# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE BACTERIOCINAS PROMISSORES CONSERVANTES DE ALIMENTOS

JOÃO V. C. CONSTANTINI[1] , SAULO S. GARRIDO[2], ALINE B. S. VAZ[1]

[1]Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Araraquara, Uniara, Araraquara - SP. [2]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química - UNESP, Araraquara - SP.
Contato: joao.vitorcc@hotmail.com

**Resumo:** As leucocinas são peptídeos antimicrobianos, sintetizados no ribossomo de bactérias láticas do gênero *Leuconostoc sp.* que são capazes de inibir microrganismos patogênicos e indicadores higiênico sanitários. Este trabalho tem como objetivo central, avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos derivados das leucocinas. O análogo LeuB, apresentou maior porcentagem de inibição para *Escherichia coli* O157:H7 (69%) e *Salmonella sorovar Typhimurium* (71%) evidenciando ação bacteriostática, podendo ser eficiente para aumentar a vida de prateleira dos alimentos. O análogo LeuA1 apresentou propriedade antioxidante de 406 µMol em equivalentes de Trolox o que corresponde a 24% de capacidade redutora
**Palavras Chave:** Leucocinas, Leuconostoc sp, Escherichia coli O157:H7 e Salmonella sorovar Typhimurium.

## Antimicrobial and antioxidant activity of antimicrobial peptides derived from promising bacteriocin food preservatives

**Abstract:** Leucocins are antimicrobial peptides, synthesized in the ribosome of lactic bacteria of the genus *Leuconostoc sp*, which are capable of inhibiting pathogenic microorganisms and hygienic sanitary indicators. This work aims to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of peptides derived from leucocins. The LeuB analogue presented a higher percentage of inhibition for *Escherichia coli* O157: H7 (69%) and *Salmonella serovar Typhimurium* (71%) showing bacteriostatic action, being able to be efficient to increase shelf life of foods. The LeuA1 analog had antioxidant properties of 406 µMol in Trolox equivalents corresponding to 24% reduction capacity
**Keywords:** Leucocins, Leuconostoc sp, Escherichia coli O157:H7 e Salmonella sorovar Typhimurium

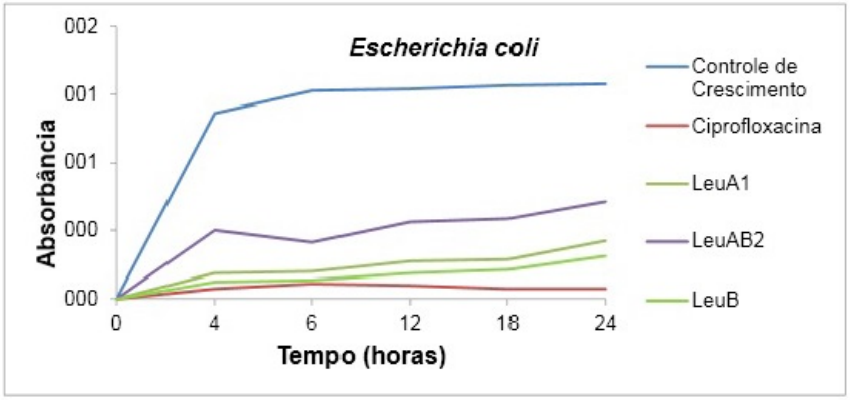
**Introdução:** Os estudos envolvendo bacteriocinas começaram em 1925 com Gratia, pesquisador que fez a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli*. Devido ao seu potencial de aplicação como conservante natural, um elevado número de bacteriocinas têm sido identificadas e caracterizadas, principalmente aquelas produzidas por bactérias lácticas (LEWUS, 1991). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizadas no ribossomo da maioria das bactérias e que têm a capacidade de inibir o crescimento de outras bactérias. Possuem diversas estruturas químicas e o seu papel na imunidade inata é essencial. Sabe-se, também, que em uma única bactéria, podem ser produzidos diversos peptídeos com estas características. Há um grande interesse por parte da indústria sobre o potencial de utilização das bacteriocinas como conservantes de alimentos, os quais apresentam mecanismos de ação específicos e alternativos aos agentes químicos (RODRIGUES, 2010). A possibilidade de aplicação dos peptídeos antimicrobianos, como conservantes de alimentos, nos motivou a explorar o potencial antimicrobiano e antioxidante das leuconinas, bacteriocinas produzidas pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. Diante deste cenário, que reforça a importância de novas tecnologias para a área de conservação de alimentos, no ano de 2016 foi concedida e depositada a patente, do referido projeto de pesquisa junto a INPI sob o Número do Processo: BR 10 2017 004956 6

**Material e Métodos:** Foram sintetizados três peptídeos LeuB, LeuA e LeuA1 baseados nas sequências peptídicas de Leucocinas A- e B-TA33a, proposta por PAPATHANASOPOULOS et al. (1998) e foram sintetizados pelo método de síntese em fase sólida (Céspedes, 2009). A purificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A. Após o procedimento de purificação, realizou-se a caracterização das moléculas por meio de espectrometria de massas. Para avaliação da inibição efetiva do PAM, contra as bactérias *Salmonella sorovar Typhimurium* (ATCC 6539) e *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), foi feito um ensaio de microdiluição em placas (CLSI, 2006) e o ensaio Time-Kill in vitro (NCCLS, 1999), para verificar se os análogos apresentam ação bactericida ou bacteriostática. A atividade antioxidante foi determinada usando o método do radical ABTS (MANN et al., 2015).

