



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR *Bacillus amyloliquefaciens* P5 E NANOENCAPSULAÇÃO VISANDO À INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE ALIMENTOS

V. S. Ribeiro¹, L. Hickert², L. A. Ries², P. S. Malheiros⁴, K. J. Perez²

1- Acadêmico do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – CEP: 91540-000 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: (51) 3228-1731 – e-mail: (vinicius-ribeiro@uergs.edu.br).

2- Docente da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – e-mail: (lilian.hickert@gmail.com), (luciaries@uergs.edu.br), (karla-perez@uergs.edu.br).

3- Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: (51) 3308-7861 – e-mail: (patricia.malheiros@ufrgs.br).

RESUMO – O objetivo desse trabalho foi extrair os peptídeos produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e determinar sua ação antimicrobiana. Para isso, primeiramente, realizou-se o cultivo em três meios (caldo BHI, caldo Landy e caldo soro de queijo (CSQ)). Com o sobrenadante bruto filtrado (0,22 µm) foi verificada a ação antimicrobiana em relação a micro-organismos contaminantes de alimentos, através da titulação em Unidades Arbitrárias por mL (UA/mL) seguida da técnica de ágar difusão em BHI sólido. Posteriormente, utilizou-se a técnica de extração, das substâncias antimicrobianas no sobrenadante, com isobutanol. Os testes de antagonismo mostraram que *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi sensível a(s) substância(s) estudadas e que bactérias Gram-negativas demonstraram sensibilidade apenas quando adicionou-se EDTA como agente quelante. Portanto, os peptídeos produzidos por *B. amyloliquefaciens* P5 apresentam potencial para inibição de um importante patógeno alimentar, sendo que mais estudos estão sendo realizados para melhorar a ação antimicrobiana dessas substâncias utilizando a nanotecnologia.

ABSTRACT – The objective of this ongoing study is to make contributions related to food safety through the development of new conservation technologies with the use of these antimicrobial substances. *Bacillus amyloliquefaciens* P5 was used for the production of these substances with subsequent partial purification, which will be followed by encapsulation in chitosan nanovesicles. Cultivation was carried out in three media (BHI broth, Landy broth and whey cheese broth (CSQ)). With the filtered crude supernatant (0.22 µm), the antimicrobial action against food contaminating microorganisms was verified, through titration in Arbitrary Units per mL (UA / mL) followed by the diffusion agar technique in solid BHI. Subsequently, the isobutanol extraction technique was used. Antagonism tests showed that only *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 demonstrated sensitivity to the

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



substance (s) studied and that Gram negative bacteria demonstrated sensitivity to the substance (s) by adding EDTA as a chelating agent.

PALAVRAS-CHAVE: peptídeos antimicrobianos; patógenos alimentares; difusão em ágar; extração com isobutanol.

KEYWORDS: antimicrobial peptides; food pathogens; agar diffusion; isobutanol extraction.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação por micro-organismos contaminantes de alimentos representa um problema tanto econômico, para a indústria, como também um problema de saúde pública. Neste contexto, a busca por novas e promissoras substâncias antimicrobianas é de grande importância. Dentre estas novas substâncias, as bacteriocinas têm se mostrado muito eficazes no combate a patógenos, podendo apresentar status GRAS (“*Generally Recognized as Safe*”), sendo seguras para a indústria alimentícia (MOTTA; LORENZINI; BRANDELLI, 2007).

A utilização de peptídeos antimicrobianos tanto para estudo como para aplicação requer a purificação parcial ou completa destas substâncias. Como as substâncias diferem em estrutura e peso molecular é muito difícil adotar um único protocolo de purificação. Geralmente, a purificação das substâncias inicia-se com a centrifugação da cultura, a fim de separar as células do sobrenadante. Este método é eficiente, já que após secretadas, as substâncias se aderem na parede celular ou ficam livres no meio onde são secretadas (LEÃS, 2012).

Diversas técnicas são utilizadas a fim de concentrar as substâncias, sendo a precipitação com sulfato de amônio amplamente utilizada (SIRTORI, 2006). Há técnicas que dependem de menos etapas, como a extração com solventes orgânicos, como a precipitação com butanol (KAWULKA et al., 2004. STEIN, 2008). Esta técnica, apesar de levar a preparações antimicrobianas altamente puras, apresenta o rendimento final baixo. Estes procedimentos funcionam perfeitamente para escalas laboratoriais, no entanto, novas técnicas devem ser estudadas para tornar viável sua utilização em escala semi-industrial.

