

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EFEITO DE NISINA SOBRE BIOFILMES DE *SALMONELLA*

Giovana Dias Lima, Cláudia Vieira Prudêncio.

Universidade Federal do Oeste da Bahia, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Rua da Prainha, 1326, Morada Nobre - 47810-047 – Barreiras-BA, Brasil, giovanadiaslima16@gmail.com, claudia.prudencio@ufob.edu.br.

Resumo

Doenças veiculadas por alimentos (DVA) são um importante problema de saúde pública enfrentado em todo o mundo que provocam efeitos deletérios à saúde e geram custos substanciais aos sistemas de saúde. A salmonelose é uma das principais DVA no mundo, possivelmente pela ampla difusão do patógeno na natureza e pela sua elevada capacidade de formação de biofilmes. Nesse contexto, a comunidade científica tem sido desafiada a propor novas estratégias e buscar novos compostos para o manejo microbiologicamente seguro dos alimentos. Dentre as alternativas propostas, pesquisas com o uso de bacteriocinas como bioconservantes se destacam. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de nisina sobre a formação de biofilme de *Salmonella* em cupons de poliestireno. A determinação do número de células aderidas foi realizada por meio da contagem do número de células viáveis, após a sonicação dos cupons. Os resultados indicam que sob condições ótimas de incubação, nisina não alterou significativamente a formação de biofilmes de *Salmonella*.

Palavras-chave: Nisina. Atividade antimicrobiana. Biofilme de *Salmonella*.

Área do Conhecimento: Ciências e Tecnologia de Alimentos

Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 600 milhões de pessoas ao ano sejam acometidas por doenças veiculadas por alimentos (DVA), e que cerca de 420 mil indivíduos morram anualmente em decorrência dessas doenças (OMS, 2019). Essas doenças podem ter origem biológica, quando micro-organismos patogênicos, como *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* e/ou suas toxinas, entram em contato com os alimentos em algum momento de seu processamento (MALACRIDA, 2017). Por outro lado, a resistência dos micro-organismos contra os antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento de doenças também tem sido considerada uma importante questão de saúde a ser enfrentada, por propiciar a persistência das infecções devido a ineficiência dos tratamentos (SILVA, 2018; AMORIM-CARMO et al., 2019).

Salmonella sp. é um micro-organismo amplamente difundido na natureza, presente principalmente em humanos e animais (RODRIGUES, 2016). Sua ampla distribuição favorece a aquisição de elementos genéticos e mutações e a ocorrência de surtos de DVA provocados por alimentos contaminados com o patógeno (RIBEIRO et al., 2007; BRASIL, 2015). Alguns estudos como de Sibhat et al. (2011) e Bergamo et al. (2020) por exemplo, identificaram em carne bovina moída cepas de *Salmonella sp.* multirresistentes a antimicrobianos, como ampicilina, amoxicilina e gentamicina. Além disso, *Salmonella* possui elevada capacidade de formação de biofilmes pela presença de apêndices filamentosos que favorecem a adesão do micro-organismo às superfícies (MORAES, 2014; MENDONÇA, 2016; SILVA et al., 2019; BERGAMO et al., 2020).

Em geral, quando presentes em biofilmes os micro-organismos se tornam mais resistentes ao uso de sanitizantes, o que dificulta sua remoção e favorece sua persistência no meio (SIMÕES et al., 2003; DALLA COSTA et al., 2016). Desse modo, a presença de *Salmonella* representa uma preocupação, pois sua já conhecida multirresistência a antimicrobianos, somada a persistência provocada pela estrutura do biofilme, sugerem que a ocorrência desse biofilme em um ambiente de manipulação de alimentos possa atuar como um reservatório de contaminação microbiana, e favorecer a ocorrência de surtos de DVA (MORETTO et al., 2010; BERGAMO, G et al., 2020). Nesse contexto, a indústria alimentícia tem sido desafiada a desenvolver novas estratégias microbiologicamente seguras de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

manejo de alimentos, e a buscar novos compostos com potencial antimicrobiano (DOS SANTOS et al., 2014; WHO, 2018; SARAIVA et al., 2020).

Neste cenário, pesquisas voltadas para o uso de bacteriocinas como bioconservantes têm indicado uma aplicação promissora destes compostos (DE MELO et al., 2005; LARANJA, 2016; KRYSHEN, 2016). Destarte, a nisina é a bacteriocina mais estudada e utilizada como conservante (COTTER et al., 2005; LARANJA, 2016). É sintetizada por *Lactococcus lactis* e tem ação inibitória contra uma gama de micro-organismos, inclusive esporos bacterianos (KRYSHEN, 2016). Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo, avaliar o efeito de diferentes concentrações de nisina sobre a formação de biofilme de *Salmonella* em superfícies de cupons de poliestireno.

