

# REVISTA DESAFIOS

ISSN: 2359-3652

## **ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS**

*ENZYMATIC ACTIVITY AND EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF BEEF JERKY SPOILAGE HALOARCHAEA TO ORGANIC ACIDS*

*ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA HALOARQUEA DEL DETERIORO DE LA CECINA A LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS*

**Aloisio Freitas Chagas Junior\*<sup>1</sup>, Eduardo Henrique Santos Guedes<sup>2</sup>, Albert Lennon Lima Martins<sup>3</sup>, Lillian França Borges Chagas<sup>1</sup>, Leticia Bezerra de Almeida<sup>1</sup>, Gabriel Soares Nobrega<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Agromicrobiologia Aplicada e Biotecnologia (PPGPV/UFT), Curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Agromicrobiologia Aplicada e Biotecnologia (PPGPV/UFT), Curso de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brasil

<sup>3</sup>Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Tocantins, Palmas, TO, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Agromicrobiologia Aplicada e Biotecnologia (PPGPV/UFT), Mestrado em Produção Vegetal (PPGPV/UFT), Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brasil

Aprovado em 12 /2023 publicado em 29/12/2024.

### **RESUMO**

Este estudo teve por objetivo estimar-se a produção de exoenzimashidrolíticas e avaliar a sensibilidade de duas cepas de haloarchaea deteriorantes isoladas a partir do charque em relação a conservantes ácidos orgânicos (lático, cítrico e glucona-delta-lactona). Quanto à produção de amilase, celulase, lipase, gelatinase e caseinase, utilizou-se meios sólidos específicos com incubação a 37 °C no período de 15 dias e após observou-se o Índice Enzimático (IE), e para avaliar a suscetibilidade das cepas deteriorantes aos devidos ácidos utilizou-se a técnica de disco difuso em ágar (método de Kirby-Bauer) com diferentes ácidos variando suas concentrações de 0,5 a 5% diluídos em salmoura a 20% de NaCl. Os resultados dos ensaios enzimáticos mostram que as duas cepas foram negativas

## Chagas Junior et al, 2023\_ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

quando a produção das exoenzimas, exceto a cepa V22 que apresentou um bom IE (4,5) para produção de gelatinase. Em relação a sensibilidade dos ácidos orgânicos testados observou-se que em geral a utilização da concentração a partir de 2,5% pode ser utilizada para aumentar a vida útil do charque, mas que os ácidos lácticos e cítrico apresentaram maiores valores significativos em relação a inibição do crescimento das cepas testadas *in vitro* nas diferentes concentrações.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática; Ácidos; Haloarchaea; Sensibilidade.

### **ABSTRACT**

This study aimed to estimate the production of hydrolytic exoenzymes and to evaluate the sensitivity of two spoilage haloarchaea strains isolated from jerked beef in relation to organic acid preservatives (lactic, citric and gluconic-delta-lactone). Amylase, cellulase, lipase, gelatinase and caseinase, specific solid media were used with incubation at 37 °C for a period of 15 days and after the Enzymatic Index (EI) was observed and to evaluate the susceptibility of the deteriorating strains to the due acids used the technique of diffuse disk in agar was used (Kirby-Bauer method) with different acids varying their concentrations from 0.5 to 5% diluted in brine to 20% of NaCl. The results of the enzymatic assays show that both strains were negative when producing exoenzymes, except for the V22 strain that showed a good IE (4.5) for gelatinase production. Regarding the sensitivity of the organic acids tested, it was observed that, in general, the use of a concentration from 2,5% can be used to increase the shelf life of the jerky, but that lactic and citric acids presented higher significant values in relation to the inhibition of growth of the strains tested *in vitro* at different concentrations.