É notável que o uso de estratégias bacterianas para inibição de patógenos representa um campo promissor na indústria alimentícia e sempre se faz necessário o uso de novas métodos para garantir a estabilidade e o controle da liberação destas substâncias. A nanotecnologia pode ser utilizada para proteger diversos compostos químicos e/ou naturais apresentando um grande potencial para uso através da liberação controlada destas substâncias e aumento de sua estabilidade, permitindo assim um incremento na vida útil dos produtos (UTENG et al., 2002; MALHEIROS et al. 2012). O objetivo desse trabalho foi, em uma primeira etapa, extrair os peptídeos produzidos

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



por *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e determinar sua ação antimicrobiana. Posteriormente, pretende-se nanoencapsular esses peptídeos visando incrementar à inibição das bactérias determinadas na primeira etapa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção da(s) substância(s) antimicrobiana(s)

As colônias de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 foram reativadas em ágar Infusão de Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion - BHI) sólido e coletadas por raspagem e, após, transferidas para frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de caldo BHI. Após, este frasco que caracteriza o pré-inóculo, foi incubado a 37 °C por 24 h, em incubadora com agitação orbital – *shaker* (125 rpm).

Para o inóculo, transferiu-se uma alíquota de 1% (v/v) do pré-inóculo para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo BHI, caldo CSQ (TECH, 2019) e caldo Landy (PEREZ, 2014). A cultura foi incubada por 24 h em incubadora com agitação (125 rpm) a 42 °C. Após este período, a cultura foi centrifugada durante 15 min. a 10.000 g 4 °C e o sobrenadante foi esterilizado por filtração através de filtros de celulose com porosidade de 0,22 µm acoplados a seringas. Os filtrados foram conservados em geladeira a 4 °C até utilização, por um período máximo de 7 dias. Este processo constitui a primeira etapa de purificação, obtendo-se assim a substância parcialmente purificada (sobrenadante bruto e filtrado) (PEREZ et al., 2017).

2.2 Titulação antimicrobiana do sobrenadante bruto

Utilizou-se o método da diluição seriada para determinar o número de unidades arbitrárias por mL (UA/mL) no sobrenadante bruto, ou seja, a atividade antimicrobiana contra determinado micro-organismo. Para isto, após a obtenção do sobrenadante bruto filtrado os mesmos foram diluídos sucessivamente em placas de microtitulação a partir da proporção 1:1 (v/v) em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%). Procedeu-se então com o teste de ágar-difusão onde alíquotas de 20 µL dessas diluições foram inoculadas diretamente na forma de um “spot” na superfície de placas contendo ágar BHI com uma suspensão de 10⁸ células/mL (padronizadas em espectrofotômetro no intervalo de 0,08 a 0,15 nm) em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) dos micro-organismos indicadores espalhadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e o título designado como UA/mL foi definido como sendo a recíproca da última diluição que apresentou halo de inibição (KIMURA et al., 1998).

Em seguida, a atividade antibacteriana foi calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA/mL) empregando-se a equação: “UA = título X 1000 µL X v-1 (µL)” sendo o “v” o volume do extrato utilizado no ensaio (BATDORJ et al., 2006), de 20 µL. Os ensaios contra as bactérias Gram-negativas foram realizados adicionando-se 10 µL de EDTA 5M aos poços da placa de diluição, misturando-se com o sobrenadante bruto filtrado. Todos os testes foram realizados em duplicata.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



2.3 Extração com iso-butanol do sobrenadante da cultura

A bactéria produtora *Bacillus amyloliquefaciens* P5 foi incubada por 24 h a 37 °C em caldo BHI (pré-inóculo). Então, preparou-se os inóculo a 1% em caldo BHI, CSQ e Landy e estes foram incubados a 37 °C por 24 h a 125 rpm (PEREZ et al., 2017). Após, centrifugou-se o caldo de cultura com o crescimento bacteriano a 10.000 g, por 10-15 min. a 4 °C. Em seguida, filtrou-se os sobrenadantes em um sistema de filtragem a vácuo com membranas de celulose (0,22 µm) e adicionou-se ¼ do volume de isobutanol, deixando-se em agitação por 1 h (agitador magnético em capela de exaustão química). Transferiu-se, então, as misturas para funis de separação e as mesmas foram deixadas em temperatura ambiente “overnight”. Posteriormente, a fase orgânica (superior) foi transferida para placas de Petri e deixadas a temperatura de 37 °C *overnight*. Os resíduos foram suspensos adicionando-se 10 mL de metanol. Em seguida, a fim de verificar se houve um aumento na atividade antimicrobiana, realizou-se um novo teste de antagonismo, como descrito no item 2.2. As suspensões que não foram utilizadas foram armazenadas em um freezer a -22 °C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antimicrobiana