Metodologia

Culturas de *Salmonella entérica* sorotipo *Typhimurium* ATCC 14028 mantidas sob congelamento a -20°C foram transferidas antes de cada ensaio para caldo Triptona de soja (TSB) e incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. O material foi centrifugado e o pellet lavado e ressuspensão em solução salina 0,85%.

A solução de nisina foi preparada a partir de solução comercial em solução fosfato de sódio com pH 2,0. Foram escolhidas concentrações anteriormente estabelecidas como inibitórias e subinibitórias para este micro-organismo (72,5, 145 e 290 μM) (SILVA, 2019).

Para a indução da formação de biofilmes foram utilizados cupons de poliestireno (1x1 cm) previamente lavados e desinfetados com etanol e luz ultravioleta. Para o ensaio, os cupons foram transferidos para tubos com caldo TSB, acrescido das diferentes concentrações de nisina. A solução foi inoculada com uma concentração de $5 \log_{10}$ UFC/ml de *Salmonella* e mantida sob incubação a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 24 h. Como controle foram utilizados cupons mantidos nas mesmas condições sem adição de nisina.

Após a incubação, os cupons foram removidos, lavados por três vezes com solução salina 0,85% para a retirada de células planctônicas e adicionados a tubos com 20 ml de salina 0,85% para determinação do número de células aderidas. Para isso, os tubos foram submetidos à sonicação durante 30 minutos a 45 kHz para remoção de células. Para quantificação, alíquotas foram coletadas e plaqueadas pela técnica de microgotas, com três réplicas em ágar padrão de contagem (PCA) (MORTON, 2001).

As placas foram incubadas $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 8 a 12 h para a determinação do número de colônias. O número de células planctônicas também foi avaliado pela coleta e plaqueamento do meio de cultura com uso da mesma técnica.

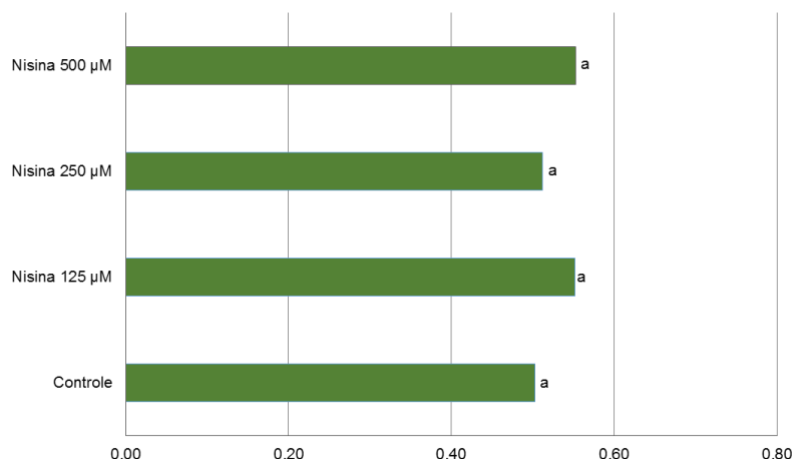
A análise dos dados foi realizada considerando a relação entre células aderidas/células planctônicas, para minimizar eventuais diferenças relacionadas ao crescimento e permitir melhor identificação da condição que favoreça uma maior adesão do patógeno. Foram executadas três repetições independentes e a existência de diferenças foi avaliada através do teste de Tukey, com significância de 0,05 e auxílio do programa Agroestat.

Resultados

A presença de nisina no meio não alterou significativamente a adesão de células de *Salmonella*, o que sugere uma ineficiência da bacteriocina para controle de biofilmes em condições ideais de crescimento do micro-organismo.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 – Relação células aderidas/células planctônicas de *Salmonella Typhimurium* em poliestireno em caldo TSB incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h.



Legenda: Barras seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, com p de 0,05. Fonte: os autores.

Discussão

As DVA são oriundas da ingestão de alimentos e/ou água contaminados com micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas, e geralmente provocam sintomas entéricos, como náuseas, vômitos, dor de estômago, diarreia e febre, os quais podem requerer cuidados hospitalares (MARINHO et al., 2015; KISSMAN et al., 2022). Existem cerca de 250 patógenos causadores de DVA que contaminam os alimentos durante alguma etapa de seu processo de elaboração, e que são responsáveis por expressivos custos econômicos aos sistemas de saúde e de perda de produtividade dos indivíduos afetados por essas doenças (SOUZA et al., 2021). Somado a isso, a subnotificação dos surtos de DVA dificultam a resolução, prevenção e o controle do problema (BRASIL, 2018; SOUZA et al., 2021).

