

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE NISINA FRENTE A PATÓGENOS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS

GREYCE SILVEIRA MELLO¹; JULIANA FERNANDES ROSA²; THAMIRÍS PEREIRA DE MORAES³; HELENICE GONZALEZ DE LIMA⁴; NATACHA DEBONI CERESER⁵; CLÁUDIO DIAS TIMM⁶

¹UFPel – greycemello@gmail.com

²UFPel – ju_fernandes.r@otmail.com

³UFPel – thamiris.p@outlook.com

⁴UFPel – helenicegonzalez@hotmail.com

⁵UFPel – natachacereser@yahoo.com.br

⁶UFPel – timm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Dados divulgados pelo Ministério da Saúde demonstram que entre os anos 2000 e 2017 foram notificados 12.503 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil, sendo 33% destes na Região Sul. Apenas em 2.593 casos o agente etiológico foi identificado e, destes, 92,2% foram causados por bactérias, principalmente *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2017).

Para diminuir a contaminação microbiana e prolongar a vida de prateleira dos alimentos, utilizam-se aditivos, porém, o crescimento na procura por alimentos minimamente processados é elevado. É cada vez maior, por parte dos consumidores, a busca por alimentos seguros e com menor utilização de aditivos sintéticos (ARQUÉS et al., 2011; CLEVELAND et al., 2001; NEGI, 2012). O interesse na aplicação de metabolitos naturais em alimentos, como as bacteriocinas, aumentou durante a última década (BALI et al., 2014), fato que tem incentivado pesquisas para melhorar as tecnologias de processamento.

Bacteriocinas são peptídeos com capacidade antimicrobiana sintetizados por bactérias. A inoculação de alimentos com cepas de bactérias selecionadas ou seus metabólitos, como as bacteriocinas, é um procedimento conhecido como biopreservação (RODGERS, 2001). A biopreservação de alimentos apresenta benefícios em vários aspectos, como redução do risco de intoxicação alimentar, aumento da vida útil de produtos, diminuição de perdas econômicas pela deterioração, redução da adição de conservadores sintéticos e redução da intensidade de tratamentos físicos, além de atender a demanda de consumidores por produtos com aspecto natural e frescos (MESSAOUDI et al., 2013).

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e tem demonstrado eficácia contra bactérias patogênicas importantes em alimentos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, assim como em células vegetativas e esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (CLEVELAND et al., 2001; BOWER et al., 2002; MCAULIFFE et. al. (2001). Entretanto, DAMACENO et. al. (2014) verificaram sensibilidades distintas quando compararam microrganismos isolados de diferentes regiões, demonstrando que a ação antimicrobiana da nisina é variável e deve ser testada frente às cepas que ocorrem em determinada região para que o seu uso possa ou não ser localmente recomendado.

O objetivo do trabalho foi verificar a ação da nisina frente a microrganismos patogênicos contaminantes de alimentos, testando cepas de referência e cepas regionais isoladas de leite.

2. METODOLOGIA

A ação da nisina foi testada frente aos seguintes microrganismos: *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sorotipos Typhimurium (ATCC 13311) e

Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458 e 25923). Além dos microrganismos de referência citados, também foram testadas 3 cepas selvagens, isoladas e identificadas como *S. aureus* por MORAES et. al. (2019), provenientes de leitarias da região de Pelotas, Rio Grande do Sul.

Culturas *overnight* a 37°C em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan, USA) de cada cepa foi padronizada para concentração aproximada de 10^8 UFC/mL para posterior diluição seriada e uso nos testes.

Foi realizada análise de disco-difusão de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (2015), com algumas modificações, na qual 0,1 mL da cultura foi uniformemente semeado na superfície de ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Roseto Degli Abruzzi, Italia). Discos de papel filtro estéreis com 6 mm de diâmetro foram depositados sobre o meio inoculado, e então foram impregnados com 5 µL da solução de nisina na concentração de 1 g de Nisyn (Prozyn, Butantã, São Paulo, Brasil) para 5 mL de água destilada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Discos sem adição de óleo foram analisados como controle de multiplicação.

Após a incubação, foi medido o diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano, incluindo o diâmetro do disco. A não formação de halo de inibição foi considerado como resistência à nisina. As análises foram realizadas em triplicata. .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nisina apresentou efeito antimicrobiano frente a *S. aureus* ATCC 25923, mas não teve ação inibitória sobre a *S. aureus* ATCC 14458, *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Considerando estes resultados, a atividade antimicrobiana da nisina foi testada frente a três cepas selvagens de *S. aureus*, demonstrando ação inibitória sobre as três cepas. A média dos valores dos halos formados estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados da difusão em disco da nisina frente às cepas de *S. aureus* sensíveis.

