



## POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Saccharomyces boulardii* E *Pichia pastoris* CONTRA *Salmonella Typhimurium* E *Escherichia coli*

**Bandeira, Rafaela Oliveira<sup>1</sup>; MAGALHÃES, Luciane Nunes<sup>2</sup>; Bemvenuti, Mariana de Azevedo<sup>3</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo<sup>4</sup>; MOURA, Tiane Martin<sup>5</sup>; PIRES, Cibele Ferreira<sup>6</sup>; MOREIRA, Ângela Nunes<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: [nutribandeira@gmail.com](mailto:nutribandeira@gmail.com)

<sup>2</sup> Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: [luufpel@yahoo.com.br](mailto:luufpel@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: [mari.bemvenuti@gmail.com](mailto:mari.bemvenuti@gmail.com)

<sup>4</sup> Centro de Biotecnologia - UFPel. Email: [frochedo@ufpel.edu.br](mailto:frochedo@ufpel.edu.br)

<sup>5</sup> Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: [tianedemoura@gmail.com](mailto:tianedemoura@gmail.com)

<sup>6</sup> Faculdade de Nutrição - UFPel. Email: [cibipires@gmail.com](mailto:cibipires@gmail.com)

<sup>7</sup> Faculdade de Nutrição e Centro de Biotecnologia - UFPel - Caixa Postal 354, Cep 96.010-900, Pelotas, RS, Brasil. Email: [angelanm@ufpel.edu.br](mailto:angelanm@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A inibição do crescimento de microrganismos patogênicos é uma propriedade desejável para probióticos. Diversos probióticos parecem exercer uma função antimicrobiana. Estudos têm demonstrado que esse efeito pode ocorrer devido à competição por nutrientes, à competição pela aderência ao epitélio intestinal, a efeitos imunoestimulatórios sobre a mucosa intestinal ou, ainda, devido à produção de uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem afetar não somente a viabilidade celular, mas também o metabolismo bacteriano ou a produção de toxinas. Entretanto, os mecanismos pelos quais grande parte dos probióticos exercem seus efeitos benéficos permanecem não elucidados.

*Saccharomyces boulardii* apresenta propriedades que o tornam um agente probiótico potencial, tais como sobrevivência ao trânsito através do trato gastrointestinal e temperatura ótima de crescimento a 37° C (Czerucka & Rampal, 2007). Além disso, ensaios em animais e seres humanos, assim como estudos *in vitro*, têm demonstrado que *Saccharomyces boulardii* pode ter um papel protetor e atividades específicas contra vários patógenos entéricos (Czerucka & Rampal, 2002). Entretanto, os mecanismos através dos quais *Saccharomyces boulardii* exerce seus efeitos benéficos ainda não foram inteiramente caracterizados.

*Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica utilizada como sistema de expressão de proteínas (Cereghino & Cregg, 2000). Atualmente, estudos visando à avaliação de possíveis efeitos probióticos dessa levedura estão em andamento no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano das células de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*, e do sobrenadante de seus cultivos, contra *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* através do teste de difusão em ágar.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos e condições de cultivo

*Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* foram cultivadas em caldo YPD por 48 h à 28° C, 150 rpm. *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* foram cultivadas em caldo BHI a 37° C, 200 rpm por 24 h.

### 2.2 Preparo dos sobrenadantes dos cultivos de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*

O preparo dos sobrenadantes dos cultivos foi realizado utilizando-se metodologia descrita por Millette et al. (2007) com modificações. Cultivos de 48 h de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* foram centrifugados a 12000 g por 10' a 4°C, as células reservadas e os sobrenadantes e uma amostra de caldo YPD não inoculado (controle) foram concentrados 10 vezes. Os pHs dos sobrenadantes foram medidos, uma alíquota de cada foi reservada e denominada sobrenadante ácido e, uma segunda alíquota dos sobrenadantes teve seu pH ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1M e foi denominada sobrenadante neutro. O mesmo procedimento foi realizado com o caldo YPD. O pellet contendo as células das leveduras foi suspenso em um volume de caldo YPD 10 vezes menor que o do cultivo inicial e as células foram sonicadas por 10' em ultra-som. Essa fração foi denominada sobrenadante de células sonicadas. Todos os sobrenadantes obtidos foram esterilizados por filtração utilizando-se filtro 0,22 µm.

