

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ESPORICIDADE PAPAÍNA E BROMELINA EM *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Ariane Mendes Fogatti (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Benício Alves de Abreu Filho (Orientador), e-mail: ra110053@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**Área e sub-área:** Ciências Agrárias e Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Palavras-chave:** *Alicyclobacillus*, bromelina, papaína.

### Resumo:

O objetivo deste projeto foi avaliar a atividade antibacteriana de papaína e bromelina em combate às células vegetativas e esporuladas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Os resultados mostraram que as enzimas bromelina, papaína e a combinação de papaína+bromelina apresentaram halo de inibição no crescimento da bactéria, com diâmetros médios entre 2 mm a 3 mm. A concentração inibitória mínima (CIM) da papaína foi de 3,90 µg/mL, a concentração bactericida mínima (CBM) foi de 7,81 µg/mL e a concentração esporicida mínima (CEM) de 1,95 µg/mL. Para bromelina tanto a CIM e CBM foi de 62,5 µg/mL, e, a mesma não apresentou atividade esporicida. Já para a combinação de ambas as enzimas a CIM foi de 3,90 µg/mL, 7,81 µg/mL para a CBM e 3,90 µg/mL para CEM. Conclui-se que ambas as enzimas possuem atividade antibacteriana frente às células vegetativas. No entanto, somente a papaína e a combinação de ambas apresentaram atividade esporicida. Logo, é possível inibir o crescimento das células vegetativas e esporuladas aplicando o uso das enzimas proteolíticas.

### Introdução

*Alicyclobacillus* spp. são bacilos Gram-positivos, termófilos (crescem a temperaturas altas), acidófilos (se desenvolvem em pH ácido), não patogênicos e formadoras de esporos. Dentre as espécies desse gênero, *A. acidoterrestris* é a mais relevante, devido a sua capacidade de produzir os compostos responsáveis pela deterioração dos produtos, como o guaiacol (2-metoxifenol) e o 2,6-dibromofenol (ANJOS, et. al., 2016).

Esse microrganismo está frequentemente associado a deterioração de sucos de frutas, chás, isotônicos e outros produtos derivados de citros, dando a eles um odor e sabor descrito como “semelhante a desinfetante”, podendo, portanto, causar prejuízos ao setor industrial. No entanto, métodos de pasteurização convencionais não costumam ser eficazes contra *Alicyclobacillus* devido a sua resistência a altas temperaturas, o que justifica a pesquisa de métodos alternativos de controle dessa bactéria (STEYN, et.al., 2010). A papaína e a bromelina são amplamente utilizadas

na alimentação, medicina, indústrias farmacêuticas e em procedimentos técnicos para clínicas e testes laboratoriais (HALE et al., 2005).

Assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar a atividade antibacteriana de papaína e bromelina em combate às células vegetativas e esporuladas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

## Materiais e Métodos

*Cepa utilizada: Alicyclobacillus acidoterrestris* (CBMAI 0244<sup>T</sup>).

*Cultivo microbiano:* Para o cultivo das cepas de *Alicyclobacillus* sp., foi utilizado meio de cultura BAT (*Bacillus acidoterrestris*) com pH ajustado para 4,0 e incubadas durante 24 h a 45 °C.

*Preparo do inóculo microbiano:* Para padronização do inóculo de *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup> utilizado nas análises, os microrganismos foram ativados em caldo BAT e incubados por 24 h a 45 °C e então preparou-se a suspensão bacteriana em solução salina 0,85% até uma turbidez padronizada em 0,5 da escala de McFarland que contém cerca de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. A seguir, realizou-se a diluição 1:10 em salina a 0,85%, a fim de obter uma suspensão bacteriana com concentração de  $10^7$  UFC/mL pois após a adição da suspensão nos poços da microplaca com meio de cultura, a concentração final será de aproximadamente  $10^4$  UFC/ mL.

*Preparo dos esporos:* o inóculo foi cultivado em placas de Petri contendo Caldo BAT e incubado à 45 °C por 120 h para a formação de esporos, até que 80% da esporulação fosse alcançada. O índice de esporulação foi avaliado por contagem direta usando um microscópio de contraste de fase. Posteriormente, transferiu-se os esporos para microtubos, centrifugados à 9.500 rpm por 3 min, e então enxaguado em água deionizada estéril três vezes. Diluição serial foi realizada, seguida por choque térmico em banho quente à 80 °C por 10 min para contar as células viáveis da suspensão de esporos, usando o método da placa espalhada para determinar a unidade formadora de colônia (UFC)/mL. Os esporos foram então ressuspensos em 1,0 mL de água destilada estéril e armazenada a 4 °C.

*Teste de sensibilidade das enzimas:* utilizou-se a técnica de difusão em Ágar, onde as amostras foram ativadas em caldo BAT por 24h à 45 °C, então isoladas em placas com meio de cultura solidificado. Para o preparo do inóculo foi feita uma suspensão direta das colônias isoladas em salina 0,85% com turbidez padronizada em 0,5 McFarland. A seguir utilizou-se um swab estéril para coletar amostra de cada tubo para semeadura nos meios de cultura Ágar BAT para então serem aplicados os discos de papel esterilizados já embebidos com 20µL do sobrenadante contendo enzimas a ser testada. Por fim as placas permaneceram em incubação a 45 °C por 24 h, juntamente com o controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM):** para as enzimas que apresentaram halo de inibição no teste de sensibilidade às enzimas. A CIM é realizada através de diluições em microplacas de 96 poços (TPP®). O volume final de cada poço é de 100 µL (caldo BAT mais metabólito), além de 5 µL do inóculo microbiano contendo as células vegetativas de *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup>. O controle negativo continha apenas o meio de cultura e o positivo, o meio e o inóculo. As placas foram incubadas a 45 °C por 24 h. Em seguida foram submetidos aos ensaios de CBM, em que são colocadas 20 µL de cada poço da placa de CIM em uma placa de Petri com meio solidificado para verificar se há crescimento bacteriano após incubação a 45 °C por 24 h.

