

## AÇÃO ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADO PROTEICO OBTIDO DE OSSO DE CORVINA FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARES

**THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES<sup>1</sup>; JULIANA FERNANDES ROSA<sup>2</sup>; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA<sup>3</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [thamiris.p@outlook.com](mailto:thamiris.p@outlook.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – [ju\\_fernandes@hotmail.com](mailto:ju_fernandes@hotmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [debora.rsilveira@hotmail.com](mailto:debora.rsilveira@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [timm@ufpel.edu.br](mailto:timm@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Segundo PEIXE BR (2019), a produção pesqueira no Brasil cresceu 4,9% no ano de 2019. Essa atividade é realizada desde os primórdios da humanidade e representa uma fonte de renda para as famílias que vivem nas cercanias de rios e mares. De acordo com os dados da FURG/MPA (2018), foram pescados 16.612.374 kg de peixe com pesca artesanal no estado do Rio Grande do Sul no ano de 2018. A pesca de corvina (*Micropogonias furnieri*) representou 14% do total pescado, com 2.241.125 kg. O processamento do pescado gera diversos resíduos que, quando não descartados da forma correta podem se tornar poluentes ambientais. Os ossos representam cerca de 16% do peso do peixe vivo e são perecíveis, devido à sua composição, acarretando contaminação ambiental quando descartados de forma inadequada (REN et al., 2012).

Os hidrolisados proteicos permitem a transformação do que era poluente ou resíduo de baixo valor em produtos de excelente qualidade e com alto valor agregado ao produto final (da ROSA ZAVAREZE et al., 2014). Também podem ter ação antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos que são veiculados por alimentos (SILVA et al., 2014).

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). Segundo BRASIL (2018), os pescados estavam relacionados a 2,1% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) relatados no Brasil entre os anos de 2009 a 2018.

Dentre esses microrganismos, *Yersinia enterocolitica* é causador de infecção entérica em humanos (CDC, 2019a), assim como *Salmonella*, que pode causar diarreias severas (CDC, 2020). *Vibrio parahaemolyticus* é responsável por causar enterite, principalmente em pessoas que consomem pescados crus ou mal cozidos (CDC, 2019b).

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar ação antimicrobiana de hidrolisados proteicos obtidos a partir de osso de corvina com enzimas específicas frente a isolados de *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Enteritidis* e *S. Typhimurium* e *Vibrio parahaemolyticus*.

### 2. METODOLOGIA

Foram obtidas corvinas evisceradas no mercado central de Pelotas e encaminhadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo reutilizável. Os ossos foram separados manualmente da carne e deixados em solução de HCl 0,1M por 24 horas a 4°C para retirada da carne que ainda estivesse aderida. Então, foram mantidos a 35°C até secagem total e triturados para passar pelo

processo de desmineralização. Foi feita homogeneização com HCl 3% (1:5) a 600 rpm/5 min a 4°C e mantido o tratamento ácido por 24 horas. Após, a mistura foi lavada com água destilada a 35°C e sofreu centrifugação a 9.000 x g por 20 min. Esse processo foi feito duas vezes. Então, o sedimento resultante foi lavado com água destilada a 35°C até que fosse atingido o pH 6,0. Feita uma filtragem com filtro de algodão, seguida de secagem a 35°C por 48 horas.

Antes de iniciar a reação de hidrólise, as enzimas endógenas dos isolados proteicos de ossos 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 as enzimas pepsina e novozym em três concentrações (2, 5 e 10%) e dois tempos de hidrólise (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 a -18°C.

Três cepas de *Y. enterocolitica* previamente isoladas por ROSA et al. (2020) foram utilizadas no estudo, além de duas cepas de *Salmonella*, uma *S. Typhimurium* (ATCC 13311) e uma *S. Enteritidis* (ATCC 130786) e também uma de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802).

