada contra os mesmos micro-organismos testados no espectro de ação, através do método de difusão em ágar (BISCOLA et al., 2013). Como controle positivo foi utilizado o SLC, e como controle negativo foram utilizados filmes sem a adição de SLC. A avaliação do tempo de manutenção da atividade antimicrobiana nos filmes foi realizada em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 21 e 30 dias de armazenamento a 36 °C, conforme descrito anteriormente.

A cinética de ação antimicrobiana dos filmes incorporados com SLC de P99 foi verificada conforme descrito por DIAO et al. (2014). Foram divididos três grupos: FC - filme sem incorporação de SLC; FCI - filme incorporado com a CIM; e FCB - filme incorporado com a CBM. Para a quantificação das células viáveis, foram retiradas amostras de cada grupo nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h. Foi realizada uma repetição biológica e as análises foram realizadas em duplicata.

Os resultados obtidos nas análises de espectro e cinética de ação dos filmes foram submetidos às análises de variância (ANOVA) usando o teste de Tukey ($p \leq 0.05$), através do software STATISTICA versão 6.1 (StatSoft, France).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a maior atividade antimicrobiana do SLC de *L. curvatus* P99 foi de $12.800 \text{ UA.mL}^{-1}$ contra *L. ivanovii* ATCC 19119, L164P5 e L194P5. No entanto, não apresentou atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* L115P2, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 43895, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella Enteretidis* ATCC 13076 e *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

O SLC apresentou atividade contra micro-organismos Gram-positivos, no entanto, teve sensibilidade para *E. coli* O157: H7, uma bactéria patogênica Gram-

negativa de importância em doenças de origem alimentares. A maioria das pesquisas envolvendo atividade bacteriocinogênica relata ação limitada sobre as bactérias Gram-positiva. Um problema para o uso de bacteriocinas contra bactérias Gram-negativa é atribuída ao efeito protetor da sua membrana externa, o que dificulta a ação das substâncias antagonistas (MECHAI et al., 2014).

A menor concentração do SLC de P99 necessária para promover efeito bacteriostático (CIM) sobre *L. monocytogenes* Scott A foi de 6.400 UA.mL^{-1} ($15,6 \mu\text{L.mL}^{-1}$), enquanto a ação bactericida (CBM) contra o mesmo micro-organismo, foi de 1.600 UA.mL^{-1} ($62,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$).

Os filmes biodegradáveis elaborados com a CBM do SLC apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas de referência testadas. Os filmes elaborados com a CIM do SLC não foram eficientes contra as culturas de referência *L. monocytogenes* Siliken, *L. innocua* CLIP 12612 e *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, assim como os isolados *L. monocytogenes* L6P4, L101P5, L137P2, L142Q2, L148Q5, L149Q2 e L167Q5.

Considerando que a embalagem isola o alimento de agentes externos, possíveis contaminações microbianas do produto acabado são inerentes de etapas anteriores. Sendo assim, é de interesse que as embalagens antimicrobianas tenham rápida ação, impedindo e/ou retardando a multiplicação celular bacteriana durante o armazenamento. Neste contexto, o mecanismo de liberação, determinado pelas interações entre o material polimérico que compõem a matriz e o agente antimicrobiano incorporado a mesma (HYLDGAARD et al., 2012), deve possibilitar uma rápida liberação.

No presente estudo, o ensaio de cinética de ação do filme demonstrou que o amido de batata permitiu rápida liberação da substância antimicrobiana do SLC de *L. curvatus* P99. Foram observadas diferenças ($p \leq 0,05$) na cinética de ação antimicrobiana entre os três tratamentos (FC, FCI e FCB) em 3 h a 48 h de incubação (Figura 1). Um aumento de $4,86 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ para a contagem do patógeno foi observada no tratamento FC. No entanto, a contagem de *L. monocytogenes* foi de $1,83$ e $2,83 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ inferior ao controle nos filmes FCI e FCB, respectivamente. O filme FCB apresentou uma redução de $1 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, quando comparado com a FCI.

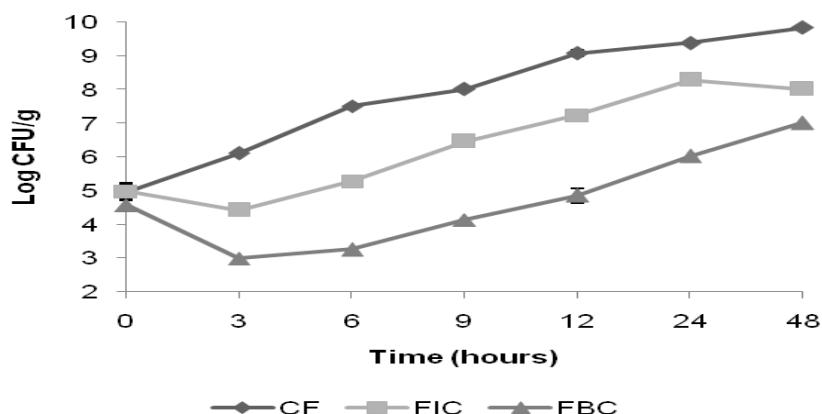


Figura 1 – Cinética de ação antimicrobiana de filmes incorporados com sobrenadante livre de células (SLC) contendo substâncias antimicrobianas de *L. curvatus* P99. FC: filme controle; FCI: filme contendo SLC na concentração inibitória mínima; FCB: filme contendo SLC na concentração bactericida mínima. Dados apresentados como media ± desvio padrão (n=4).

4. CONCLUSÕES

O SLC produzido por *L. curvatus* P99 teve ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Os filmes produzidos com a CIM e a CBM do SLC tiveram atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas e, mantiveram sua atividade durante 30 dias. No entanto, estudos complementares estão sendo realizados, como a caracterização da substância antimicrobiana. Estes testes são necessários para garantir a segurança na aplicação dessa substância em um sistema alimentar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIOUNEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B.D.G.M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v.93, p.607–613, 2013.
- CLSI, 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition.
- DIAO, W.R.; HU, Q.P.; ZHANG, H.; XU, J.G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v.35, p.109–116, 2014.
- FERNANDÉZ, J.M.; FERNANDÉZ-LOPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E.; SENDRA, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Effect of storage conditions on quality characteristics of Bologna sausages made with citrus Fiber. **Journal of Food Science**, v.68, p.710-715, 2003.
- HALAL, S.L.M.EI.; COLUSSI, R.; DEON, V.G.; PINTO, V.Z.; VILLANOVA, F.A.; CARREÑO, N.L.V.; DIAS, A.R.G., ZAVAREZE, E.da R. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. **Carbohydrate Polymers**, v.133, p.644-653, 2015.
- HARTMANN, H.A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.146, p.192–199, 2011.
- HOLZAPFEL, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.365–373, 2001.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L.; DEBABOV, D. Essential oils in food preservation: mode of action , synergies , and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.1–24, 2012.
- MECHAI, A.; DEBABZA, M.; KIRANE, D. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LB65, isolated from Algerian traditional fresh cheese (Jben). **Advances Environmental Biology**, v.8, p.1222–1232, 2014.
- SANTIAGO-SILVA, N.F.F.; SOARES, J.; NÓBREGA, E. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v.20, p.85–89, 2009.
- SOARES, N.F.F. 1998. Bitterness reduction in citrus juice through narinase immobilized into polymer film. New York: Cornell University. 130p.
- TODOROV, S.D.; VAZ-VELHO, M.; FRANCO, B.D.G.M.; HOLZAPFEL, W.H. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal. **Food Control**, v.30, p.111-121, 2013.