



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Marina Ludmila Oliveira Conôr Salles

**Potencial de produção de antimicrobianos a partir de bactérias
isoladas do açai (*Euterpe oleracea*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Agenor Valadares Santos

BELÉM

2015

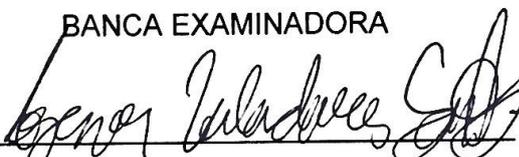
Marina Ludmila Oliveira Conôr Salles

**Potencial de produção de antimicrobianos a partir de bactérias isoladas
do açaí (*Euterpe oleracea*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM: 17/08/2015

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Agenor Valadares Santos

(PPGBIOTEC/ICB/UFPA – Orientador)



Prof. Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho

Faculdade de Biotecnologia/ICB/UFPA



Prof. Dr. Chubert Bernardo C. de Sena

PPGBIOTEC/ICB/UFPA



Prof. Dr. Jesus N. Silva de Souza

PPGCTA/ITEC/UFPA

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Salles, Marina Ludmila Oliveira Conôr, 1993-
Potencial de produção de antimicrobianos a partir de
bactérias isoladas do açaí (*Euterpe oleracea*) / Marina
Ludmila Oliveira Conôr Salles. - 2015.

Orientador: Agenor Valadares Santos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências
Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Alimentos- Biotecnologia. 2. Açaí. 3.
Bactérias. 4. Microorganismos. I. Título.

CDD 23. ed. 664

Agências financiadoras

Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa – FAPESPA

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Laboratórios e Centros de pesquisa onde o trabalho foi realizado

Centro de Valorização Agroalimentar dos Compostos Bioativos da Amazônia - UFPA

Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UFPA

Laboratório de Catálise e Oleoquímica - UFPA

Laboratório de Microbiologia Aplicada – UFMG

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos – UFMG

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente a Deus, por continuar acreditando e dando forças a esta sonhadora.

Quero agradecer aos meus pais, Regina e Glailson, que acreditam na carreira que escolhi para mim e financiam meus sonhos, por mais malucos que eles sejam.

Ao meu namorado Eduardo, que reapareceu num momento inesperado para me tornar a pessoa mais forte e perseverante que posso ser.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG, Chicão, Natália, Ubiana, Swiany, Aline, Andrea, Ana e Marcus, que me fizeram perseverar num momento extremamente difícil dessa jornada.

Um agradecimento especial ao meu amigo João Antônio, que me acolheu em Belo Horizonte e me deu muita força para que eu não perdesse meu foco.

À professora Regina Nardi e à professora Vera Lúcia, da UFMG, por terem me recebido em seu laboratório e dado o suporte que precisava para acreditar na carreira de pesquisadora.

Ao meu orientador Agenor Valadares, que aceitou a difícil tarefa de me orientar, teve paciência com minhas dificuldades, problemas de saúde e longas ligações a distância para discutir metodologias e resultados.

À Lívia, ao Raoni e ao Leandro, meus ex-parceiros de laboratório, que me deram motivos para permanecer na área de Biotecnologia no início do mestrado.

À professora Consuelo e à Sueli, por terem cedido seu tempo e espaço para a realização deste trabalho.

Ao professor Hervé Rogez e ao CVACBA, por terem me acolhido e me dado suporte durante o período da minha pesquisa.

Aos demais chefes, técnicos e alunos dos laboratórios que cederam seu espaço, tempo e sabedoria ao me ajudar.

Às agências financiadoras FAPESPA, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Marina Ludmila Oliveira Conon Salles

SUMÁRIO	
1 – INTRODUÇÃO	11
1.1 – AÇAÍ	11
1.2 - CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	12
1.3 – BACTERIOCINAS	14
1.3.1- Bactérias produtoras de bacteriocinas	15
1.3.2- Classificação	16
1.3.3- Modo de ação	17
1.3.4- Aplicação biotecnológica de bacteriocinas	19
2 – OBJETIVOS	21
2.1 – OBJETIVOS GERAIS	21
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 – AMOSTRAGEM	22
3.2 – SELEÇÃO, ASSEPSIA E ISOLAMENTO	22
3.3 – ANTAGONISMO IN VITRO	23
3.3.1 – Teste de <i>spot-on-the-lawn</i>	23
3.3.2 – Teste de difusão em poço	23
3.4 – CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS	24
3.4.1 – Estabilidade térmica	24
3.4.2 – Sensibilidade a enzima proteolítica	25
3.4.3 – Efeito do pH	25
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 – ISOLAMENTO	26
4.2 – ANTAGONISMO IN VITRO	26
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS EXTRATOS	30
5 – CONCLUSÃO	35
6 – PERSPECTIVAS	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	42

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Classificação de bacteriocinas	16
Figura 1 -	Modelos de formação de poros em membrana citoplasmática de células sensíveis: <i>Wedge (A)</i> e <i>Barrel stave (B)</i>	18
Figura 2 -	Estrutura química da nisina	19
Figura 3 -	Resultados do teste de <i>spot-on-the-lawn</i>	26
Tabela 1 -	Resultados do teste de <i>spot-on-the-lawn</i> para cada bactéria reveladora	27
Figura 4 -	Resultados do teste de difusão em poço	28
Tabela 2 -	Resultados do teste de difusão em poço	29
Figura 5 -	Caracterização dos extratos de cada bactéria produtora	30
Figura 6 -	Caracterização de atividade sob ação da enzima tripsina por 18 horas.	31
Tabela 3 -	Resultados da caracterização de extratos	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

PFNM	- Produtos Florestais Não Madeireiros
FAO	- Organizao de Alimentos e Agricultura
MRS	- Man, Rogosa e Sharpe
BHI	- Brain Heart Infusion
UV	- Ultra violeta

RESUMO

O açaí é o fruto de uma palmeira amplamente distribuída na região amazônica e possui uma alta carga microbiana que favorece o processo de fermentação do fruto. Desconhecem-se estudos específicos que investiguem a produção de substâncias antimicrobianas de interesse biotecnológico a partir de micro-organismos presentes no fruto açaí, o que pode resultar no aumento do valor agregado ao fruto. Desde que a segurança alimentar se tornou cada vez mais uma preocupação internacional, a aplicação de bacteriocinas, que visam patógenos alimentares sem efeitos adversos tóxicos, tem recebido grande atenção. O objetivo deste trabalho é isolar as bactérias do açaí, identificar a atividade antimicrobiana das bactérias isoladas, e caracterizar os extratos destas bactérias quanto à estabilidade e ao espectro de ação. Os frutos selecionados foram coletados na Ilha do Combú e em Abaetetuba, no estado do Pará, Brasil. Estes seguiram para assepsia e despulpamento, e as diluições foram inoculadas em ágar MRS e isoladas para análise. O antagonismo *in vitro* foi realizado com as técnicas de *spot-on-the lawn* e de difusão em poços contra três bactérias reveladoras: *Corinebacterium sp*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. Estes extratos foram caracterizados de acordo com estabilidade térmica (121°C/15 minutos), sensibilidade à enzima tripsina e neutralização do pH. Das trinta e nove bactérias isoladas, foi possível observar atividade antagonista em dezenove delas. Destas, foi possível observar que doze apresentaram atividade antagonista extracelular. Quatro extratos apresentaram sensibilidade à tripsina, indicando que estas podem ser bacteriocinas. Os extratos neutralizados não apresentaram nenhuma atividade, o que indica uma melhor atividade dos extratos em pH ácido. A maioria dos extratos apresentou atividade depois de autoclavagem, o que pode ser um indicativo de que os extratos possuem bacteriocinas que pertencem às classes I e II. Este trabalho mostra que bactérias isoladas de açaí possuem potencial para a produção de substâncias antimicrobianas.

Palavras chave: Açaí; *Euterpe oleracea*; Antimicrobianos; Bacteriocinas; Microorganismos; bactérias.