**Keywords:** Enzymatic activity; Acids; Haloarchaea; Sensitivity.

### **RESUMEN**

Este estudio tuvo como objetivo estimar la producción de exoenzimas hidrolíticas y evaluar la sensibilidad de dos cepas de haloarchaea de deterioro aisladas de carne seca en relación con los conservantes de ácidos orgánicos (láctico, cítrico y gluconato-delta-lactona). En cuanto a la producción de amilasa, celulasa, lipasa, gelatinasa y caseinasa, se utilizaron medios sólidos específicos con incubación a 37 °C durante 15 días, luego de lo cual se observó el Índice Enzimático (IE), y para evaluar la susceptibilidad de las cepas al deterioro. a los ácidos debidos se utilizó la técnica de disco difuso en agar (método Kirby-Bauer) con diferentes ácidos variando sus concentraciones desde 0.5 a 5% diluidos en salmuera hasta 20% de NaCl. Los resultados de los ensayos enzimáticos muestran que ambas cepas fueron negativas a la hora de producir exoenzimas, excepto la cepa V22 que mostró un buen IE (4,5) para la producción de gelatinasa. En cuanto a la sensibilidad de los ácidos orgánicos ensayados, se observó que, en general, el uso de una concentración a partir del 2,5% puede ser útil

# Chagas Junior et al, 2023 -ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

para aumentar la vida útil de la cecina, pero que los ácidos láctico y cítrico presentaron valores significativos superiores en relación con la inhibición del crecimiento de las cepas probadas in vitro a diferentes concentraciones.

**Descriptor:** Ácidos; Actividad enzimática; Haloarquea; Sensibilidad.

## INTRODUÇÃO

Adaptados às altas concentrações de sal, os halófilos extremos necessitam de no mínimo 1,5 M (9%), mas em concentrações de 2 a 4 M de NaCl (12-23%) são valores ótimos para seu crescimento, entretanto algumas espécies são capazes de crescer em 5,5 M de NaCl, destacando-se os organismos pertencentes ao domínio archaea pois são únicos a se desenvolverem em ambientes extremos de salinidade como lagoas, bacias submarinas, desertos de sal, e em salinas solares construídas pelo homem para a exploração comercial de sal para uso alimentício (TORTORA *et al.*, 2017; GHANMI *et al.*, 2020; MADIGAN *et al.*, 2016).

Assim quando o sal não estéril é utilizado para conservar produtos alimentícios como carnes secas, pode haver o desenvolvimento dos halófilos acarretando diversos problemas de deterioração que comumente é conhecida e caracterizada pelo aparecimento de colônias pigmentadas de vermelho à rosa e por apresentarem enzimas proteolíticas produzindo odores e aromas nesses produtos (MOSCHETTI *et al.*, 2006).

Por ser fortemente proteolítica e conseguir sobreviver em ambientes com altas concentrações salinas, o charque quando contaminado pode sofrer alterações indesejadas por esses organismos que produzem limosidade e odor extremamente desagradável. A principal técnica utilizada para conservação do charque frente a archaeahalófilas é a utilização do envase a vácuo, visto que tais microrganismos são aeróbicos, entretanto qualquer deficiência na embalagem e porventura as concentrações de oxigênio aumentarem possivelmente ocorrerá seu desenvolvimento (PENHA, 2017; SINGH e SINGH, 2018).

Deste modo, Lin *et al.* (2018) relatam que o estudo do emprego de ácidos orgânicos em produtos cárneos salgados, como antimicrobianos veem sendo largamente pesquisado com a finalidade de inibir a proliferação de deteriorantes e patogênicos para aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios. Para charque uma nova barreira (teoria dosobstáculos) ficou autorizado que é a utilização de aditivos intencionais com acidulante pela sua Instrução Normativa nº 92, de 18 de setembro de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que até então era proibido o uso. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 272, de 14 de março de 2019 da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) para industrializados secos são permitidos o uso de

## Chagas Junior et al, 2023\_ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

acidulantes como ácido lático, ácido cítrico e glucona-delta-lactona (GDL) tendo como limite máximo *quantum satis*, assim para o charque não há estudo quanti-qualitativos do sucesso do uso desses acidulantes em relação a essas cepas deteriorantes.

Apesar da sua ação deteriorante em produtos cárneos salgados, biotecnologicamente os halófilos podem ter a capacidade de servir como uma extensa gama de substâncias, como suas enzimas, que podem suportar as diversas condições em processos industriais devido à sua estabilidade (AMOOZEGAR *et al.*, 2017; GILL *et al.*, 2021).