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* e *Salmonella* foram recuperadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, *Brain Heart Infusion*, Acumedia) e as de *V. parahaemolyticus* em água peptonada alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia), todas 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 10<sup>8</sup> UFC/mL, foram semeados na superfície de MH. Para *V. parahaemolyticus*, o MH foi acrescido de NaCl 1%. 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

Os resultados são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Ação inibitória dos hidrolisados com diferentes tempos de reação de hidrólise e diferentes concentrações enzimáticas frente a *Y. enterocolitica*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *V. parahaemolyticus*

Isolados	Hidrolisados							
	P30' 2%	P30' 5%	P15' 10%	P30' 10%	N15' 2%	N15' 5%	N30' 5%	
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+	-	+	+	-	-	+

+: houve ação inibitória; -: não houve ação inibitória; N: novozym; P: pepsina

REN et al. (2012) avaliaram a ação antimicrobiana de hidrolisados proteicos obtidos com ossos de bagre-americano (*Ictalurus punctatus*) com cinco proteases diferentes, obtendo melhores resultados com o hidrolisado produzido com pepsina a 2%, que apresentou a melhor ação antimicrobiana frente a isolados de *Escherichia coli*, resultado semelhante aos nossos, em que hidrolisados de pepsina a 2% também se mostraram capazes de inibir microrganismos contaminantes de alimentos. SILVA (2014) avaliou a ação de hidrolisados proteicos obtidos a partir de ossos de corvina com duas diferentes enzimas, alcalase e flavourzyme, e ambos hidrolisados, assim como no nosso estudo, apresentaram ação antimicrobiana frente a *S. Enteritidis*, o que reforça que este microrganismo pode ser inibido frente a hidrolisados proteicos obtidos a partir de ossos de pescados. GOMÉZ-GUILLEN et al. (2010) avaliaram a ação antimicrobiana de hidrolisados proteicos obtidos com pele de lula-de-humboldt (*Dosidicus gigas*) e de atum (*Tunna spp*) com alcalase e obtiveram resultados positivos em se tratando de inibição do crescimento de *Y. enterocolitica* e *Salmonella choleraesuis*. A composição da pele dos pescados é bastante semelhante à dos ossos, uma vez que a proteína presente em maior quantidade em ambos é o colágeno e, portanto, os hidrolisados proteicos com esses materiais apresentam similaridade quanto à sua ação.

A ação antimicrobiana desses hidrolisados proteicos pode ser uma opção viável para valorização do produto e também na segurança dos alimentos ofertados aos consumidores, agregando valor a subprodutos que muitas vezes são descartes industriais. Entretanto, mais testes devem ser realizados no sentido de estabelecer a concentração e a forma de aplicação dos hidrolisados visando ao controle do maior número possível de espécies bacterianas indesejáveis no alimento.

#### 4. CONCLUSÕES

Hidrolisado proteico obtido a partir de ossos desmineralizados de corvina com novozym a 2% é eficiente para inibir o crescimento de *V. parahaemolyticus* e a 5% é capaz de inibir o crescimento de *Salmonella*. Já, o hidrolisado obtido com pepsina inibe o crescimento de *V. parahaemolyticus* tanto a 2 como 5 e 10%, entretanto é necessária a concentração de 10% para ser obtido um efeito eficiente na eliminação de *Y. enterocolitica*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 08 set. 2020.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella**. Acessado em 08 set 2020. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/>.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. ***Vibrio Species Causing Vibriosis***. CDCb. Acessado em 08 set. 2020. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vibrio/>.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. ***Yersinia enterocolitica (Yersiniosis)***. CDCa. Acessado em 08 set. 2020. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yersinia/faq.html>.

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

FURG/MPA. **Boletim Estatístico da Pesca Marinha do Sul do Rio Grande do Sul – 2018**. Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Estatística Ambiental, Rio Grande – RS. 50p. 2018.

GOMÉZ-GUILLÉN, G.; LÓPEZ CABALLERO, M.E.; ALEMÁN, A.; LÓPEZ de LACEY, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO GARCÍA, P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. ***Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application***, Índia, p.89-115, 2010.

PEIXE, B.R. **Anuário PeixeBr da Piscicultura 2020**. 2020. Acessado em 08 set. 2020. Online, v. 28, 2019. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>.

REN, X.; MA, L.; CHU, J.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; YANG, H.; An, H. Optimization of enzymatic hydrolysis of channel catfish bones for preparing antimicrobial agents. ***Journal of Aquatic Food Product Technology***, v.21, n.2, p.99-110, 2012.

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.

ROSA, J.V.; SOUZA, A.I.; TIMM, C.D. ***Yersinia enterocolitica* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos. *Zootecnia Tropical***, no prelo.

da ROSA ZAVAREZE, E.; TELLES, A.C.; EI HALAL, S.L.M.; da ROCHA, M.; COLUSSI, R.; de ASSIS, L.M.; CASTRO, L.A.S.; DIAS, A.R.G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. ***LWT-Food Science and Technology***, v.59, n.2, p.841-848, 2014.

SILVA, C.M. Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por hidrolisados enzimáticos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*). 2014. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.