ABSTRACT

Açaí is the fruit of a palm tree widely distributed in the Amazon region and has a high microbial load that favors the fruit fermentation process. It is unknown specific studies to investigate the production of antimicrobial substances of biotechnological interest from microorganisms present in acai fruit, which can result in increased value to the fruit. Since food safety has become an increasingly international concern the application of bacteriocins that target food pathogens without adverse toxic effects, have received great attention. The objective of this work is to isolate bacteria from acai, identify the antimicrobial activity of the isolated bacteria, and characterize the extracts of these bacteria as pH, temperature, stability and action spectrum. The selected fruits were collected in Combu Island and Abaetetuba, State of Para, Brazil. These followed for asepsis and pulp removal and dilutions were inoculated in MRS agar and isolated for analysis. The antagonism in vitro was performed with the technique of spot-on-the lawn revealing against three bacteria: *Corynebacterium* sp, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*; and with the well diffusion technique. These extracts were characterized for thermal stability (121 ° C / 15 minutes), enzyme sensitivity to trypsin and pH neutralization. Of the thirty-nine bacterial isolates, it was observed antagonistic activity in nineteen of them. Of these could be observed twelve showed extracellular antagonist activity. Four extracts showed sensitivity to trypsin, indicating that these may be bacteriocins. Neutralized extracts showed no activity, which indicates better activity at pH acid extracts. Most of the extracts showed activity after being autoclaved, which may be an indication that the extracts have bacteriocins in Classes I and II. This work shows that bacteria isolated from acai have potential for the production of antimicrobial substances.

Key words: Açaí, *Euterpe oleracea*, Antimicrobials, Bacteriocins, microorganisms, bacteria.

1- INTRODUÇÃO

1.1- AÇAÍ

O açaizeiro (*Euterpe oleracea Mart.*) é uma das palmeiras típicas da Amazônia, estando distribuída, no Brasil, principalmente nos estados do Pará, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins. Sua maior ocorrência é no estuário de rios; em terrenos de várzea; de igapó e, com menor ocorrência, em terra firme. Produz frutos o ano todo, tendo seu período de maior produção entre os meses de julho e dezembro (CAVALCANTE, 2010; HOMMA et al, 2006).

Por ser espécie nativa da Amazônia, o açaizeiro pode ser plantado em tipos climáticos que ocorrem na região, caracterizados por serem quentes e úmidos; com pequenas amplitudes térmicas - geralmente com temperaturas médias e médias das mínimas e das máximas anuais em torno de 26 °C, 22 °C e 31,5 °C, respectivamente - e com umidade relativa do ar variando entre 71% e 91% (OLIVEIRA et al, 2002).

O fruto é arredondado, medindo de 1 a 1,5 cm de diâmetro e possui um mesocarpo com cerca de 1mm de espessura, representando de 5 a 15% do volume total do fruto. O fruto apresenta uma cor arroxeada quando maduro e tem um peso médio entre 0,8 a 2,3 gramas (CAVALCANTE, 2010).

O açaí possui elevado teor de antocianinas, contendo cerca de 1,02 g/100 g de extrato seco, sendo, portanto, classificado como uma superfruta (ROGEZ et al, 2011).

De acordo com o IMAZON (2011), no período de safra, dentre os produtos florestais não-madeireiros (PFNM) comercializados no estado do Pará, o fruto do açaí foi responsável por 97% de um faturamento de 37,7 milhões de reais (R\$36,6 milhões). Os 3% restantes se distribuíram por vários PFNM, a maioria deles na entressafra do açaí, com destaque para: a pupunha (fruto), o cupuaçu (fruto), a castanha-do-brasil (amêndoa com casca), o taperebá (fruto) e a andiroba (óleo).

O açaí possui algumas características inerentes a frutas tropicais, como a atividade respiratória de alto consumo de oxigênio e dissipação de gás carbônico; pH médio de 5,2 e conteúdo de água. Estas características, associadas ao clima quente e úmido da região Amazônica, favorecem a ação microbiana no processo

de fermentação do fruto, levando à degradação de nutrientes (AGUIAR et al, 2013; ALEXANDRE et al, 2004).

Como os frutos são bastante perecíveis, a bebida obtida fermenta com facilidade. Esta condição também é favorecida pela temperatura elevada prevaemente nas áreas de produção e de comercialização. Além disso, na colheita, o fruto de açaí sofre um ruptura no seu ápice, permitindo a entrada de micro-organismos e oxigênio, facilitando assim a contaminação e fermentação (ROGEZ et al, 2012; OLIVEIRA et al, 2002).

Muitos dos estudos com o açaí estão relacionados principalmente a sua relevância nutricional, seus benefícios à saúde, além de sua qualidade sanitária e de novas formas de processamento (CHEN, 2014).

Poucos trabalhos descrevem características ligadas à microbiota do açaí. No trabalho de Chen (2014), foi determinado que algumas bactérias da microbiota do açaí produzem enzimas de interesse comercial, destacando-se a β -glucosidade. No trabalho de Moura et al (no prelo), foi avaliada a diversidade microbiana no processo de fermentação espontânea do açaí, onde foram identificados, ao nível do gênero, *Massilia* (taxon com mais de 50% das sequências restantes constante durante as 30h de fermentação), *Pantoea* (taxon com o maior aumento durante a fermentação), *Naxibacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Raoultella*, formando a microbiota bacteriana dos frutos de açaí. No trabalho de Aguiar et al (2013), foi observado que a fermentação espontânea do açaí (alcoólica, láctica e acética) está diretamente ligada a um crescimento microbiano exponencial de bactérias.

No entanto, não existem estudos específicos que investiguem a produção de substâncias antimicrobianas de interesse biotecnológico a partir de micro-organismos presentes no fruto açaí.

1.2- CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Uma das preocupações da indústria de alimentos é a contaminação por patógenos, que são causa frequente de doenças de origem alimentar. Durante a última década, os surtos de diarreia, em combinação com a resistência natural

dos agentes causadores, contribuíram para seu status de risco (PARADA et al, 2007).

Dentre essas bactérias, é possível observar algumas que possuem grande destaque, devido a suas relações com surtos e doenças. Há muitas razões para os problemas causados por *Bacillus cereus* na indústria alimentar. Trata-se de um micro-organismo onipresente no ambiente, que pode facilmente contaminar qualquer um dos sistemas de produção ou processamento de alimentos, através da formação de esporos que podem sobreviver à pasteurização e ao aquecimento. Os esporos também são bastante resistentes à irradiação de raios gama, que é utilizada para reduzir agentes patogênicos de alimentos. Os esporos são hidrofóbicos e têm a capacidade de se aderir a superfícies, causando problemas especialmente em fábricas de laticínios (KOTIRANTA et al, 2000).

As bactérias do gênero *Corynebacterium* estão associadas à transmissão de diversos tipos de doenças. Uma das principais doenças causadas por este gênero é a difteria, uma doença de distribuição mundial, que ocorre principalmente em áreas urbanas pobres, onde o nível de vacinação e atendimento são precários. A difteria é mais frequente em crianças com idade inferior a dez anos. É endêmica no Brasil, mas há registros de surtos em outras regiões. Sua ação lesiva está atribuída diretamente a uma exotoxina secretada pelas bactérias, como uma cadeia polipeptídica única (MURRAY et al, 2015).

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria móvel, resistente ao congelamento e outras condições adversas, que sobrevive por longos períodos em indústrias processadoras de alimentos e áreas de manipulação de alimentos e está amplamente distribuída na natureza. Ela causa uma infecção chamada listeriose, que tem alto índice de mortalidade. A maior incidência de *Listeria* está associada aos surtos de doenças transmitidas por alimentos (MURRAY et al, 2015; FARBER & PETERKIN, 1991).

As tecnologias dos processos de transformação e conservação de produtos alimentares - que ajudam na manutenção dos seus valores nutricionais, além de garantir as questões de segurança alimentar - são as áreas de pesquisa de alimentos atuais. Muitos produtos químicos estão sendo utilizados para a

inativação de patógenos alimentares, de modo a aumentar a sua vida de prateleira (UDHAYASHREE et al, 2012).

O consumo de alimentos que foram formulados com conservantes químicos também aumentou a preocupação do consumidor e criou uma demanda por alimentos mais naturais e minimamente processados. Como resultado, tem havido um grande interesse em agentes antimicrobianos produzidos naturalmente (CLEVELAND et al, 2001). A biotecnologia no setor agroalimentar tem como alvo a seleção, a produção e a melhoria de micro-organismos úteis e seus produtos, bem como a sua aplicação técnica na qualidade dos alimentos (PARADA et al, 2007).

Efeitos antagonistas produzidos por bactérias lácticas em relação a outros organismos podem desempenhar um papel importante na manutenção de um bom equilíbrio microbiano no trato intestinal, preservando certos alimentos (UDHAYASHREE et al, 2012).