Assim como os supracitados, outros pesquisadores como Singh e Singh (2018), Menasria *et al.* (2018), Xuet *et al.* (2019) e Sahliet *et al.* (2020) relatam a produção de enzimas extracelulares hidrolíticas, principalmente proteases, por diversas espécies de archaeahalófilas.

Segundo Gibtanet *et al.* (2017), pesquisas microbiológicas e ecológicas de sais para fins alimentares são necessárias porque podem fornecer informações sobre a dinâmica microbiana correlata entre ambientes hipersalinos e alimentos salgados e fermentados. No entanto, toda a microbiota de sais comerciais ainda permanece obscura. Até onde se sabe, não há estudos sobre a ocorrência e diversidade de comunidades microbianas em sais comerciais no Brasil.

Mediante os fatos explorados acima neste estudo objetivou-se realizar a avaliação da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (exoenzimas) e avaliar a sensibilidade das cepas deteriorantes em relação a conservantes ácidos orgânicos (ácido lático, ácido cítrico e glucona-delta-lactona) em diferentes concentrações em testes *in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Avaliação da atividade enzimática extracelular

Foram utilizadas neste trabalho duas cepas (C11 e V22) de haloarchaea previamente isoladas e estudadas pelos próprios autores (CHAGAS JÚNIOR *et al.* 2022) a partir de charque em estado de deterioração. Antes de realizar os experimentos, as cepas congeladas foram reativadas em ágar MEC pela técnica de estriamento.

O meio MEC era composto por 5 g L<sup>-1</sup> de peptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 200 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 30 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 30 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, e 7 g de KCl, o pH foi ajustado para 7,2. Para meio sólido foi adicionado 17 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Para a avaliação da atividade enzimática extracelular foram utilizados meio MEC com diferentes fontes de carbono requeridas nos ensaios enzimáticos, uma cepa por placa foi inoculada com o uso de palitos de dente estéreis.

## Chagas Junior et al, 2023 -ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

A avaliação da capacidade lipolítica das cepas foi realizada em meio MEC suplementado com 1% de Twen-80 e pH ajustado para 6,0 com ácido acético de acordo com o método de Sierra (1956) e Stamford *et al.* (1998) com modificações. As placas foram incubadas a 37 °C por 15 dias, após esse período as placas com as colônias foram mantidas durante 24 h sob refrigeração para induzir a formação de cristais de cálcio, caracterizado pela presença de halo transparente em volta da colônia

Para avaliar a atividade proteolítica (gelatinase e caseinase) foi utilizado meio MEC com modificações utilizando 1% de gelatina e leite desnatado como fonte de carbono. As placas foram incubadas por 15 dias a 37 °C. A hidrólise de gelatina e caseína foi determinada observando a olho nu a formação de zonas claras em torno das colônias em meio MEC (HOLDING e COLLEE, 1971).

Para avaliar a capacidade aminolítica as cepas foram cultivadas em ágar MEC suplementado com 1% de amido solúvel, incubadas a 37 °C por 15 dias. Após o período de incubação as placas foram tratadas com vapor de iodo para a revelação os halos de hidrólise segundo a metodologia de Kasana (2008).

Os diâmetros dos halos de hidrólise (H) e do crescimento das colônias (C) foram aferidos com auxílio de paquímetro (mm) e os resultados foram dados como Índice Enzimático (IE), que é a relação H/C, segundo proposto por Hankin e Anagnostakis (1975). Assim, quanto maior o índice maior é a atividade enzimática no meio.

### **Teste de sensibilidade a conservantes ácidos orgânicos**

O regulamento técnico de identidade e qualidade publicada em 18 de setembro de 2020, passou a autorizar o uso de aditivos intencionais para charque com as seguintes funções: estabilizantes, acidulantes, regulador de acidez e antioxidante, até então o uso de aditivos em charque era proibido. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 272, de 14 de março de 2019 da ANVISA para industrializados secos são permitidos o uso de acidulantes ácidos láctico, ácido cítrico e glucona-delta-lactona tendo como limite *quantum satis*.

