

## AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO TÉRMICA DA PEDIOCINA *IN VITRO* E NO ALIMENTO

**MELLO, Michele Brauner<sup>1</sup>; SILVA, Gabrielle Peverada de Freitas<sup>1</sup>; SANT'ANNA, Voltaire<sup>3</sup>; JANTZEN, Márcia Monks<sup>2</sup>; MOTTA, Amanda de Souza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas/RS, Brasil, [amanda.motta@ufpel.edu.br](mailto:amanda.motta@ufpel.edu.br)

<sup>2</sup> Química de Alimentos, FAT, UFPel, Pelotas/RS, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS, Porto Alegre/RS, Brasil

### 1 INTRODUÇÃO

As bacteriocinas são peptídeos com atividade antimicrobiana, secretadas por uma diversidade de microrganismos, e as bactérias lácticas possuem uma grande importância na produção destas substâncias (PARENTE et al., 1999). Além de inibir o crescimento de patógenos nos alimentos fermentados, acredita-se que as bactérias lácticas proporcionem efeitos benéficos à saúde. As bacteriocinas encontram-se como objeto de estudo deste trabalho, devido à importância destes compostos, cuja aplicação em alimentos vem sendo pesquisada, tendo em vista as mudanças do perfil do consumidor, o qual busca hoje alimentos minimamente processados e alimentos com menor adição de conservantes. Esses peptídeos antimicrobianos apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas, dentre elas, importantes patógenos de veiculação alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (NASCIMENTO et al., 2008). Atualmente a nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê do *Codex Alimentarius* da FAO (*Food and Agriculture Organization*) como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e de uso liberado como aditivo alimentar para controle microbiano (ROSA et al., 2002). A pediocina é a segunda bacteriocina mais pesquisada depois da nisina, e possui um potencial antimicrobiano importante frente a linhagens de *Listeria*, o que torna o seu estudo importante considerando o seu potencial de aplicação em alimentos. Dentro deste contexto é importante pesquisar a estabilidade térmica e a permanência destas substâncias ativas nos alimentos, considerando os diferentes processos tecnológicos a que os produtos podem ser submetidos. A inativação térmica da pediocina está sendo investigada de modo a se poder sugerir a sua aplicação em produtos com diferentes propriedades e submetidos a diferentes tratamentos. A bioconservação é de extrema importância, pois tem a finalidade de aumentar a vida útil e a inocuidade dos alimentos por meio do emprego de conservantes naturais como as bacteriocinas. O trabalho teve como objetivo avaliar a inativação térmica da pediocina *in vitro* e no alimento

### 2 METODOLOGIA (MATERIAIS E MÉTODOS)

#### 2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana da pediocina contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Para a avaliação e verificação da atividade antimicrobiana da pediocina foi empregado o Método de Difusão em Ágar com discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002). A bactéria *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada como cultura indicadora. A padronização da suspensão da cultura indicadora foi realizada de

acordo com a Escala de Mc Farland de 0.5. A suspensão foi espalhada sobre a superfície de uma placa com ágar TSB com *swab* estéril. Após a colocação dos discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de (6mm), sobre a superfície da placa, a pediocina 1% foi aplicada sobre os discos, em alíquotas de 20 µl. O título da bacteriocina foi determinado pelo método da diluição seriada. A atividade foi definida como sendo a recíproca da última diluição que apresentou um halo de inibição; e foi expressa em unidades arbitrárias por mililitro (UA/mL) (MAYR-HARTING et al., 1972).

## **2.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para avaliar o efeito da pediocina sobre as células de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ( $10^6$  UFC/ml) foi realizada a técnica de MET. As células tratadas com e sem adição de pediocina 1% foram coletadas por centrifugação. Posteriormente as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio. As células foram desidratadas em acetona (30 a 100%) e foram embebidas em resina Araldite-Durcupan. Foram realizados cortes ultrafinos das amostras (Ultramicrotomo UPC 2.0, Leica) os quais foram contrastados com acetado de uranila 2%. As preparações foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1200ExII (JEOL, Tokyo) a 120 kV (Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS).

## **2.3 Avaliação da estabilidade da pediocina e nisina em diferentes concentrações em temperatura de refrigeração**

Amostras de Nisina e Pediocina foram armazenadas a temperatura de refrigeração (15°C) ao longo de quatro semanas e posteriormente foi realizada a avaliação da estabilidade das mesmas através do Método de Difusão em Ágar com discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002).

## **2.4 Avaliação da estabilidade térmica da pediocina submetida a diferentes temperaturas e em diferentes concentrações**

Foram colocados 1mL de amostras de pediocina em diferentes concentrações (1%, 5% e 10%) em tubos *ependorfs*. As diferentes amostras de pediocina foram submetidas a aquecimento em um termobloco, sob diferentes tempos (0', 30', 60', 90') e temperaturas (90°, 100° e 110°C). Logo após os diferentes tratamentos, as amostras foram submetidas a um banho de gelo e subseqüentemente foi avaliada a manutenção da atividade antimicrobiana através do Método de Difusão em Ágar com discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002).