1.3- BACTERIOCINAS

Desde que a segurança alimentar se tornou cada vez mais uma preocupação internacional, a aplicação de peptídeos antimicrobianos de bactérias, que visam patógenos alimentares sem efeitos adversos tóxicos, tem recebido grande atenção (CLEVELAND et al, 2001).

As bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas com atividade antibacteriana, encontradas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que se caracterizam por apresentarem um espectro de ação restrito aos micro-organismos Gram positivos (MORENO et al, 2008, RILEY & WERTZ, 2002).

As bacteriocinas possuem algumas propriedades específicas: podem apresentar efeito bactericida ou bacteriostático, dependendo da concentração; apresentam pequeno ou amplo espectro de atuação; têm sua produção mediada por plasmídeo ou cromossomo; reagem com sítios específicos ou inespecíficos de ligação na bactéria sensível, dependendo da classe da bacteriocina, e apresentam modo de ação similar, desestabilizando a força protônica da

membrana da célula sensível (BRUNO E MONTVILLE, 1993; EIJSINK et al, 1996).

As bacteriocinas apresentam atividade contra alguns importantes patógenos de veiculação alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (HERNÁNDEZ et al., 2008).

É válido ressaltar que as bacteriocinas são diferentes dos antibióticos. Antibióticos são metabólitos secundários sintetizados por enzimas que apresentam aplicação clínica. As bacteriocinas são proteínas ribossomicamente sintetizadas, produzidas na fase *lag* de crescimento microbiano, que não apresentam, até o momento, aplicação clínica e não alteram a microbiota do trato digestivo, pois são degradadas por enzimas como tripsina e pepsina encontradas no trato digestivo. Se as bacteriocinas forem consideradas antibióticos, não poderão ser usadas em alimentos, já que o uso de antibióticos em alimentos é ilegal (BRUNO E MONTVILLE, 1993).

As bacteriocinas têm muitas propriedades que sugerem que elas são alternativas viáveis para uso de antibióticos. Estas incluem a sua potência, a sua baixa toxicidade, a disponibilidade de peptídeos de amplo e baixo espectro, a possibilidade de produção *in situ* por probióticos e o fato de que estes peptídeos podem ser bioengenheirados (COTTER et al, 2005).

1.3.1- Bactérias produtoras de bacteriocinas

O modelo para estudo das bacteriocinas foi proposto por André Gratia em 1925, quando a bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli*, sintetizou as então conhecidas colicinas (EVANGELISTA-BARRETO et al, 2004).

A partir de então, diversas bactérias foram detectadas como produtoras de bacteriocinas. As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são abundantes e diversas e podem ser representadas principalmente pela nisina, sintetizada pela bactéria *Lactococcus lactis* (JACK et al, 1995).

As bactérias lácticas representam uma grande parcela das bactérias produtoras de bacteriocinas. Estas bactérias podem interferir na existência e multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de alguns

mecanismos, como: competição por oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de bacteriocinas. A produção dessas tem sido verificada em bactérias láticas aliadas a alimentos, incluindo representantes dos gêneros *Lactococcus spp.*; *Lactobacillus spp.* e *Pediococcus spp.* (ROSA et al, 2002).

1.3.2 – Classificação

A maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias láticas é caracterizada por definição inicial de um inibidor proteico, estimativa da massa molecular (por meio de retenção em membranas de diálise, ultrafiltração ou espectrometria de massa) e determinação de estirpes susceptíveis (KLAENHAMMER, 1993).

Quadro 1 – Nova proposta de classificação de bacteriocinas

Classificação	Características importantes	Grupos/Subclasses	Exemplos
Classe I	Pequenos péptidos, estáveis ao calor (<5 kDa), contendo aminoácidos modificados (lantionina, a 3-metil-lantionina, aminoácidos desidratados, S-aminovinyl-cisteína, entre outros)	Tipo A (linear) Tipo B (globular) Tipo C (dois componentes) Tipo D (atividade antimicrobiana reduzida)	Nisina Epidermina Mersacidina Lacticina 3147 Sap T
Classe II	Pequenos péptidos, estáveis ao calor (<10 kDa), não contendo aminoácidos modificados	IIa (linear, semelhante a pediocina) IIb (linear, dois componentes) IIc (peptídeo cíclico) II d (linear)	Pediocina PA-1 Lactacin F Enterocina AS-48 Aureocin A53 Aureocin A70
Classe III	Proteínas grandes sensíveis ao calor	Tipo IIIa (Bacteriolisinas) Tipo IIIb (Não lítica)	Lisostafina Helveticina J

Fonte: Bastos et al (2010)

Desenvolvimentos recentes na caracterização bioquímica e genética de muitos destes compostos, que têm elucidado as suas estruturas e mecanismos de ação prováveis, definem 3 classes distintas, sendo a classe I a dos lantibióticos contendo lantionina; a classe II a das bacteriocinas que não contêm lantionina e uma denominação separada para a classe III: as bacteriolisinas, hidrolases que atuam no peptidoglicano mureína (Quadro 1).

A classe I é subdividida em quatro grupos. Os tipo A são os lantibióticos lineares; os tipo B são os lantibióticos globulares; os tipo C são de dois componentes (dois peptídeos na mesma estrutura) e os do tipo D são lantibióticos com atividade antimicrobiana reduzida (BASTOS et al, 2010).

A classe II é dividida em 4 subclasses. A subclasse IIa seria a de peptídeos ativos contra *Listeria monocytogenes*. A subclasse IIb seria a das bacteriocinas de dois componentes. A classe IIc seria a dos peptídeos cíclicos. A classe IId foi proposta para ser um repositório de todas as bacteriocinas restantes não contendo lantionina.

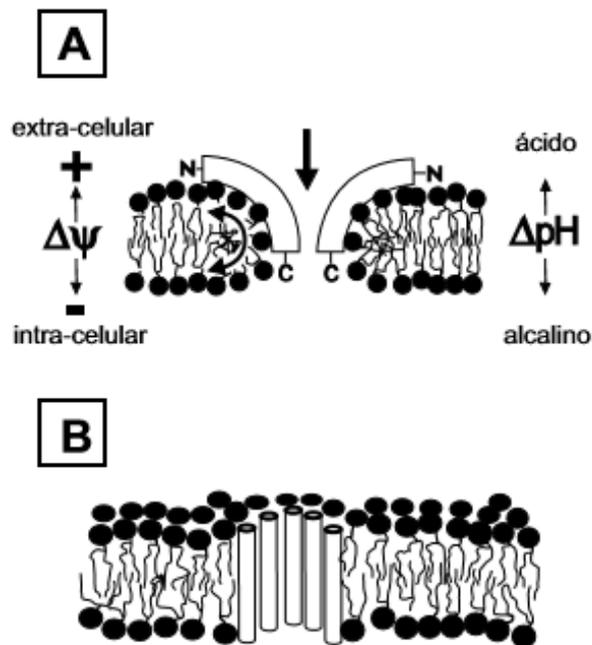
A classe III é dividida em dois grupos. O Tipo IIIa são as bacteriolisinas, de ação enzimática. O tipo IIIb são bacteriocinas de ação não-lítica (HENG et al, 2007).

1.3.3 – Modo de ação

Dois mecanismos alternativos foram propostos para descrever detalhadamente a forma de inserção da bacteriocina na membrana da célula-alvo (Figura 1). No modelo *Barrel stave*, a bacteriocina se liga como monômero na membrana citoplasmática, insere-se na bicamada lipídica, e os monômeros inseridos agregam-se lateralmente para formar o poro (MARTIN et al, 1996). No modelo *Wedge*, a formação de poro é causada por uma atuação local da bicamada lipídica, que ocorre quando há ligação das moléculas de bacteriocina: esta é puxada para dentro da membrana pela força protônica, e sua orientação em relação aos lipídios de cabeça não se altera, pois o peptídeo não entra em contato com a parte hidrofóbica da membrana (BRUNO e MONTVILLE, 1993).

Podem ser responsáveis pela resistência de mutantes naturais, as bacteriocinas, variações ocorridas na membrana e na parede celular, como: mudança do potencial elétrico; da fluidez; da constituição lipídica da membrana e alteração da carga ou espessura da parede celular. Estas disposições de maneiras diferentes podem surgir após exposição da célula a concentrações reduzidas de bacteriocinas ou como parte de uma resposta adaptativa a algum outro estresse (RODRIGUES, 2010).