**Obtenção da concentração esporicida mínima (CEM):** para a realização da CEM, o processo é semelhante com o citado acima, no entanto, realizou-se o choque térmico em 5 µL da suspensão de esporos à 80 °C por 10 minutos, e, com a alça de Drigalski espalhou-se os 5 µL na placa contendo meio sólido BAT, a qual foi incubada por 24h à 45 °C. Repetiu-se as etapas citadas anteriormente e antes que a placa fosse incubada, a mesma foi embrulhada em saco plástico estéril e vedada para posterior choque térmico em banho maria à 80 °C por 10 minutos, e então incubada por 24 h à 45 °C. A partir dessas microplacas utilizou-se 20 µL (em triplicata) para fazer o microcultivo em placas de Petri com meio solidificado, de forma a obter a CEM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo após 24 h de sua incubação à 45 °C.

## Resultados e Discussão

No presente estudo, foi investigado o potencial antimicrobiano das enzimas bromelina e papaína frente a amostra de *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup>. Os extratos preparados com papaína, bromelina e a combinação de papaína+bromelina apresentaram bioatividade na cepa microbiana de *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup>. Ambas as enzimas e a combinação de papaína+bromelina apresentaram halo de inibição no crescimento de *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup>. Sendo que para bromelina o diâmetro médio foi de 2 mm, para papaína 3 mm e para combinação de ambas as enzimas foi de 3 mm.

Já para as análises CIM e CBM, encontrou-se a atividade antimicrobiana dos extratos de papaína, bromelina e a combinação de papaína + bromelina. Sendo os resultados para papaína de 3,90 µg/mL (CIM) e 7,81 µg/mL (CBM), para bromelina 62,5 µg/mL (CIM e CBM), e, para combinação de papaína+bromelina 3,90 µg/mL (CIM) e 7,81 µg/mL (CBM).

Os ensaios da papaína e da combinação das enzimas apresentaram resultados semelhantes e superiores em relação ao extrato de bromelina. Isso porque, é necessário maior concentração do extrato de bromelina para inibir o crescimento de *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup>. Os resultados encontram-se semelhantes com os encontrados por Anjos (2016) que mostraram que para a espécie *A. acidoterrestris* 0244<sup>T</sup>, a CIM da papaína foi de 0,98 µg/mL e a CBM foi de 3,91 µg/mL. Para a bromelina, a CIM foi de 62,5 µg/mL e a CBM foi de 250 µg/mL.

Já nas análises CIM e CEM, os extratos demonstraram atividade esporicidas, sendo que para papaína encontrou-se 1,95 µg/mL (CIM e CEM), e, para combinação de ambas as enzimas 1,95 µg/mL (CIM) e 3,90 µg/mL (CEM).

O extrato de papaína apresentou melhores resultados em comparação com os demais, o mesmo foi capaz de inibir o crescimento dos esporos até uma concentração de 1,95 µg/mL de extrato, a combinação de ambas também foi capaz de inibir a germinação dos esporos, no entanto, foi necessária uma concentração maior do extrato. Já no caso do extrato de bromelina, o mesmo foi capaz de inibir o crescimento dos esporos à uma concentração de 31,25 µg/mL, mas não foi possível eliminar o mesmo na análise de CEM.

O resultado da bromelina pode ser explicado que o choque térmico realizado interferiu na atividade da enzima, onde a mesma pode ter sido desnaturada por influência do banho maria à 80 °C. O controle de temperatura durante todo o processo da bromelina é um fator de extrema importância, pois a temperatura interfere diretamente na atividade final da enzima precipitada (KILIKIAN & PESSOA, 2020).

## Conclusões

Conclui-se, portanto, que ambas as enzimas apresentaram potencial antimicrobiano em *A. acidoterrestris*, no entanto a enzima papaína apresentou-se mais eficaz em todas as análises e também apresentou potencial esporicida, mostrando ser uma alternativa natural para inibição de *A. acidoterrestris*.

## Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, ao CNPq e à Fundação Araucária pelo financiamento, ao meu orientador professor Dr. Benício Alves de Abreu Filho e a toda a equipe do Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos sem as quais esse trabalho não seria possível.

## Referências

ANJOS, M. M., DA SILVA, A. A., PASCOLI I. C., MIKCHA J. M. G., MACHINSKI M., PERALTA R. M., FILHO B. A. A., Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp., **International Journal of Food Microbiology**, Volume 216, p. 121-126, 2016.

HALE, Laura P. et al. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International immunopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 783-793, 2005.

Kilikian, B. V., & Pessoa Jr, A. Purificação de Produtos Biotecnológicos: Operações e processos com aplicação industrial. **Editora Blucher**, 2020.

31º Encontro Anual de Iniciação Científica  
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de  
**2022**

STEYN, C., CAMERON, M. & WITTHUHN, C., Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. **International journal of food microbiology**. 147. 1-11, 2011.