Para avaliar a suscetibilidade das cepas deteriorantes isoladas do charque aos devidos ácidos utilizou-se a técnica de disco difuso em ágar (método de Kirby-Bauer). As cepas halófilas foram crescidas em caldo MEC por 15 dias a 37 °C para a obtenção do pré-inóculo na concentração final 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

Após esse período imergiu-se um *swab* estéril na suspensão do pré-inóculo das cepas, retirando-se o excesso de inóculo através da compressão do *swab* nas paredes do tubo e semeou-se a placa uniformemente em estrias por rotações a cada 60 graus.

A seguir discos de papel filtro de 6 mm foram embebidos com 10 µL das soluções contendo diferentes concentrações dos ácidos a serem testados e após foram colocados sobre a superfície do

## Chagas Junior et al, 2023\_ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

ágar inoculado. Os ácidos (lático, cítrico e glucona-delta-lactona) foram devidamente diluídos em salmoura a 20% de NaCl visando a aplicabilidade deste teste a indústria no qual a solubilização destes podem ser realizados na etapa de elaboração da salmoura. As concentrações variaram de 0,5 a 5%, totalizando 10 ensaios para cada ácido testado.

Foi inserido três disco por placa, um de cada ácido na mesma diluição e a disposição dos discos foi tal que sua distância até a lateral da placa fosse maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição (OSTROSKY, 2008).

Após o período de incubação, a sensibilidade foi baseada na presença de halo de inibição de crescimento, aferida utilizando-se um paquímetro manual para a obtenção das médias do diâmetro de halo de inibição. Para avaliar o potencial dentre os ácidos e a Concentração Mínima Inibitória (CIM), os dados foram analisados por meio da análise de variância (Anova) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância para a comparação de médias usando o programa Sisvar. Os experimentos foram realizados em triplicata e o delineamento experimental foi realizado em blocos inteiramente casualizados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação da atividade enzimática extracelular

Os isolados selecionados foram testados quanto à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, incluindo amilase, celulase protease (caseinase e gelatinase) e lipase. O *screening* em meio sólido para os substratos contendo diferentes fontes de carbono revelou o potencial das cepas em secretar enzimas, sendo que a cepa C11 não produziu nenhuma das enzimas testadas e a cepa V22 produziu apenas a gelatinase, a tabela 1 apresenta os resultados dos valores de I.E das cepas testadas nos diferentes substratos.

**Tabela 1.** Valores de Índice enzimático, média das 3 repetições.

Substrato	I.E das cepas	
	C11	V22
Amilase	-	-
Celulase	-	-
Caseínase	-	-
Gelatinase	-	4,5
Lipase	-	-

(-) Indica resultado negativo para o teste em questão.

Fonte: Elaboração dos próprios autores.

## Chagas Junior et al, 2023 -ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

Como biocatalizadores, atualmente as enzimas microbianas são vastamente utilizadas em diversas áreas industriais pois detém uma especificidade química e contribui para preservação ambiental frente a outros compostos químicos. Neste contexto as enzimas extremófilicas, podem ser a melhor opção para catalisar condições industriais e produzir novos produtos biotecnológicos sob diferentes condições extremas (AMOOZEGAR *et al.*, 2017).

Segundo Lealem e Gashe (1994), apesar de todos os microrganismos produzirem enzimas, nem todos são considerados como bons produtores, deste modo quando o índice enzimático (I.E) é maior ou igual a dois em ensaios em meios sólidos são considerados bons produtores de enzimas extracelulares visto que o I.E é a habilidade do microrganismo em degradar substratos específicos.

A cepa V22 apresentou um bom potencial (I.E de 4,5) em produção e secreção de protease como a gelatinase, enzima que tem como função hidrolisar a gelatina, o colágeno e alguns peptídeos. As proteases com atividade gelatinolítica vem sendo alvo de muitas pesquisas devido a sua aplicabilidade na indústria química, médica e processamento de alimentos, existindo assim uma alta demanda na busca de novas cepas microbianas com novas propriedades para o desenvolvimento principalmente ligados a formulações farmacêuticas (EKPENYONG *et al.*, 2016). Tal potencial proteolítico explica sua forte ligação com a deterioração de produtos cárneos salgados como o charque.