Figura 1 – Modelos de formação de poros em membrana citoplasmática de células sensíveis: *Wedge* (A) e *Barrel stave* (B)



Fonte: Moll et al, 1999.

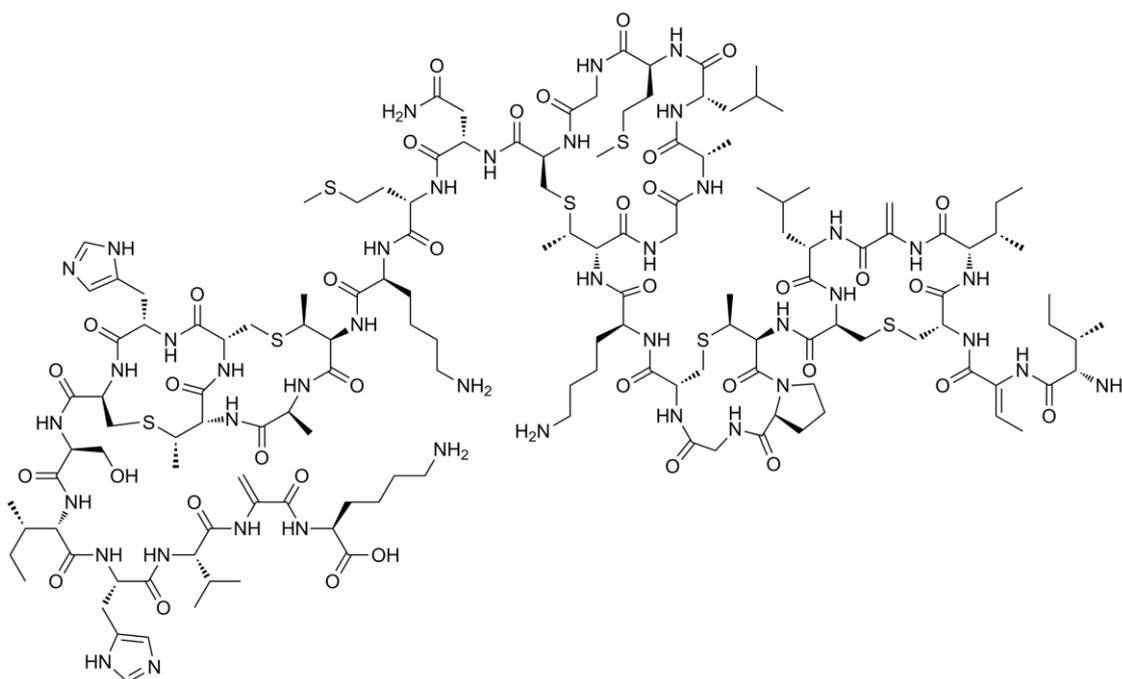
O alvo de atividade destes peptídeos é a membrana citoplasmática. Devido à barreira protetora fornecida pelos fosfolipídios, proteínas e polissacarídeos da membrana externa de bactérias Gram-negativas, essa barreira de permeabilidade celular impede que a bacteriocina atinja a membrana. Contudo, a presença de agentes quelantes, pressão hidrostática ou injúria celular podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina, que na maioria das vezes apenas é ativa contra bactérias Gram-positivas (EVANGELISTA-BARRETO et al, 2004).

1.3.4 – Aplicações biotecnológicas das bacteriocinas

O desenvolvimento e a otimização de compostos inibidores de crescimento, a partir de bactérias lácticas como bioconservadores para controlar bactérias indesejáveis, têm sido o foco de vários laboratórios envolvidos em pesquisas relacionadas à segurança e à qualidade dos alimentos. Mesmo assim, a maioria das bacteriocinas ainda não foram aplicadas com êxito aos alimentos (MARTINIS et al, 2002).

A Organização de Alimentos e Agricultura (*Food and Agriculture Organization* - EUA) e a Organização Mundial da Saúde aprovaram a nisina (Figura 2) como aditivo alimentar em 1969, com uma ingestão diária permitida máxima de 33.000 IU/kg de peso corporal. Este bacteriocina é ativa contra importantes organismos relacionados alimentares, tais como *Clostridium sp.*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Listeria sp.* Vários países permitem o uso da nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais em conserva, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis (MORENO et al, 2008; HURST, 1981; MARTINIS et al, 2002).

Figura 2 – Estrutura química da nisina



A nisina mostrou-se efetiva impedindo a contaminação dos alimentos e na ampliação da vida de prateleira, essencialmente em laticínios onde substitui outros aditivos químicos habitualmente utilizados, como exemplo o nitrato de potássio (CHEN & HOOVER, 2003).

A limitação mais relevante da nisina é a perda de atividade em pH neutro (McAULIFFE et al, 2001). Ela também não é uma bacteriocina termotolerante, o que faz com que só possa ser adicionada em alimentos que passem por processos de pasteurização, tendo o risco de ser desativada em produtos que passem por processo de esterilização (121 °C) (BROUGHTON et al, 1996).

Embora várias bacteriocinas com potencial de emprego nos alimentos já tenham sido purificadas e caracterizadas, a nisina e, em uma extensão menor, a pediocina PA-1, são as únicas bacteriocinas produzidas em escala comercial (COTTER et al., 2005).

As bacteriocinas e outros agentes antimicrobianos naturais são muito interessantes para a indústria justamente pelo apelo de "segurança" que sugerem. Com a mudança das exigências do consumidor, este será um atributo cada vez mais valorizado. Assim, tudo indica que conservantes naturais - particularmente em adição ou combinação sinérgica com outros fatores e técnicas que já estão em uso - terão um papel importante em um futuro próximo, principalmente se estes agentes tenham nos alimentos a mesma ação efetiva verificada em ensaios laboratoriais (SCHULZ et al, 2003).

2- OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Isolar e selecionar bactérias do açaí (*Euterpe oleracea*) produtoras de antimicrobianos com potencial biotecnológico.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar as bactérias do açaí;
- Identificar a atividade antimicrobiana das bactérias isoladas;
- Caracterizar espectro de ação;
- Caracterizar a estabilidade dos extratos destas bactérias quanto à neutralidade do pH, temperatura, ação de enzimas proteolíticas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- AMOSTRAGEM

Os frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) foram coletados em dois municípios do estado do Pará (Brasil): Belém - Ilha do Combú (1° 29'45,0''S 48°26'26,6''W) e Abaetetuba – Ilha da Compompema (1° 44'39,8''S 48°55'09,5''W). Os cachos foram coletados e colocados diretamente em sacos plásticos irradiados com luz UV, lacrados e trazidos diretamente para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UFPA.

3.2- SELEÇÃO, ASSEPSIA E ISOLAMENTO

Os frutos maduros e sem injúrias foram selecionados em câmara de fluxo laminar e seguiram para assepsia, realizada de acordo com a metodologia descrita por Souza et al (2004), com algumas modificações. Os frutos foram abundantemente lavados com água destilada estéril para retirar o excesso de epifíticos. Depois, o material foi imerso em solução de álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 2% por 10 minutos e novamente em álcool 70% por 1 minuto, para retirar o excesso de hipoclorito. Em seguida, foram realizadas duas lavagens em água destilada estéril.

Após a assepsia, o fruto foi despulpado em peneira metálica estéril até a retirada total da polpa dos frutos, obtendo-se uma alíquota de 25 gramas de amostra, a partir de 500 gramas de açaí, para a diluição em 225ml de água peptonada, sendo esta homogeneizada em stomaker por 1 minuto.

Na amostra homogeneizada, realizou-se uma diluição seriada até a diluição 10^{-7} para a inoculação de 0,1 ml de cada diluição em placas de petri contendo o meio de cultura Lactobacilli MRS Ágar, que foi incubado em jarra com sistema gerador de anaerobiose, a 36°C por 48 horas. Após o crescimento das colônias no meio seletivo, estas foram isoladas uma a uma em meio Lactobacilli MRS Ágar.