Apesar do perfil epidemiológico e dos agentes etiológicos no Brasil ainda não serem bem delimitados, *Salmonella spp.* se destaca como uma das principais bactérias envolvidas em DVA (BRASIL, 2010; OLIVEIRA et al., 2010; BRASIL, 2018). Este patógeno já apresenta uma gama de cepas multirresistentes, o que associado à sua ampla difusão na natureza pode favorecer a contaminação (CARDOSO & CARVALHO, 2006).

Dentre outras características, a capacidade de formação de biofilmes é um dos mecanismos que pode contribuir com a sobrevivência da bactéria no ambiente (HUR et al., 2012; O'NEILL, 2014). As células microbianas quando presentes em biofilmes são mais resistentes à remoção por meio de métodos sanitizantes convencionais, o que representa uma preocupação, pois a persistência dessa comunidade microbiana em uma superfície de manipulação de alimentos pode possibilitar a ocorrência de contaminação cruzada, e requerer métodos de remoção mais agressivos (XAVIER et al., 2015).

Neste contexto, a busca por novos compostos com potencial atividade antimicrobiana e anti-biofilme tem despertado cada vez mais interesse na comunidade científica (FRENCH, 2008; OPAS, 2016). Dentre as novas estratégias de conservação, a adição de nisina tem se mostrado promissora, por apresentar ausência de toxicidade contra células eucarióticas, potencial antimicrobiano contra diversas bactérias, especialmente as Gram-positivas, e por exercer pouquíssima influência sobre as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (SILVA et al., 2014; MATTE, 2015; KRYSHEN, 2016).

Tendo em vista a aplicabilidade já demonstrada por diversos estudos de nisina como conservante de alimentos, torna-se importante avaliar o potencial anti-biofilme desta bacteriocina (SCHULZ et al., 2009; KRUGER, 2006; CANO SERNA et al., 2019; QUICHABA, 2021). Os dados demonstram que sob condições ótimas de incubação, nisina não alterou significativamente a formação de biofilmes de *Salmonella* (Figura 1). Estes resultados são similares aos de Mahdavi et al. (2009), que avaliaram o efeito de nisina sobre biofilmes de *S. aureus*, *Salmonella Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*. Este

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

estudo sinaliza que a aplicação de nisina não interrompeu ou reduziu os biofilmes já estabelecidos, mas interferiu em seu crescimento durante as etapas de formação. Possivelmente esta atividade esteja relacionada ao mecanismo de ação de nisina, que envolve a formação de poros na membrana citoplasmática (SCHULZ et al., 2009; ALVES, 2018). Assim, as células estariam mais expostas durante o processo de formação do biofilme, em que ainda não estariam protegidas pela matriz de EPS, tendo assim maior contato da bacteriocina com os organismos alvo, o que culminaria com um menor crescimento do biofilme (MAHDAVI et al., 2009; KIM et al., 2019).

Embora os dados não tenham revelado atividade anti-biofilme de nisina é importante continuidade dos estudos relacionados a esta temática, especialmente em outras condições de incubação, onde efeitos diversos poderão ser observados.

Conclusão

A aplicação de nisina nas diferentes concentrações testadas não apresentou resultados significativos de atividade anti-biofilme. Entretanto, faz-se necessário mais estudos voltados para essa temática, dada as diversas possibilidades de condição de aplicação da bacteriocina e os resultados promissores de nisina como bioconservante de alimentos.

Referências

ALVES, Fernanda Cristina Bergamo. Mecanismos de ação da atividade antibacteriana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*. 2018.

AMORIM-CARMO, Bruno et al. Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of analogs from the scorpion peptide stigmurin. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 623, 2019.

BERGAMO, Greici et al. Formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, p. e-48029, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2018). Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2020). Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2020.pdf>.

CANO SERNA, D., et al. Nisina como conservante de alimentos: revisão sistemática da literatura. **Hechos Microbiológicos**, [S. l.], v. 6, n. 1-2, p. 52–64, 2019.

DALLA COSTA, Karine Angélica et al. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75-82, 2016.

DE ALMEIDA, Jhenyfer Caroliny; DE ALMEIDA, Priscilla Prates; GHERARDI, Sandra Regina Marcolino. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutr. Time**, v. 17, n. 01, p. 8623-8633, 2020.