**Resultado e Discussão:** Os testes de inibição de crescimento bacteriano são indicados para avaliar a ação dos análogos nos microrganismos, que possam contribuir para um processo de contaminação do alimento. Observa-se que houve uma ação antimicrobiana elevada, havendo diferença significativa para todas as concentrações que foram testadas (50, 100, 150 e 200 µg/ml). Para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella Typhimurium*, é possível observar que o peptídeo LeuB apresentou maior atividade antimicrobiana, inibindo 69% e 71%, dos microrganismos viáveis respectivamente, na maior concentração utilizada. As bacteriocinas podem apresentar ação bactericida ou bacteriostática sobre as bactérias, em virtude disso, foi realizado o ensaio "Time Kill". Observa-se que os valores de absorbâncias, nos ensaios realizados com as bactérias Gram-negativas, *Escherihia coli* O157:H7 e *Salmonella sorovar Typhimurium* permaneceram constante até o final do tempo de amostragem, evidenciando ação bacteriostática, LeuA1, LeuAB2 e LeuB (Gráficos 1 e 2), podendo ser eficiente para aumentar a vida de prateleira dos alimentos. O análogo LeuA1 apresentou propriedade antioxidante de 406 µMol em equivalentes de Trolox o que corresponde a 24% de capacidade redutora. Sendo assim, esse análogo pode impedir a oxidação de óleos e gorduras durante o processamento e estocagem de

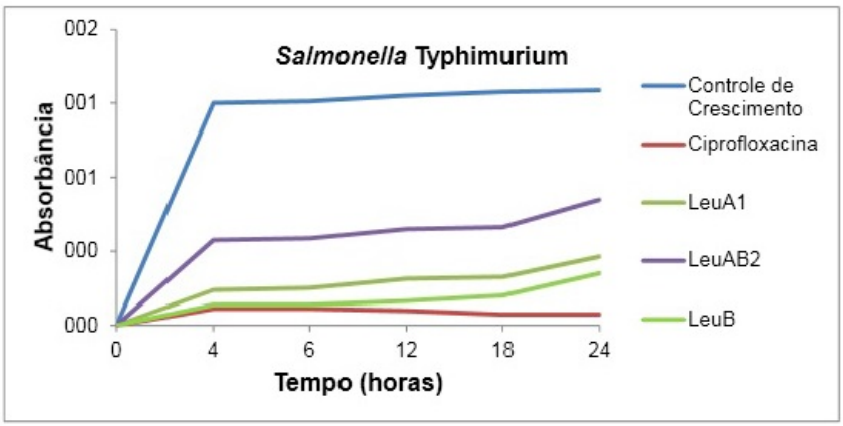
produtos alimentícios, que é uma das causas de deterioração no sabor, textura, valor nutricional e vida útil, levando à produção de toxinas (DONG et al., 2010)

**Gráfico 1.** Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente *Escherichia coli* O157:H7 pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *Escherichia coli* O157:H7; ciprofloxacina (100µg/mL)].




**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Gráfico 2.** Atividade antibacteriana dos análogos peptídicos LeuA1, LeuAB2 e LeuB (400 µg/ml) frente *Salmonella* Typhimurium pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *Salmonella* Typhimurium; ciprofloxacina (100 µg/ml)].




**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Conclusão:** Os peptídeos estudados apresentaram atividade antimicrobiana e bacteriostática satisfatórias e o análogo LeuA1, por apresentar propriedade antioxidante, poderá suprir a deterioração oxidativa em alimentos. Pretende-se realizar estudos futuros mais aprofundados para elucidar outros mecanismos de ação e ação sinérgica, ampliando o espectro de ação destes análogos das bacteriocinas.

**Referências Bibliográficas:** CLSI – **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Appoved guideline - CLSI document M27- A7, v. 26, n. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.DONG, X. P.; ZHUINFFLA, B. W.; ZHAO, H. X.; ZHOU, D. Y.; WU, H. T.; YANG, J. F.; LI, D. M.; MURATA, Y. Preparation and in vitro antioxidante activity of enzymatic hydrolisates from oyster (Crassostrea talienwhannensis) meat. **International Journal of Food Science and Techonology**, v. 45, p. 978-984, 2010.LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied Environment Microbiology**, v. 57, n.6, p. 1683-1688, 1991.NCCLS- **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999. PAPATHANASOPOULOS, M.A.; DYKES, G.A.; REVOL-JUNELLES, A.M.; DELFOUR, A.; VON HOLY, A.; HASTINGS, J.W. Sequence and structural relationships of leucocins A-, B- and C-TA33a from Leuconostoc mesenteroides TA33a. **Microbiology**, v. 144, p. 1343-1348, 1998. Rodrigues, T. T. **Revisão bibliográfica da utilização de bacteriocinas como conservantes alimentícios na última década**. 53 f. Monografia de conclusão de curso (Graduação em farmácia) – Unochapecó, Chapecó. 2010.WAN, X.; SARIS, P. E. J.; TAKALA, T. M. Genetic characterization and expression of leucocin B, a class IId bacteriocin from Leuconostoc carnosum 4010. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 6, p. 494-503, 2015