3.3- ANTAGONISMO *IN VITRO*

Com as culturas isoladas, foram realizados testes de antagonismo. Para a realização dos testes, as bactérias isoladas foram testadas quanto à capacidade antagonista contra outros micro-organismos, denominados de culturas reveladoras. Foram utilizadas como culturas reveladoras três bactérias de referência: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Corynebacterium sp.*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.3.1- Teste de *spot-on-the-lawn*

Para o teste de antagonismo foi utilizada a técnica de *spot-on-the-lawn*, descrita em Nardi et al (2005). As amostras de bactérias lácticas foram ativadas em tubos de ensaio contendo caldo MRS e incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. Após a ativação, 5µL de cada amostra foram depositados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS, incubadas em câmara de anaerobiose a 37°C por 24 horas, no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos.

Após esse período, com o objetivo de eliminar os micro-organismos, foi adicionado clorofórmio às tampas das placas de Petri e aguardou-se 30 minutos sob luz UV. As culturas reveladoras passaram por uma ativação, sendo crescidas em caldo Brain Heart Infusion (BHI). Dez microlitros do cultivo das reveladoras foram adicionados em tubos contendo 3,5mL de ágar semissólido (0,75% de BactoAgar em caldo BHI). Em seguida, os tubos com ágar semissólido contendo as bactérias reveladoras foram vertidos nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, sob aerobiose, observando-se o resultado após este período.

3.3.2 – Teste de difusão em poço

Para o teste de difusão em poço foi utilizado o meio de cultura BHI Agar, de acordo com a técnica descrita em Patel et al (2013). Para o inóculo, as bactérias

produtoras que apresentaram atividade inibitória passaram por uma ativação em caldo MRS, incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e foram reservados os sobrenadantes. Depois os tubos foram congelados a -20°C por 24 horas e os extratos sobrenadantes de cada bactéria produtora foram liofilizados no Laboratório de Catálise e Oleoquímica – UFPA.

O conteúdo liofilizado de cada tubo foi ressuscitado em 500 µL de água ultrapura, que foi inoculado em poços feitos em meio BHI ágar adicionado de 3,5 ml de meio BHI semissólido com 40 µL do cultivo das reveladoras. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em aerobiose. Os extratos que apresentaram atividade foram selecionados para a caracterização.

3.4- CARACTERIZAÇÃO DE ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS EXTRATOS

Os extratos que apresentaram atividade antagonista foram submetidos a três tratamentos para a caracterização de sua estabilidade e espectro de ação. Na inoculação, também foi colocado um extrato controle de cada bactéria produtora para a comparação com os extratos tratados, a fim de determinar se os tratamentos aumentaram ou diminuíram a atividade antagonista. Os ensaios foram realizados no Centro de Valorização Agroalimentar dos Compostos Bioativos da Amazônia – UFPA, de acordo com as metodologias descritas em Sankar et al (2012) e Carvalho et al (2005).

3.4.1 – Estabilidade térmica

Os extratos sobrenadantes foram submetidos a autoclavagem a 121°C por 15 minutos e depois foram congelados e liofilizados. Os extratos foram ressuscitados em 500 µL de água ultrapura e foram inoculados em poços feitos em BHI ágar adicionado de 3,5 ml de meio BHI semissólido com 40 µL do cultivo das reveladoras. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em aerobiose.

3.4.2 – Sensibilidade a enzima proteolítica

Os extratos foram primeiramente liofilizados por 18 horas e depois ressuscitado em 1ml de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) acrescido de cloreto de cálcio 20mM, sendo a enzima proteolítica tripsina acrescentada ao meio numa proporção final de 5mg/ml.

As amostras foram tratadas em dois tempos. Uma foi ativada em banho-maria por 2 horas e a outra por 18 horas a 37°C, de acordo com a metodologia descrita em Carvalho et al (2005).

Depois cada uma foi inoculada em poços feitos em BHI ágar adicionado de 3,5 ml de meio BHI semissólido com 40 µL do cultivo das reveladoras. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, em aerobiose.

3.4.3 – Efeito do pH

Os extratos foram neutralizados até o pH 7 com a adição de hidróxido de sódio 0,1M diretamente ao extrato, utilizando fitas indicadoras de pH para a aferição. Após a neutralização, foram liofilizados e em seguida foram ressuscitados em 500 µL de água ultrapura e inoculados em poços feitos em BHI ágar adicionado de 3,5 ml de meio BHI semissólido com 40 µL do cultivo das reveladoras. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em aerobiose.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- ISOLAMENTO

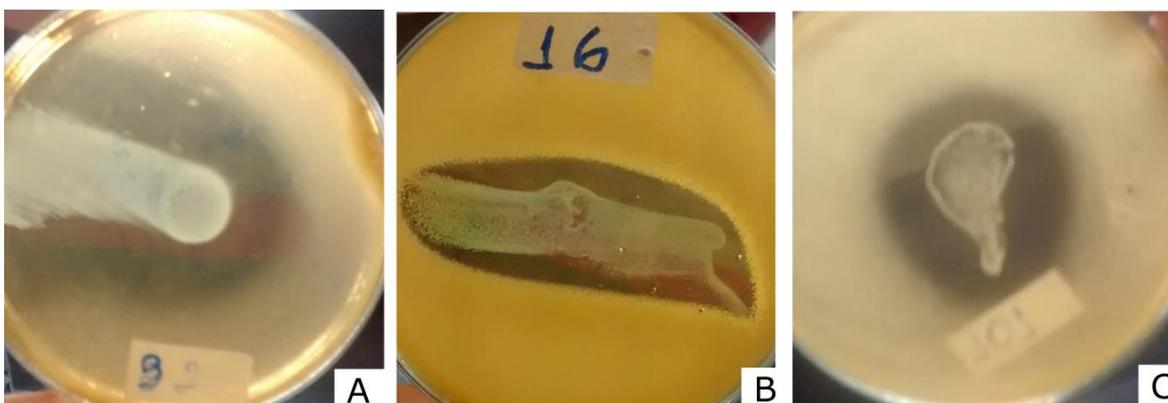
Após o tratamento e a diluição seriada, foram isoladas trinta e nove bactérias no total, sendo cada uma codificada com um número. Destas, dezesseis bactérias foram isoladas da amostra de açaí provenientes da Ilha do Combú e vinte e três das amostras provenientes de Abaetetuba.

4.2- ANTAGONISMO *IN VITRO*

As bactérias isoladas foram testadas com a técnica de *spot-on-the-lawn*, a fim de determinar se elas apresentavam atividade antagonistas contra as bactérias reveladoras (Tabela 1), observando 19 com atividade antagonista, sendo esta detectada pela formação de halo de inibição de crescimento.

Na figura 3, é possível observar os halos de inibição de crescimento (zona translúcida) contra a bactérias reveladoras, o que facilita a seleção das cepas produtoras de antimicrobianos.

Figura 3 – Resultados do teste de *spot-on-the-lawn*



(A) Bactéria produtora 32 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria reveladora *Corinebacterium sp.* (B) Bactéria produtora 16 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria *Bacillus cereus*. (C) Bactéria produtora 101 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria *Listeria monocytogenes*.

Tabela 1 – Resultados do teste de *spot-on-the-lawn* para cada bactéria reveladora.

