

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO DE CARNE DE CORVINA FRENTE A *Yersinia enterocolitica*

THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES¹; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA²;
JULIANA FERNANDES ROSA³; GREYCE SILVEIRA MELLO⁴; KAUANA
KAEFER⁵; CLÁUDIO DIAS TIMM⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – thamiris.p@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ju_fernandes.r@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – greycemello@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – kauanakafer@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – timmm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Segundo Brasil (2018), entre os anos de 2009 a 2018, ocorreram 2.350 surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no país e, destes, os pescados foram responsáveis por 2,1%. Os pescados são alimentos suscetíveis à proliferação microbiana, principalmente devido às suas características intrínsecas, como alta atividade de água, grande biodisponibilidade de macro e micronutrientes, alto teor de gorduras insaturadas de fácil oxidação e pH próximo da neutralidade (da ROCHA et al., 2013). A contaminação com micro-organismos patogênicos pode ocorrer já no seu ambiente natural de vida e permanecer após a captura, durante o transporte e processamento na indústria, podendo chegar até o ambiente de comercialização e carrear os patógenos para objetos e utensílios dos locais de venda (BARRETO et al., 2012; FARIAS, 2006). Outro fator que pode influenciar na contaminação do produto final é a ação do homem na cadeia produtiva, já que manipuladores de alimentos possuem um papel importante na disseminação de patógenos (REIS et al., 2017).

Yersinia enterocolitica é uma bactéria Gram negativa que causa doença transmitida por alimentos (DTA), sendo responsável por causar síndromes gastrointestinais, que variam de enterite aguda a linfadenite mesentérica. Este micro-organismo tem sido isolado de amostras ambientais, como lagoas e lagos, e de alimentos, como carne de porco, carne bovina, ostras, peixe e leite cru. É uma bactéria psicrófila, capaz de se multiplicar em temperaturas usualmente utilizadas durante o armazenamento do pescado. Além disso, também resiste ao congelamento, aumentando sua importância em doenças transmitidas por pescados (FALCÃO e FALCÃO, 2006). Já foi isolada de diversos animais marinhos, como corvina (*Micropogonias furnieri*) e linguado (*Paralichthys orbignyanus*) (ROSA et al., 2019, no prelo), também de outros frutos do mar, como por Li et al. (2018), que isolaram, na Alemanha, de mexilhão, camarão e cefalópodes.

A hidrólise enzimática é um processo proteolítico enzimático, em que as enzimas atuam como catalisadores biológicos, acelerando a hidrólise das proteínas, resultando na clivagem das ligações peptídicas com produção de peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (CENTENARO, 2001; SILVA et al., 2014), que podem ter ação antimicrobiana (SILVA et al., 2014). De acordo com Chou et al. (2016), essa atividade pode ser explicada pela porção hidrofóbica e carga positiva dos hidrolisados, que ao se ligarem à superfície aniônica dos micro-organismos induzem a ruptura da membrana bacteriana. Além de ser um método de aproveitamento e agregação de valor aos produtos oriundos de pescado, sejam eles os destinados ao descarte, como os subprodutos, ou

carne de peixes de baixo custo de produção (CENTENARO, 2011), os hidrolisados proteicos também têm potencial para serem utilizados diretamente nos alimentos prontos para o consumo com a finalidade de impedir a contaminação do mesmo por micro-organismos patogênicos (CORTEZ-VEGA et al., 2014).

Portanto, esse trabalho tem como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de hidrolisados proteicos oriundos de carne de corvina com ação das enzimas novozym e pepsina com diferentes concentrações e tempos de hidrólise

2. METODOLOGIA

Foram obtidas corvinas evisceradas no Mercado Central de Pelotas. Para a obtenção da carne de pescado, foi feita a filetagem dos pescados limpos e eviscerados. Então, o filé foi triturado até obtenção de polpa, lavado com água clorada (5 ppm) 1:5 (p/v), homogeneizado com água MilliQ e teve o pH ajustado com NaOH ou HCl para o ideal de cada enzima utilizada.

As enzimas utilizadas foram pepsina (obtida da mucosa de estômago suíno, Sigma-Aldrich, Brasil) e novozym (protease espectral obtida por fermentação de *Aspergillus* sp., Sigma-Aldrich, Brasil).

O isolado proteico de peixe foi obtido a partir da homogeneização da carne com água (1:9 p/v) em banho-maria ultratermostático por 5 minutos a 2-3°C com agitação, então ocorreu a solubilização de proteínas com adição de NaOH 1M (pH 11,2) por 20 minutos. A mistura foi centrifugada (7.500 x g/15 minutos), o sobrenadante separado e precipitado com HCl 1M (pH 5,2) também por 20 minutos e centrifugação, para retirada do resíduo líquido (sobrenadante), então, o precipitado foi adicionado de água 1:1 e filtrado (SILVA et al., 2014).

Antes de iniciar a reação de hidrólise, as enzimas endógenas dos isolado proteicos de peixe foram inativadas, por aquecimento a 85°C/15 minutos. A reação de hidrólise ocorreu em reator de vidro de parede dupla conectado a um banho termostatizado, foram testadas duas concentrações (5 e 10%) e dois tempos de hidrólise para ambas enzimas (15 e 30 minutos). Foi ajustado o pH para o ideal de cada enzima, para pepsina 2,0 e para novozym 8,0.

Para interromper a reação de hidrólise, as misturas foram aquecidas a 95°C durante 15 minutos. E mantidas sob refrigeração (-18°C).

Três cepas de *Y. enterocolitica* previamente isoladas por ROSA et al. (2019, *no prelo*) de linguado (uma) e de corvina (duas) foram utilizadas no estudo.

A atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos foi determinada através do teste de disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton (MH, Acumedia, Lansing, Michigan, USA), conforme técnica recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2012). As cepas de *Y. enterocolitica* foram recuperadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, *Brain Heart Infusion*, Acumedia) por 24 horas. Então, 100 µL de cada cultura, com padronização prévia de concentração, através de contagem do crescimento e medição da densidade ótica, em 10⁸ UFC/mL, foram semeados na superfície de MH. Após, foram colocados discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro impregnados com as soluções dos hidrolisados nas diferentes concentrações e tempos de hidrólise. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Então, foi verificada a formação de halos. Foram consideradas sensíveis as cepas que apresentaram halos maiores que o diâmetro do disco de papel filtro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Hidrolisados de pepsina a 5% com 15 e 30 minutos de reação de hidrólise tiveram ação antimicrobiana frente aos isolados obtidos de linguado, porém a ação frente aos isolados de corvina na mesma concentração foi observada apenas com 30 minutos de hidrólise. O hidrolisado de novozym a 5% com 15 minutos de hidrólise teve ação frente ao isolado de linguado. Então, ambas enzimas na menor concentração testada, ou seja, 5% já são eficientes na eliminação do micro-organismo avaliado e a ação antimicrobiana desses hidrolisados é afetada pelo tempo de hidrólise usado para sua obtenção, sendo 30 minutos o melhor tempo para a pepsina e 15 minutos para a novozym.

Assim como no presente estudo, da Rocha et al. (2018) também avaliaram a ação antimicrobiana de duas enzimas proteolíticas e obtiveram resultados semelhantes ao apresentado, com ação antimicrobiana das enzimas alcalase e protamex frente a micro-organismos Gram negativos. Robert et al. (2015), que testaram protamex frente a outra espécie de *Yersinia*, *Y. ruckeri*, comum de ser isolada em pescados, também identificaram ação antimicrobiana da enzima. As enzimas utilizadas no nosso estudo não foram abordadas por outros pesquisadores frente ao micro-organismo avaliado, portanto, este é o primeiro estudo que avaliou a ação antimicrobiana de novozym e pepsina frente a *Y. enterocolitica*. Os resultados obtidos indicam que os hidrolisados estudados têm potencial para uso em alimentos à base de pescados com vistas ao controle da contaminação por *Y. enterocolitica*.

4. CONCLUSÕES

Hidrolisados proteicos oriundos de carne de corvina com pepsina e novozym tem ação antimicrobiana frente a *Yersinia enterocolitica*. A menor concentração testada, 5%, já tem ação eficaz e ambos tempos de hidrólise também, entretanto mais testes devem ser feitos com outros micro-organismos para verificar o espectro de ação antimicrobiana dos hidrolisados..

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO, N.S.E.; MOURA, F.D.C. M.; TEIXEIRA, J.A.; ASSIM, D.A.; MIRANDA, P.C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**. v.25, n.3, p.86-95, 2012.

BRASIL, Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2018. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em 23 mar. 2019.

CENTENARO, G.S. **Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. 2011. 158f. Tese – Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

CHOU, S.; SHAO, C.; WANG, J.; SHAN, A.; XU, L.; DONG, N.; LI, Z. Short, multiple-stranded β -hairpin peptides have antimicrobial potency with high selectivity and salt resistance. **Acta biomaterialia**. v.30, p.78-93, 2016.

CLSI, C. M02-A11 performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Wayne, Pennsylvania, USA: **Clinical and laboratory standards institute** (CLSI), 950p, 2012.

CORTEZ-VEGA, W.R.; PIZATO, S.; de SOUZA, J.T.A.; PRENTICE, C. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improve the conservation properties of fresh-cut 'Formosa' papaya. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v.22, p.197-202, 2014.

FALCÃO, J.P.; FALCÃO, D.P. Importância de *Yersinia enterocolítica* em Microbiologia Médica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.27, n.1, p.9-19, 2006.

FARIAS, M.D.C.A. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém-Pará**. 2006. 67f. Dissertação – Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

LI, C.; GÖLZ, G.; ALTER, T.; BARAC, A.; HERTWIG, S.; RIEDEL, C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in retail seafood. **Journal of food protection**. v.81, n.3, p.497-501, 2018.

REIS, D.H.C. Avaliação do perfil microbiológico do peixe *Pseudoplatystoma corruscans* e *Colossoma macropomum* (pintado e tambaqui), comercializados no município de Rolim de Moura, tendo em foco a saúde pública. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**. v.6, n.1, p.21-28, 2017.

ROBERT, M.; ZATYLNÝ-GAUDIN, C.; FOURNIER, V.; CORRE, E.; Le CORGUILLÉ, G.; BERNAY, B.; HENRY, J. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. **Process Biochemistry**. v.50, n.3, p.487-492, 2015.

da ROCHA, F.A.G.; de ARAÚJO, L.O.; ALVES, K.S.; DANTAS, L.Í.S.; da SILVA, R.P., de ARAÚJO, M.F.F. Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. **Holos**. v.1, p.84-91, 2013.

da ROCHA, M.; ALEMÁN, A.; ROMANI, V.P.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P.; PRENTICE, C. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. **Food hydrocolloids**. v.81, p.351-363, 2018.

ROSA, J.V.; ADAMATTI, A.I.; TIMM, C.D. *Yersinia enterocolítica* em pescados do Estuário da Lagoa dos Patos. **Zootecnia Tropical**. 2019, no prelo.

SILVA, C.M.; da FONSECA, R.A.D.S.; PRENTICE, C. Comparing the hydrolysis degree of industrialization byproducts of Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) using microbial enzymes. **International Food Research Journal**. v.21, n.5, p.1757, 2014.