## **2.5 Avaliação da inativação térmica da pediocina em leite**

Foi adicionada pediocina 1% a diferentes amostras de leite: leite cru bovino e leite UHT (integral, desnatado e semi-desnatado). Uma amostra de cada tratamento foi retirada no tempo 0' e as amostras foram submetidas a uma pasteurização lenta (62-65°C por 30 minutos). Após este processo foram retiradas amostras e realizou-se o teste do Método de Difusão em Ágar com discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002) tendo-se as amostras do tempo 0' e pós-pasteurização para avaliar a estabilidade da pediocina em leite. Estes testes foram realizados em triplicata.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana da pediocina frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7644**

Através dos testes realizados *in vitro* pelo Método Difusão em Ágar com discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002) para verificar a atividade antimicrobiana da pediocina contra *L. monocytogenes*, podemos observar que a bacteriocina pediocina inibiu o crescimento da bactéria indicadora, obtendo-se 6.400 (UA/mL).

#### **3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Algumas bactérias de estirpes sensíveis possuem em sua superfície sítios receptores que são reconhecidos pela bacteriocina (JACK et al., 1995). A partir deste reconhecimento a bacteriocina ganha o interior da célula bacteriana via processos ainda não muito bem esclarecidos (JACK et al., 1995). Na visualização das imagens pode ser observada a estrutura bacteriana do microrganismo *Listeria monocytogenes* antes e após a ação de uma bacteriocina, a qual teve a sua integridade celular afetada após o tratamento.

#### **3.3 Avaliação da estabilidade da pediocina e nisina em diferentes concentrações em temperatura de refrigeração**

A avaliação da estabilidade das bacteriocinas nisina (1% e 5%) e pediocina (1 % e 5%) pode ser constatada ao longo de quatro semanas, sendo as mesmas acondicionadas sob refrigeração (15°C). Pode ser observado que as bacteriocinas com maior concentração mantiveram a estabilidade por um maior tempo. Sendo que no final das quatro semanas se obteve para pediocina 1%, 50 UA/mL e para pediocina 5%, 1600 UA/mL.

#### **3.4 Avaliação da estabilidade térmica da pediocina submetida a diferentes temperaturas e em diferentes concentrações**

A bacteriocina pediocina foi testada em diferentes concentrações (1%, 5% e 10%) em diferentes temperaturas (90°, 100° e 110°C) e em diferentes tempos (0', 30', 60' e 90') para avaliar a sua estabilidade. Através do experimento podemos observar que a pediocina em diferentes concentrações manteve a ação antimicrobiana, porém com o aumento da temperatura e do tempo em que foram submetidas, a atividade foi diminuindo gradativamente.

#### **3.5 Avaliação da inativação térmica da pediocina em leite**

De acordo com o teste realizado utilizando diferentes tipos de leites (leite cru, UHT integral, desnatado e semi-desnatado), podemos observar que após o processo de pasteurização a bacteriocina manteve sua atividade antimicrobiana contra a bactéria *L. monocytogenes*, obtendo-se no tempo 0' 800 UA/mL; e posteriormente a pasteurização este resultado manteve se o mesmo. Isto sugere a aplicação dessas bacteriocinas em alimentos que sofrem algum tipo de processo tecnológico, pois as mesmas não sofrem alterações pós-processo.

#### 4 CONCLUSÕES

De acordo com o trabalho realizado podemos observar que a utilização da bacteriocina pediocina, como auxílio na bioproteção de alimentos pode ser eficaz, pois apresenta potencial de aplicação atuando como cultura bioprotetora, e possui amplo espectro de atividade frente à bactéria *L. monocytogenes*. Apresenta também estabilidade em temperaturas de refrigeração e pasteurização. Deve se levar em conta que essas bacteriocinas não substituem cuidados em cada etapa da cadeia produtiva, boas práticas de fabricação e métodos de conservação tradicional.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de virologia do departamento de Medicina Veterinária, ao Laboratório de Processamento de Alimentos do Departamento de Química de Alimentos, ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa.

#### 6 REFERÊNCIAS

- JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. **Bacteriocins of gram positive bacteria.** *Microbiol. Rev.*, Washington, v.59,n.2, p.171-200, 1995.
- MAYR-HARTING A, HEDJES AJ, BERKELEY CW (1972) **Methods for studying bacteriocins.** In **Methods in Microbiology**, Vol 7. ed. Norris JB, Ribbons D. New York: Academic Press, pp 315-412
- MOTTA, A.S., BRANDELLI, A. **Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*.** *Journal of Applied Microbiology*, Inglaterra, v. 92, p.63-71, 2002.
- NASCIMENTO, M. S.; MORENO, L.; KUAYE, A, YOSHITERU. **Bacteriocinas em alimentos: uma revisão.** *Braz. J. Food Technol.*, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.
- PARENTE, E. AND RICCIARD, A. **Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52., 628-638, 1999.
- ROSA, C. M., FRANCO, B. MORENO. **Bacteriocinas de bactérias lácticas.** *Conscientiae Saúde, Ver. Cient.*, UNINOVE- São Paulo. V.1: 09-15 2002