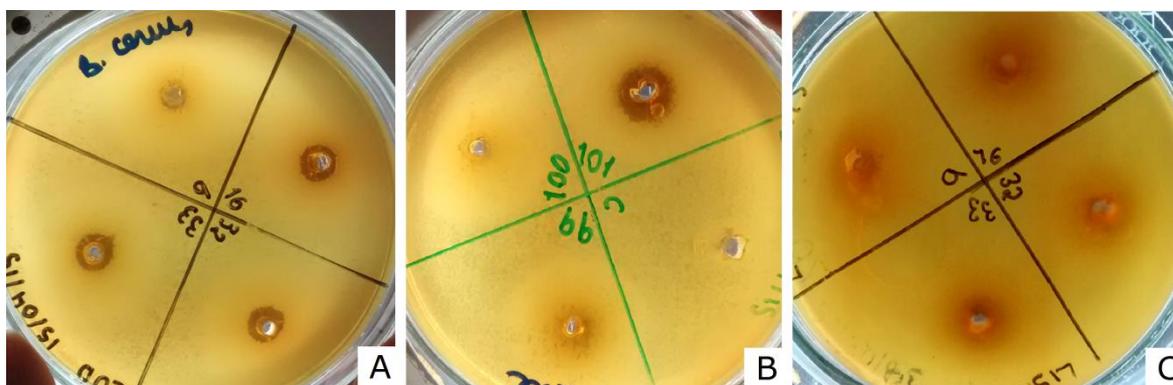
Bactéria produtora	Origem	Bactéria reveladora		
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium sp</i>
2	Combú	-	-	-
4	Combú	-	-	-
9	Combú	Positivo	-	Positivo
10	Combú	-	-	-
16	Combú	Positivo	-	Positivo
20	Combú	-	-	-
21	Combú	-	-	-
23	Combú	-	-	-
32	Combú	Positivo	Positivo	Positivo
33	Combú	-	Positivo	Positivo
34	Combú	Positivo	Positivo	Positivo
35	Combú	Positivo	Positivo	Positivo
36	Combú	-	-	-
37	Combú	-	-	-
38	Combú	-	-	-
52	Combú	-	-	-
63	Abaetetuba	-	-	-
64	Abaetetuba	-	-	Positivo
65	Abaetetuba	-	-	Positivo
66	Abaetetuba	-	-	Positivo
67	Abaetetuba	-	-	-
68	Abaetetuba	-	-	-
69	Abaetetuba	-	-	-
70	Abaetetuba	-	-	Positivo
71	Abaetetuba	-	-	Positivo
72	Abaetetuba	Positivo	-	Positivo
73	Abaetetuba	-	-	-
74	Abaetetuba	-	-	-
75	Abaetetuba	Positivo	-	Positivo
76	Abaetetuba	-	-	-
82	Abaetetuba	-	-	Positivo
84	Abaetetuba	-	Positivo	Positivo
87	Abaetetuba	Positivo	Positivo	-
88	Abaetetuba	-	-	-
99	Abaetetuba	Positivo	Positivo	Positivo
100	Abaetetuba	Positivo	Positivo	Positivo
101	Abaetetuba	Positivo	Positivo	Positivo
102	Abaetetuba	-	-	-
103	Abaetetuba	-	-	-

(-) Não apresentou atividade

A atividade inibitória observada com a técnica de *spot-on-the-lawn* é vista como melhor em comparação a outras técnicas, porém ela não exclui a capacidade inibitória dos metabolitos presentes (ácido láctico, ácido acético, diacetil, bacteriocinas, etc) a serem produzidos durante o período de ensaio, além da maior capacidade de difusão das substâncias produzidas pelas bactérias e da concentração delas no meio (ÇADIRCI & ÇITAK, 2005).

Os resultados obtidos com o teste de *spot-on-the-lawn* apontaram 19 bactérias que apresentaram atividade inibitória. Os extratos liofilizados e ressuspensos dessas bactérias foram testados com a técnica de difusão em poço, a fim de determinar se a bactéria produz substâncias extracelulares que possuam atividade antagonista. Destas, apenas 12 mostraram atividade (tabela 2), sendo esta detectada pela formação de halo de inibição de crescimento, como demonstrado na figura 4.

Figura 4 – Resultados do teste de difusão em poço



(A) Bactérias produtoras 16,32 e 33 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria reveladora *Bacillus cereus*. (B) Bactéria produtora 101 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria *Corinebacterium sp.* (C) Bactérias produtoras 16, 32 e 33 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria *Listeria monocytogenes*.

Os extratos liofilizados foram anteriormente congelados em freezer a uma temperatura de -20°C. De acordo com Dimitrieva-Moats & Unlu (2012), as condições de congelamento que antecedem o processo de liofilização podem interferir na retenção de atividade microbiana.

A secagem dos extratos torna possível produzir uma bacteriocina fácil de usar, microbiologicamente estável e que conserve a atividade por longos períodos

de tempo à temperatura ambiente. A técnica de liofilização garante a sublimação dos ácidos orgânicos, o que faz com que tenhamos um extrato estável e com uma maior concentração de bacteriocinas (DIMITRIEVA-MOATS & UNLU, 2012).

Tabela 2 – Resultados do teste de difusão em poço

Bactérias produtoras	Bactérias reveladoras		
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium sp</i>
9	-	-	-
16	Positivo	Positivo	Positivo
32	Positivo	Positivo	Positivo
33	Positivo	Positivo	Positivo
34	-	-	-
35	Positivo	-	Positivo
64	Positivo	-	Positivo
65	-	-	-
66	Positivo	-	Positivo
70	Positivo	Positivo	-
71	Positivo	Positivo	-
72	Positivo	Positivo	Positivo
75	Positivo	Positivo	Positivo
82	-	-	-
84	-	-	-
87	Positivo	-	Positivo
99	-	-	-
100	-	-	-
101	Positivo	-	Positivo

(-) Não apresentou atividade

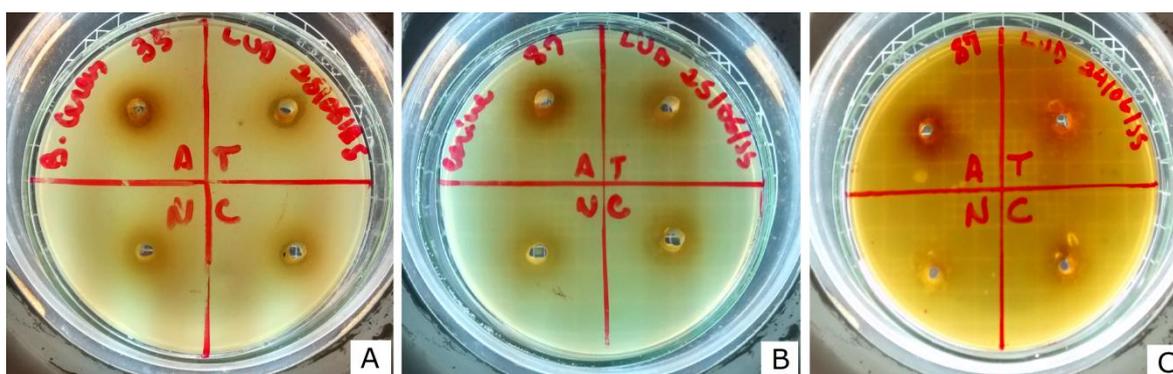
A visualização de halos no teste de difusão em poço com a bactéria *Listeria monocytogenes* foi mais difícil, pois ela não formou um halo distinto como nos testes com as outras reveladoras (Figura 4C). Houve apenas uma verificação através da cor ao redor do poço, que apresenta uma translucidez, indicando que a bactéria reveladora não cresceu naquela região.

4.3- CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS

Os doze extratos que apresentaram atividade no teste de difusão em poço foram testados com a aplicação de tratamentos, a fim de determinar suas características e espectro de ação em diferentes condições. Os resultados estão expressos na tabela 3 (ver página 31).

Cada placa foi analisada em relação ao comportamento do extrato depois de ter passado pelos tratamentos comparado com o extrato controle, que não apresentava nenhum tratamento. A intensidade da coloração em cada poço em comparação ao controle foi o indicativo do aumento ou diminuição da atividade, que apresentam uma translucidez, indicando que a bactéria reveladora não cresceu naquela região (Figura 5).

Figura 5 – Caracterização dos extratos de cada bactéria produtora



Legenda: A – Autoclavagem; T – Tripsina; N – Neutralização e C – Controle. (A) Extratos tratados da bactéria produtora 35 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria reveladora *Bacillus cereus*. (B) Extratos tratados da bactéria produtora 87 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria *Corynebacterium sp.* (C) Extratos tratados da bactéria produtora 87 apresentando halo de inibição de crescimento contra a bactéria *Listeria monocytogenes*.

A estabilidade da bacteriocina a diferentes condições reflete que esses compostos podem suportar as condições normalmente encontradas no processamento de alimentos, de modo que permanecem eficazes durante o processamento (LEWUS et al, 1991).

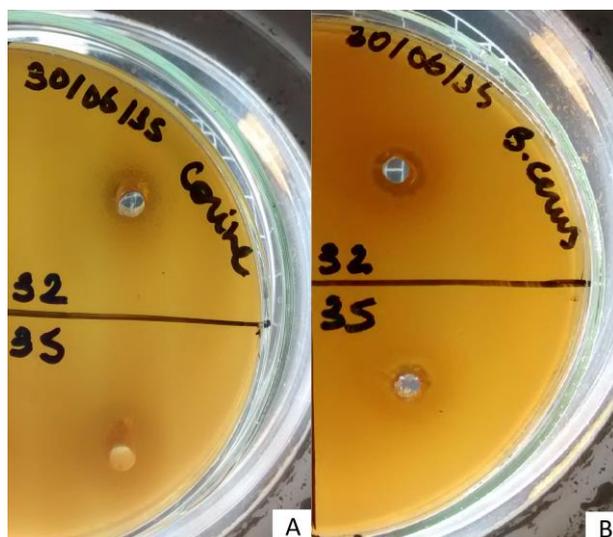
A natureza proteica das substâncias inibidoras produzidas pelos isolados 16, 70, 72 e 101 foi confirmada pela sua sensibilidade à protease, já que foi observada uma diminuição da atividade do extrato. A inatividade em presença de

uma enzima proteolítica é um grande indicativo da natureza proteica das bacteriocinas, porém, de acordo com Jack et al (1995), é inadequado predizer qual tipo de substância o ensaio encontrou com base somente na inativação da atividade bactericida por enzimas proteolíticas.