As bactérias avaliadas para determinar o espectro de ação antimicrobiana foram: Gram positivos – *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* ATCC 14579, *L. monocytogenes* ATCC 7644. Gram-negativos: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29121, *Salmonella typhimurium*. Os resultados dos testes de antagonismo mostraram que apenas *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 demonstrou sensibilidade a(s) substância(s) estudadas, como mostra a Figura 1. Podemos observar que, dos meios testados, o caldo BHI foi o que demonstrou melhores resultados (400 UA/mL), seguido do CSQ (100 UA/mL) e caldo Landy que não apresentou nenhum resultado satisfatório.

Os testes de antagonismo utilizando EDTA como agente quelante contra bactérias Gram-negativas apresentaram resultados satisfatórios contra os micro-organismos testados, com os seguintes resultados: Caldo BHI - *P. aeruginosa* ATCC 27853 (3200 UA/mL), *S. typhimurium* (3200 UA/mL) e *E. faecalis* ATCC 29121 (800 UA/mL). CSQ - *P. aeruginosa* ATCC 27853 (800 UA/mL), *S. typhimurium* (1600 UA/mL) e *E. faecalis* ATCC 29121 (3200 UA/mL). No entanto, é incerto afirmar se esta sensibilidade apresentada é devida a ação da substância ou a concentração do EDTA (5M). Será necessário realizar mais testes com concentrações menores de EDTA para se obter resultados mais consistentes.

3.2 Extração com isobutanol

A extração com isobutanol apresentou resultados satisfatórios apresentando a formação de um precipitado na fase superior para os 3 meios testados. No entanto, nem todo o precipitado é formado por bacteriocinas já que existem outras substâncias no sobrenadante. A extração com isobutanol se mostrou uma técnica eficiente e uma

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



boa estratégia para concentração da(s) substância(s). Nos testes de antagonismo realizados com a substâncias semi-purificada foi observado um aumento significativo se comparada a substância bruta filtrada. Novamente, apenas *L. monocytogenes* apresentou sensibilidade (3200 UA/mL), o aumento da concentração foi apenas observado para o caldo BHI, e para o CSQ (100 UA/mL) não foi observada diferença significativa, como mostra a Figura 1.

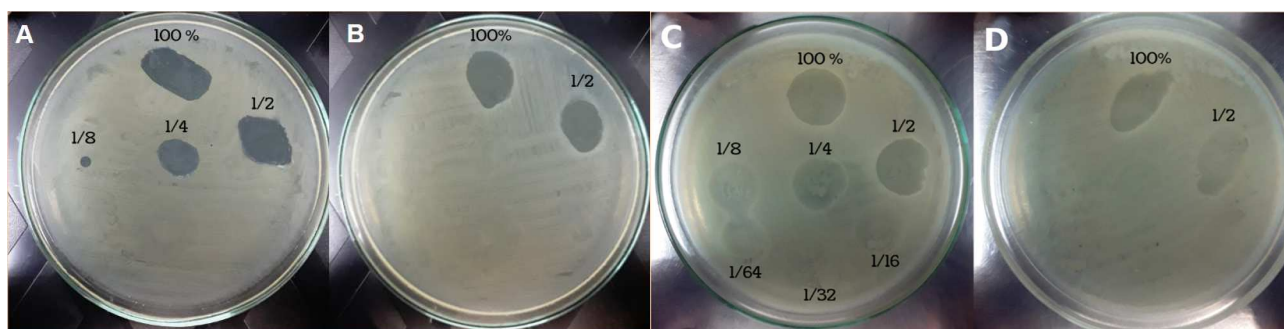


Figura 1 – Resultados das atividades antimicrobianas de *B. amyloliquefaciens* P5 inoculadas diretamente sobre ágar BHI contendo *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Em (A) atividades provenientes do sobrenadante bruto de caldo BHI (400 UA/mL). Em (B) de Caldo Soro de Queijo – CSQ (200 UA/mL). Em (C) atividades antimicrobianas da substância semi-purificada (caldo BHI – 3200 UA/mL) de *B. amyloliquefaciens* P5 inoculadas em ágar BHI contendo *L. monocytogenes* ATCC 7644 e em (D) proveniente da substância semi-purificada de CSQ (100 UA/mL).