DE MELO, Nathália Ramos; GONÇALVES, Maria Paula Junqueira C.; SOARES, Nilda de Fátima Ferreira. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 304, 2005.

FISCHER, G. A. Drug resistance in clinical oncology and hematology introduction. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 9, n. 2, p. 11-14, 1995.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

LARANJA, Daniela Comparsi. Atividade antimicrobiana da nisina em presunto cozido sobre *Listeria monocytogenes* e bactérias ácido lácticas. **Dissertação Mestrado**. UFRGS. 2016.

KIM, Sunghwan et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D1102-D1109, 2019.

KRUGER, Monika Francisca. Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina. 2006. **Tese de Doutorado** - Universidade de São Paulo.

KRYSHEN, Alina. Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais e nisina. **Tese de Doutorado**. 2016.

KISSMANN, Kristian Emanuel et al. Percepção de consumidores sobre doenças veiculadas por alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, p. e2021123, 2022.

MALACRIDA, Amanda Milene; DIAS, Victor Hugo Cortez; DE LIMA, Camila Lehmckuhl. Perfil epidemiológico das doenças bacterianas transmitidas por alimentos no Brasil. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 4, p. 158-162, 2017.

MAHDAVI, M.; JALALI, M.; KERMANSHAHI, R. Kasra. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 2009.

MATTE, Bibiana Franzen. Análise do papel do peptídeo antimicrobiano nisina sobre a migração de linhagens celulares. 2015.

MENDONÇA, E. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

MORAES, D. M. C. Investigação bacteriológica e molecular de *Salmonella* Sp. Em granjas de postura comercial. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ). Goiânia, 2014.

MORETTO Olivier et al. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157: H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4557-4559, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE et al. Estimativa da ocorrência de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos: atualização de 2019 . Organização Mundial da Saúde, 2019.

QUICHABA, Michely Bião. Avaliação da atividade antibacteriana de nisina e nanopartículas de curcumina frente a bactérias de interesse em alimentos. 2021. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2021.

RIBEIRO, Aldemir Reginato e cols. *Salmonella* spp. em partes cruas de frangos de corte: ocorrência, perfil de resistência antimicrobiana e fagotipagem de isolados de *Salmonella* Enteritidis. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 38, p. 296-299, 2007.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

RODRIGUES, C. F. Pesquisa de coliformes e salmonella spp. em ovos comercializados em feira livre, no município de Espigão do Oeste – Rondônia. **Dissertação (Mestrado)**. São Paulo, 2016.

SANTOS, E. A. Implantação de Ferramentas de Gestão da Qualidade dos Alimentos em uma Unidade de Alimentação e Nutrição Institucional: um estudo de caso. 161 f. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto Federal do Triângulo Mineiro, UBERABA –MG.(2014).

SARAIVA FILHO, Daniel Eugenio et al. Compostos químicos isolados de extratos e óleos essenciais do gênero *Zanthoxylum* Linnaeus (Rutaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Hoehnea**, v. 47, 2020.

SIBHAT, B. et al. Sorovares de Salmonella e perfis de resistência antimicrobiana em gado de corte, pessoal de matadouro e ambiente de matadouro na Etiópia. **Zoonoses e saúde pública**, v. 58, n. 2, pág. 102-109, 2011.

SILVA, Daniela Filipa Almeida. Streptococcus orais: perfil de resistência antimicrobiana. 2018.

SILVA, Antônia Jhanyelle Hilario da et al. Salmonella spp. um agente patogênico veiculado em alimentos. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica (EEDIC)**, [S.l.], v. 5, n. 1, mar. 2019.

SILVA, C. G. F. Atividade de nisina sobre a viabilidade de Salmonella Typhimurium in vitro e em suco de laranja refrigerado; **Trabalho de Conclusão de Curso** - Universidade Federal do Oeste da Bahia; 2019.

SOUZA, Jaqueline Freitas; SOUZA, Antonio Carlos Freitas; COSTA, Francisca Neide. Estudo retrospectivo de surtos de doenças veiculadas por alimentos, na região nordeste e Estado do Maranhão, no período de 2007 a 2019. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1,, 2021.

SCHULZ et al. Bacteriocinas: Mecanismos de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.14, n.2, p. 229-235, 2009.

XAVIER, João B.; PICIOREANU, Cristian; VAN LOOSDRECHT, Mark CM. Uma estrutura para modelagem multidimensional da atividade e estrutura de biofilmes multiespécies. **Microbiologia ambiental**, v. 7, n. 8, pág. 1085-1103, 2005.