O estudo de Bonini et al (2007) mostra que a bacteriocina produzida por cepas de *Curtobacterium flaccunfaciens* é resistente à tripsina. Outros trabalhos mostram bacteriocinas como a salivacirina P e salivacirina D, lantibióticos também resistentes (O'SHEA et al, 2010; BIRRI et al, 2012). Algumas bacteriocinas de cepas de *Pseudomonas cepacia* também apresentaram atividade na presença de tripsina (GOVAN E HARRIS, 1985). Este também pode ser um indicativo de que os extratos que se apresentaram mais reativos na presença de tripsina possam ser novos tipos de bacteriocinas ainda não estudados.

Os extratos também foram tratados com a tripsina por 18 horas em banho-maria a 37°C, a fim de verificar a estabilidade das substâncias em condições extremas (Figura 6).

Figura 5 – Caracterização de atividade sob ação da enzima tripsina por 18 horas.



(A) Atividade do extrato da bactéria 32 sob a bactéria reveladora *Corybacterium sp.* após tratamento com tripsina por 18 horas. (B) Atividade do extrato da bactéria 32 sob a bactéria reveladora *Bacillus cereus* após tratamento com tripsina por 18 horas.

Tabela 3 – Resultados da caracterização de extratos

Bactéria produtora	Controle			Autoclavado			Tripsina			Neutro		
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
16	+	+	+	++	++	+++	-	+	++	-	-	-
32	++	+	+	+	+	++	++	++	++	-	-	+
33	+	+	+	+	++	++	+	+	++	-	+	+
35	++	+	+	++	++	+++	+++	+++	+	-	-	-
64	+	++	+	-	+++	+++	+	++	++	-	-	-
66	+	++	+	+	+++	++	++	++	+	-	-	-
70	++	+++	+	+++	+++	+++	+	++	+++	-	+	+
71	++	++	+	++	++	+++	+++	+++	++	-	+	+
72	+	+	+	+++	++	+++	-	+	++	-	-	+
75	+	+	+	-	+	-	++	+++	+	-	+	-
87	+	+	+	+++	+++	++	++	++	+++	-	-	-
101	+	+++	+	+	++	++	++	+	+	-	+	+

- Sem atividade

+ Baixa atividade

++ Média atividade

+++ Alta atividade

O único extrato que se manteve estável, mesmo depois do tratamento intenso com a tripsina, foi o da cepa 32, o que indica que o antimicrobiano é de origem não-proteica ou não possui os aminoácidos arginina ou lisina, para os quais a tripsina tem uma ação específica (ligações peptídicas contendo resíduos com cadeia lateral com carga elétrica positiva). A tripsina também pode ter agido de forma a hidrolisar a molécula em um peptídeo menor mais específico, deixando-o ativo mesmo após o tratamento.

Após a neutralização do pH, apenas os extratos das bactérias 32, 33, 70, 71, 72, 75 e 101 tiveram efeitos inibitórios em *Listeria monocytogenes* e *Corynebacterium sp.* Yang et al (2012) sugere que ácidos e/ou H₂O₂ orgânicos produzidos pela bactérias têm fortes efeitos sob a atividade antimicrobiana em bactérias testadas.

Algumas bacteriocinas apresentam melhor atividade em pH ácido, chegando até a não apresentar atividade em pH básico. A bacteriocina B0105 não mostra atividade em pH acima de 6 (CHEN et al, 2013). Alguma bacteriocinas de *Pediococcus* possuem atividade ótima pH 3-5 (JOSHI et al, 2006). A nisina, quando em pH neutro, também não apresenta atividade, o que indica que a os extratos apresentam mais atividade quando em pH ácido (McAULIFFE et al, 2001).

Dos doze extratos, onze se mostraram mais reativos depois da autoclavagem por 15 minutos a 121°C. Suas atividades podem ser comparadas as da bacteriocina pediocina PA-1 (RODRÍGUEZ et al, 2002) e da nisina (MOTLAGH et al, 1991). A termoestabilidade observada neste resultado é um indicativo de que a substâncias encontradas nos extratos possam ser bacteriocinas das classes I e II. Para uma melhor identificação da classe a que elas pertencem, uma separação em membrana de ultrafiltração de *cutoff* de 5 kDa determinaria o tamanho da molécula, separando, assim, as da classe I (peptídeos menores que 5 kDa) e as da classe II (peptídeos menores 10 kDa).

Porém, o extrato da bactéria 75 não apresentou atividade após o tratamento térmico, o que indica que a substância presente no extrato pode ser uma bacteriolisina de classe III.

Apesar da atividade inibitória ser observada em todos os isolados, este resultado indica que é preciso ter cuidado ao avaliar, através de ensaios dependentes da formação de colônias que não excluem a atividade de produtos metabólicos excretados, a atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos de origem alimentar (RODRIGUES, 2010).

CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que bactérias isoladas de açaí possuem potencial para a produção de substâncias antimicrobianas. Das trinta e nove bactérias isoladas, doze bactérias apresentam atividade extracelular através do teste de difusão em poço após liofilização.

Com os testes de caracterização, foi possível se aproximar mais das características de outras bacteriocinas.

Quatro extratos das bactérias apresentaram menor atividade na presença de tripsina, indicando que estas podem ser bacteriocinas.

Os extratos neutralizados apresentaram nenhuma ou a mesma atividade do extrato controle, o que indica uma melhor atividade dos extratos em pH ácido.

Onze extratos apresentaram atividade depois de autoclavagem, o que pode ser um indicativo de que os extratos possuem bacteriocinas das classes I e II.

6 – PERSPECTIVAS

Estudos posteriores para identificar as bactérias produtoras em questão facilitarão a determinação do tipo de bacteriocinas encontradas. Seriam importantes testes para melhor caracterizar, isolar e purificar estas bacteriocinas, para utilizar as mesmas em processos industriais e otimizar a sua produção.

Dentre as caracterizações, desejamos determinar a concentração inibitória mínima das substâncias encontradas.

Os resultados também servem de base para que outros estudos como este sejam realizados com frutos do açaí de outras áreas produtoras, uma vez que a variação das regiões pode conferir a possibilidade de diferentes isolados com potencial na produção de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, F.; MENEZES, V.; ROGEZ, H. **Spontaneous postharvest fermentation of açai (*Euterpe oleracea*) fruit**. *Postharvest Biology and Technology*. v. 86, pg. 294-299, 2013.

BASTOS, Maria do Carmo de Freire; COUTINHO, Bruna Gonçalves; COELHO, Marcus Lívio Varella. **Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications**. *Pharmaceuticals*, v. 3, n. 4, p. 1139-1161, 2010.

BIRRI, D. J.; BREDE, D.; NES, I. F. **Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from a healthy infant**. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 2, p. 402-410, 2012.

BONINI, Marcel; MARINGONI, Antonio Carlos; RODRIGUES NETO, Julio. **Characterization of *Xanthomonas* spp. strains by bacteriocins**. *Summa Phytopathologica*, v. 33, n. 1, p. 24-29, 2007.

BROUGHTON, J. D.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. **Applications of the bacteriocin, nisin**. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol 69. 1996. p 193-202.

BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. **Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria**. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.59, n.9, p. 3003-3010, 1993.

CARVALHO, A. A. T., DE PAULA, R. A., MANTOVANI, H. C., & DE MORAES, C. A. 2006. **Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami**. *Food microbiology*, 23(3), 213-219. 2006

CAVALCANTE, P. B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 6^o ed. Belém, PA; Museu Paraense Emilio Goeld: CNPQ, 2010. 279 p.