Microrganismo	Média dos halos (mm)
ATCC 25923	15
Selvagem 1	17
Selvagem 2	17
Selvagem 3	18

Embora a nisina não tenha demonstrado ação sobre uma das duas cepas de referência de *S. aureus* testadas, a outra mostrou sensibilidade a ela, o que demonstra variação da atividade inibitória sobre essa espécie, portanto, justificando os testes com cepas selvagens. O efeito inibitório sobre as cepas regionais deste microrganismo abre a perspectiva de que a sua utilização em alimentos produzidos na região, como queijo colonial por exemplo, possa ser uma forma alternativa de controle da contaminação do alimento por estes microrganismos. Entretanto, o número de cepas selvagens utilizado até o momento é ainda pequeno e novas cepas isoladas na região deverão ser testadas antes que o uso da nisina possa ser recomendado.

Bastante se discute a respeito do mecanismo de ação das bacteriocinas. Segundo MCAULIFFE et. al. (2001), as bacteriocinas atuam formando poros na membrana e, portanto, alterando a sua energia potencial e, ou o gradiente de pH.

Essas modificações na membrana resultam no extravasamento do material celular levando a célula à morte.

E.coli e os diferentes sorotipos de *Salmonella* quando testados não apresentaram sensibilidade, isso pode ser explicado pelo fato dessas bactérias serem Gram-negativas. A presença da camada de lipopolissacarídeo oferece maior proteção à célula, não permitindo que agentes externos alcancem a membrana citoplasmática. A camada de lipopolissacarídeo é formada por compostos de caráter aniónico, gerando uma superfície hidrofílica, desse modo, a membrana externa repulsa substâncias hidrofóbicas e macromoléculas, como a nisina (HELANDER et. al., 2000). De acordo com PARADA (2007), essas bactérias podem tornar-se sensíveis à nisina se pré-tratadas com substâncias (ácidos, detergentes, quelantes) ou tratamentos físicos (choque osmótico) que alterem a estabilidade e causem danos à membrana externa.

L. monocytogenes embora seja uma bactéria Gram-positiva, apresentou resistência à nisina, isso pode ter ocorrido por individualidade da cepa testada, uma vez que esta vem sendo trabalhada em ambiente de laboratório há bastante tempo, podendo ter ocorrido mutações na sua estrutura. Esse fato pode explicar a resistência também da cepa de *S. aureus* ATCC 14458.

Apesar da nisina não ter apresentado efeito sobre as cepas de referência de *Salmonella*, *E. coli* e *L. monocytogenes*, novos testes serão realizados com cepas selvagens desses microrganismos para verificar a possibilidade de sensibilidade das cepas regionais, especialmente de *L. monocytogenes*, uma vez que outros trabalhos (CLEVELAND et al., 2001; BOWER et al., 2002; MCAULIFFE et al., 2001) demonstraram resultados antagônicos da nisina frente a esse microrganismo.

4. CONCLUSÕES

A nisina tem ação inibitória sobre cepas selvagens de *S. aureus*, logo os resultados demonstram seu potencial para aplicação em alimentos. Entretanto, é necessária a realização de testes com um número maior de cepas selvagens para confirmar a sua eficiência frente a este patógeno. A nisina não tem efeito inibitório sobre as cepas de referência testadas de *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *E. coli* e *L. monocytogenes*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑES, M.; MEDINA, M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in Milk. **Food Control**, Oxford, v. 22, p. 457-461, 2011.

BALI, V.; PANESAR, P.S.; BERA, M.B. Potencial of immobilization technology in bacteriocin production and antimicrobial packaging. **Food Reviews International**, v. 30, p. 244-263, 2014.

BOWER, C. K.; PARKER, J. E.; HIGGINS, A. Z.; OEST, M. E.; WILSON, J. T.; VALENTINE, B. A., BOTHWELL, M. K.; McGuIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**, v. 25, p. 81-90, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2017**.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, p. 1-20, 2001.

DAMACENO, M. N.; BANDEIRA, M. G. L.; SILVA, J. A.; COSTA, W. R. S.; GOMES, J. S.; OLIVEIRA, V. M. S.; SOUZA, W.; PAIVA, NETO, F. E. S. Aplicação de nisina como revestimento comestível em queijo coalho. **Revista Saúde e Ciência on line**, v. 3, n. 3, p. 297-304, 2014.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.-H.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 285-308, 2001.

MESSAOUDI, S.; MANAI, M.; KERGOURLAY, G.; PRÉVOST, H.; CONNIL, N.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity, **Food Microbiology**, London, v. 36, p. 296-304, 2013.

MORAES, T.P. **Similaridade genética entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados de leitarias e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências.) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **The Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard. 2015

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 156, p. 7-17, 2012.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures e a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 1, p. 276-84, 2001.