Fonte: Autores, 2020.

4 CONCLUSÕES

Os resultados dos testes de antagonismo mostraram que apenas *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 demonstrou sensibilidade a(s) substância(s) estudadas. Podemos concluir que, dos meios testados, o caldo BHI foi o que demonstrou melhores resultados, seguido do CSQ e caldo Landy que não apresentou nenhum resultado satisfatório. Os micro-organismos Gram-negativos testados apresentaram sensibilidade, no entanto, é incerto afirmar que se a sensibilidade é devido a substância ou ao EDTA, mais testes devem ser realizados. Podemos afirmar também que a estratégia de purificação da substância antimicrobiana escolhida foi um sucesso com o caldo BHI, já que o espectro de ação foi maior (3200 UA/mL) comparado aos testes com o sobrenadante bruto filtrado (400 UA/mL). Não foi observada diferença entre os testes com o sobrenadante bruto filtrado e a substância semi-purificada nos tratamentos com CSQ. Pretende-se ainda realizar testes para detecção da atividade antifúngica para fim de verificar o espectro de ação da(s) substância(s). Em suma, espera-se seguir para o encapsulamento da substância semi-purificada em nanovesículas e, no futuro, realizar sua aplicação direta em diferentes matrizes alimentares.



5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATDORJ, B. DALGALARRONDO, M; CHOISET, Y; PEDROCHE, J; MÉTRO, F; PRÉVOST, H; CHOBERT, J. M; HAERTLE, T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 837-48, 2006.

KAWULKA, K.E; SPRULES, T; DIAPER, C. M; WHITTAL, R. M; MCKAY, R. T; MERCIER, P; ZUBER, P; VEDERAS, J. C. Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. **Biochemistry**, 43, n. 12, p. 3385-3395, 2004.

KIMURA, H; SASHIHARA, T; MATSUSAKI, H; SONOMOTO, K; ISHIZAKI, A. Novel bacteriocina of *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. **Annals of New York Academy of Science**, v. 864, p. 345-348, 1998.

LEÃES, Fernanda Leal. Produção de peptídeos antimicrobianos produzidos por *Bacillus* sp. P 11. **Tese (Doutorado)** - UFRGS, Porto Alegre, p. 10-25, 2012.

MALHEIROS, P.S; SANT'ANNA, V; MICHELETTO, Y. M. S; SILVEIRA, N. P; BRANDELLI, A. Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Nanoparticle Research**, v.13, p.3545 - 3552, 2011.

MOTTA, A. S; LORENZINI, D. M; BRANDELLI, A. Purification and Partial Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Novel *Bacillus* sp. Isolated from the Amazon Basin., Vol. 54, p. 282-286, 2007.

PEREZ, K. J; VIANA, J. S; LOPES, F. C; PEREIRA, J. Q; SANTOS, D. M; OLIVEIRA, J. S; VELHO, R. V. *Bacillus spp.* Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. **Frontiers in Microbiology**. v. 8. n. 61, 2017.

PEREZ, K. J. Caracterização de lipopeptídeos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *Bacillus spp.* isolados de puba. **Tese (Doutorado)** – UFMG, Belo Horizonte, p. 76-77, 83-86, 93-95, 2014.

SIRTORI, L. R; CLADERA-OLIVEIRA, F; LORENZINI, D; TSAI, S. M; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, p. 357–363. 2006.

STEIN, T. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1146-1152, 2008.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



TECH, Bárbara Iegli. **Avaliação da produção de biossurfactantes por *Bacillus megaterium* e *B. amyloliquefaciens* P5 a partir do soro de queijo.** 2019. Monografia (Graduação) - Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - UERGS, Novo Hamburgo, 2020.

UTANG, M; HAUGE, H. H; BRONDZ, L; NISSEN-MEYER, J; FIMLAND, G. Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture Medium. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 68, No. 2 , p. 952–956, 2002.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br