CHEN, L. V. R. D. **Detecção de enzimas bacterianas extracelulares isoladas a partir de *Euterpe oleracea* (açai)**. 2014. Dissertação de Mestrado (Pós Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

CHEN, C. C. et al. **Antibacterial properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented mustards against *Streptococcus mutans***. African Journal of Microbiology Research, v. 7, n. 40, p. 4787-4793, 2013.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. **Bacteriocins and their food applications: comprehensive rev.** Journal Food Science, Chicago, v. 2, p. 82-100, 2003.

CLEVELAND, J. et al. **Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation.** International Journal of Food Microbiology, v. 71, p. 01-20, 2001.

COTTER, P. D. et al. **Bacteriocins: developing innate immunity for food.** Nature Reviews, v. 3, p. 777-788, 2005.

ÇADIRCI, Bilge Hilal; CITAK, Sumru. **A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria.** Pak. J. Nutr, v. 4, n. 4, p. 237-241, 2005.

DIMITRIEVA-MOATS, G.YU., and G. UNLU. **Development of Freeze-Dried Bacteriocin-Containing Preparations from Lactic Acid Bacteria to Inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus***. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 4 (1): 27-38. 2012.

EIJSINK, V.G.H., BRURBERG, M.B., MIDDELLHOVEN, P.H., NES, I.F. **Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide.** J. Bacteriol., Baltimore, v.178, n.8, p.2232-2237, 1996.

EVANGELISTA - BARRETO, N. S. et al. **Aplicação de bacteriocinas nos alimentos: uma revisão.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 18, n. 126/127, p. 44-50, 2004.

FARBER J. M., PETERKIN P.I. ***Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen.** *Microbiological Reviews*. 55(3):476-511. 1991

GOVAN, J. R.; HARRIS, G.. **Typing of *Pseudomonas cepacia* by bacteriocin susceptibility and production.** Journal of clinical microbiology, v. 22, n. 4, p. 490-494, 1985.

HENG, N. C., WESCOMBE, P. A., BURTON, J. P., JACK, R. W., & TAGG, J. R. **The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria.** In *Bacteriocins*. p. 45-92. Springer Berlin Heidelberg. 2007

HERNÁNDEZ, D. et al. **Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like.** Brazilian Journal Food Technology, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

HOMMA, A. K. O., NOGUEIRA, O. L., MENEZES, A. J. E. A., CARVALHO, J. D., NICOLI, C. M. L., & MATOS, G. D. **Açaí: novos desafios e tendências.** Amazônia: Ciência & Desenvolvimento, 1(2), 7-23. 2006

HURST, A. **Nisin.** Adv. Appl, Microbiol. 27:85-123. 1981.

IMAZON. **Índice de preço de produtos da floresta.** Boletim Semestral. 2011

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. **Bacteriocins of gram positive bacteria.** Microbiol. Rev., v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.

JOSHI, Vinod Kumar; SHARMA, Somesh; RANA, Neerja S. **Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables.** Food technology and Biotechnology, v. 44, n. 3, p. 435-439, 2006.

KLAENHAMMER, T.R. **Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.** FEMS Microbiol. Rev., n.12, p.39-85, 1993.

KOTIRANTA, Anja; LOUNATMAA, Kari; HAAPASALO, Markus. **Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections.** Microbes and Infection, v. 2, n. 2, p. 189-198, 2000.

LEWUS, C.B., KAISER, A., MONTVILLE, T.J. **Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat.** Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.

MARTIN, I., RUYSSCHAERT, J.M., SANDERS, D., GIFFARD, C.J. **Interaction of the lantibiotic nisin with membrane revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan.** Eur. J. Biochem. Oxford, v.239, p.156-164, 1996.

MARTINIS, E. C. P. et al. **Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products.** Food Reviews International, v. 18, n. 2/3, p. 191-208, 2002

McAULIFFE, O. et al. **Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action.** FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 25, p. 285-308, 2001.

MOLL, G.N., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. **Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation.** *Antonie van Leeuwenhoek* Dordrecht, v.76, p.185-198, 1999.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; LEITÃO, M.F.F. **Bacteriocinas de bactérias lácticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência.** 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/index.htm>. Acesso em: 29/9/2014

MOTLAGH, Ali M.; JOHNSON, Monty C.; RAY, Bibek. **Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites.** Journal of Food Protection®, v. 54, n. 11, p. 873-884, 1991.

MOURA F.G; GRAÇAS; D. A.; SANTOS, A. V.; SILVA, A. L. C.; ROGEZ; H. **Bacterial community during spontaneous fermentation of açai (*Euterpe oleracea*) fruits.** Bioresource Biotechnology. No prelo.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael. **Microbiologia Médica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2015.**

NARDI, R.M.D., SANTORO, M.M., OLIVEIRA, J.S., PIMENTA, A.M.C., FERRAZ, V.P., BENCHETRIT, L.C. AND NICOLI, J.R. **Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1.** Journal of Applied Microbiology, 99. 2005.

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MULLER, C. H. **Cultivo do açaizeiro para produção de frutos**. Circular técnica 26. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 2002.

O'SHEA, E. F. et al. **Synthesis of trypsin-resistant variants of the Listeria-active bacteriocin salivaricin P**. Applied and environmental microbiology, v. 76, n. 16, p. 5356-5362, 2010.

PARADA, J. L., CARON, C. R., MEDEIROS, A. B. P., & SOCCOL, C. R. **Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as biopreservatives**. Brazilian Archive of Biology and Technology, 50(3), 521-542. 2007

PATEL, A., SHAH, N., AMBALAM, P., PRAJAPATI, J. B., HOLST, O., & LJUNGH, A. **Antimicrobial profile of lactic acid bacteria isolated from vegetables and indigenous fermented foods of India against clinical pathogens using microdilution method**. Biomedical and environmental sciences: BES, 26(9), 2013.

RILEY, M. A; WERTZ, J. E. **Bacteriocins: evolution, ecology, and application**. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 56, p. 117-137, 2002.

RODRIGUES, T. T. **Revisão bibliográfica da utilização de bacteriocinas como conservantes alimentícios na última década**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó, 2010.

RODRÍGUEZ, J. M. ,MARTÍNEZ, M. I ;KOK, J. **Pediocin PA-1, a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42:2, 91-121, 2002.

ROGEZ, H.; POMPEU, D.R.; AKWIE, S.N.T.; LARONDELLE, Y. **Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: a comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits**. J Food Compos Anal 24:796–800. 2011.

ROGEZ, H.; AKWIE; S. N. L. T. ; MOURA, F. G.; LARONDELLE, Y. **Kinetic Modeling of Anthocyanin Degradation and Microorganism Growth during Postharvest Storage of Açai Fruits (*Euterpe oleracea*)**. Journal of Food Science. Vol 77. N 12. 2012.

ROSA, C. M. et al. **Purification and mechanismaction of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, Lactobacillus sake 2a.** Journal Food Safety, v. 22, p. 39- 54, 2002.

SANKAR, N. Ravi et al. **Purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum isolated from cow milk.** Int J Microbiol Res, v. 3, n. 2, p. 133-137, 2012.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; DONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. **Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos.** Alim. Nutr., Araraquara, v.14, n.2, p. 229-235, 2003.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIZ M. I. M., PEREIRA, J. O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham.** Acta Amazonica. Vol. 34. 2004. p 185 – 195.

UDHAYASHREE, N., SENBAGAM, D., SENTHILKUMAR, B., NITHYA, K., & GURUSAMY, R. **Production of bacteriocin and their application in food products.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S406-S410. 2012.

YANG, En et al. **Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts.** AMB Express, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA MRS

COMPOSIÇÃO g/L:

- Peptona proteose: 10.00
- Extrato de carne: 10.00
- Extrato de levedura: 5.00
- Dextrose: 20.00
- Polisorbato 80: 1.00
- Citrato de amônia: 2.00
- Acetato de sódio: 5.00
- Sulfato de magnésio: 0.10
- Sulfato de manganês: 0.05
- Fosfato dipotássico: 2.00

pH FINAL: 6.5 ± 0.2

ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA BHI

COMPOSIÇÃO g/L:

- Infusão de Cérebro de Bezerra: 200.00
- Protease peptona: 10.00
- Cloreto de sódio: 5.00
- Infusão de Coração Bovino: 250.00
- Dextrose: 2.00
- Fosfato Dissódico: 2.50

pH FINAL: 7.4 ± 0.2