### 2.3 Teste de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi realizado utilizando-se metodologia descrita por Olivares et al. (2006) com modificações. Cinquenta µL dos cultivos de 48 h de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*, mencionados acima, e dos sobrenadantes obtidos, foram adicionados a cavidades de 7 mm cortadas em placas contendo ágar BHI semeado com aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC/mL de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*. As placas foram incubadas a 28°C por 24 h e os halos de inibição medidos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de difusão em ágar, utilizado para verificar a ocorrência de inibição do crescimento de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* pelas leveduras e seus sobrenadantes, é um método que permite avaliar a presença da produção de substâncias antimicrobianas extracelulares. Foi observado que ambas as bactérias

apresentaram leve inibição do seu crescimento em placa quando incubadas a 28°C com os sobrenadantes ácidos de *Saccharomyces boulardii*, *Pichia pastoris* e do controle e, praticamente não apresentaram inibição quando incubadas com os sobrenadantes neutros das duas leveduras. Além disso, *Salmonella Typhimurium* apresentou inibição ainda menor quando incubada com os cultivos puros e sobrenadantes de células sonicadas de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* e, em geral, a inibição das bactérias por *Pichia pastoris* foi levemente mais forte (dados não mostrados).

Em um estudo realizado por Drago et al. (1997), usando o ensaio de difusão em ágar, nenhuma inibição das cepas enteropatogênicas *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Vibrio cholerae* foi observada para qualquer um dos sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus* testadas. Os autores referem que tal fato não permite confirmar a produção de bacteriocinas ou antibióticos pelas cepas avaliadas, mas sugere que, se tais componentes são produzidos, podem estar muito diluídos no meio de cultura. Tendo isso em vista, todos os sobrenadantes avaliados no presente estudo foram concentrados antes de serem avaliados.

Olivares et al. (2005) também apresentaram dificuldade em detectar halos de inibição quando avaliaram sobrenadantes de cepas de *Lactobacillus* não concentrados contra diversos microrganismos patogênicos. Tal problema foi resolvido, para algumas cepas, quando concentraram os sobrenadantes 10 vezes antes de usá-los. Entretanto, a atividade inibitória desapareceu quando o pH dos sobrenadantes foi ajustado a 7,0. Dessa forma, foi concluído que a produção de ácidos orgânicos parece estar envolvida na atividade antimicrobiana dessas cepas, fato também comprovado por Martín et al. (2005) e ocorrido no presente estudo. Tsai et al. (2005) observaram inibição do crescimento de *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* por cepas de *Lactobacillus*, entretanto, o pH dos sobrenadantes não foi neutralizado.

#### 4. CONCLUSÃO

Concluiu-se, com este estudo, que a comprovada atividade antibacteriana de *Saccharomyces boulardii* e a provável atividade de *Pichia pastoris*, parecem ser uma consequência da atividade de diferentes fatores, dentre estes, a produção de ácidos orgânicos e não da produção de outras substâncias antimicrobianas. Dessa forma, experimentos visando avaliar outros mecanismos de ação dessas leveduras devem ser desenvolvidos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n.1, p.45-66, 2000.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 767-773, 2007.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 733-739, 2002.

DRAGO, L.; GISMONDO, M.R.; LOMBARDI, A.; DE HAËN, C; GOZZINI, L. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. **FEMS Microbiology Letters**, n.153, p.455-463, 1997.

MILETTE, M.; LUQUET, F.M.; LACROIX, M. *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casein*-fermented milk, **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p.314-319, 2007.

OLIVARES, M; DÍAZ-ROPERO, M.P.; MARTIN, R.; RODRÍGUEZ, J.M.; XAUS, J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n.1, p.72-79, 2006.

TSAI, C.C.; HSIH, H.Y.; CHIU, H.H; LAI, Y.Y; LIU, J.H.; YU, B.; TSEN, H.Y. Antagonistic activity against Salmonella infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 185-194, 2005.