Os microrganismos patogênicos são aqueles que geralmente secretam este tipo de enzimas, logo a busca por espécies microbianas não patogênicas com potencial para a produção em larga escala de gelatinase vem sendo alvo de diversas pesquisadas (BALAN *et al.*, 2012).

Singh e Singh (2018) e Sahliet *al.* (2020) reportam que a maioria das haloarchaea produzem e secretam enzimas proteolítica e que conseqüentemente essas proteínas produzidas são eficientes para catalisar reações sob condições de alto teor de sal, pois são ativas e estáveis em meios salinos, onde geralmente a estrutura e a função de outras enzimas são criticamente afetados levando à precipitação ou desnaturação de outras proteínas não halofílicas, tornando-se adequadas para exploração e aplicações comerciais à base de sal, como molho de peixe, preparações de revestimento anti-incrustante, tratamento de resíduos com alto teor de sal, elaboração de detergentes e indústria de couro.

A capacidade proteolítica das cepas halofílicas é relatada nas pesquisas de Menasria *et al.* (2018), como também a produção de gelatinase e caseinase reportada nos estudos de Hasan e Mohammadian (2011) a partir de cepa isolada de sal do Irã. Sahliet *al.* (2020) relatam que as cepas isoladas de ambientes hipersalinos da Argélia foram capazes de hidrolisar gelatina e Tween-80 (48% e 45% dos isolados, respectivamente), como também a hidrolise do amido foi detectado em 22% das cepas testadas e nenhum deles hidrolisou a caseína.

## Chagas Junior et al, 2023\_ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

A ausência da atividade enzimática conforme explica Vasconcelos *et al.* (2003) pode ser imposta à incapacidade de secreção pelas cepas testadas, seja pela insuficiência dos métodos de detecção utilizados ou pelo direcionamento da produção para o metabolismo intracelular dos microrganismos. Em seu estudo Xu *et al.* (2019) relatam que a espécie *Haloprofundushalophilus* foi incapaz de hidrolisar caseína, gelatina, amido ou Tween 80 o que corrobora com os resultados encontrados para a cepa C11 nesse estudo.

Na literatura é evidente que as haloarchaeas são capazes de utilizar diversos compostos orgânicos como única fonte de carbono e energia e produzir várias enzimas hidrolíticas, todavia ainda há uma escassez de estudos dessas enzimas halofílicas e que ainda não são empregados para processos industriais conforme explica Menasria *et al.* (2018).

As vantagens de se utilizar enzimas halofílicas estão vinculadas principalmente por não precisar de purificação ou esterilização para uso e aplicação, uma vez que proteínas contaminantes indesejadas ou outras biomoléculas são inativas em condições salinas (Amoozegar *et al.*, 2017).

### Determinação da sensibilidade a conservantes ácidos orgânicos

Na avaliação da sensibilidade aos ácidos orgânicos, os resultados de modo geral demonstraram que os três ácidos conseguiram inibir o crescimento das haloarchaea examinadas a partir a concentração 2,5%. Logo considera-se tal valor como uma concentração inibitória mínima (CIM) no qual é a concentração mais baixa de um agente antibacteriano em  $\text{mg L}^{-1}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) que, sob condições *in vitro* estritamente controladas, impede completamente o crescimento viável de uma cepa de teste de um organismo conforme descrito por Kowalska-Krochmal e Dudek-Wicher (2021).

Estes resultados estão de acordo com a literatura conforme descrito por Nascimento (2011) onde descreve que a indústria alimentícia já utiliza ácidos em particular a concentração de 2% visto que tal valor vem apresentando um controle e redução eficaz de patógenos.

Entretanto na comparação da eficiência entre os três ácidos em relação a inibição das cepas foi observado que para a cepa C11 o ácido láctico foi aquele que apresentou a melhor inibição seguido pelo ácido cítrico e para a cepa V22 o ácido cítrico foi o melhor inibidor, seguido pelo láctico. Entretanto na comparação geral a glucona não apresentou resultados significativos quando comparadas com os outros ácidos, conforme é apresentado os resultados das médias dos halos de inibição nas tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados para a análise de variância para cepa C11 e V22 respectivamente.

**Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão do halo de inibição em diferentes concentrações para cepa C11.

Halo de inibição (cm)
-----------------------



Chagas Junior et al, 2023 -ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

Concentração (%)	Lático	Glucona	Cítrico
0,5	1,0±0,216 <sup>a</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>
1,0	1,0 ±0,29 <sup>a</sup>	0,0 ±0,28 <sup>b</sup>	1,0 ±0,28 <sup>a</sup>
1,5	1,0±0,08 <sup>a</sup>	0,0 ±0,08 <sup>b</sup>	1,0 ±0,37 <sup>a</sup>
2,0	1,0±0,21 <sup>a</sup>	0,5 ±0,29 <sup>c</sup>	1,0 ±0,57 <sup>b</sup>
2,5	2,0±0,35 <sup>a</sup>	0,5 ±0,63 <sup>c</sup>	1,0 ±0,63 <sup>b</sup>
3,0	2,0±0,32 <sup>a</sup>	0,5 ±0,24 <sup>b</sup>	2,0 ±0,24 <sup>a</sup>
3,5	2,0±0,16 <sup>a</sup>	1,0 ±0,16 <sup>b</sup>	2,0 ±0,21 <sup>a</sup>
4,0	2,5 ±0,81 <sup>a</sup>	1,0 ±0,40 <sup>b</sup>	2,5 ±0,40 <sup>a</sup>
4,5	3,0 ±0,21 <sup>a</sup>	1,0 ±0,08 <sup>b</sup>	3,0 ±0,14 <sup>a</sup>
5,0	3,5±0,35 <sup>a</sup>	1,5 ±0,57 <sup>b</sup>	3,5 ±0,80 <sup>a</sup>

Médias seguidas com a mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05\%$ ).

Fonte: Elaboração dos próprios autores.

**Tabela 3.** Valores médios e desvio padrão do halo de inibição em diferentes concentrações para cepa V22.

Concentração (%)	Halo de inibição (cm)		
	Lático	Glucona	Cítrico
0,5	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,5 ±0,28 <sup>a</sup>
1,0	0,0 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	0,9 ±0,50 <sup>a</sup>
1,5	0,5±0,14 <sup>b</sup>	0,0 <sup>c</sup>	1,0 ±0,28 <sup>a</sup>
2,0	1,1±0,92 <sup>a</sup>	0,0 <sup>c</sup>	1,0 ±0,24 <sup>b</sup>
2,5	1,0±0,95 <sup>b</sup>	1,2 ±0,08 <sup>a</sup>	1,0 ±0,24 <sup>a</sup>
3,0	1,5±0,21 <sup>b</sup>	1,4 ±0,21 <sup>c</sup>	2,0 ±0,35 <sup>a</sup>
3,5	2,2±0,21 <sup>a</sup>	1,4 ±0,08 <sup>c</sup>	1,5 ±0,24 <sup>b</sup>
4,0	2,2 ±0,28 <sup>b</sup>	1,5 ±0,29 <sup>c</sup>	2,0 ±0,48 <sup>a</sup>
4,5	3,1 ±0,50 <sup>a</sup>	1,8 ±0,08 <sup>c</sup>	2,7 ±0,40 <sup>b</sup>
5,0	3,0 ±0,21 <sup>b</sup>	3,0 ±0,57 <sup>c</sup>	4,0 ±0,80 <sup>a</sup>

Médias seguidas com a mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05\%$ ).

Fonte: Elaboração dos próprios autores.

Rebonatto *et al.* (2018), concernem que a indústria alimentícia vem utilizando bastantes conservantes mais naturais como os diversos tipos de ácidos orgânicos existentes devido a sua a sua rapidez, simplicidade, baixo custo e eficiência, entretanto apesar de difundidos seu emprego se

## Chagas Junior et al, 2023\_ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

mantém restrito a determinados compostos, se observar a variedade de outros antimicrobianos disponíveis.

Por se tratarem de metabólitos primários e/ou secundários de microrganismos ou plantas, o uso de substâncias naturais como os ácidos orgânicos se destacam no prolongamento de vida útil dos produtos alimentícios e garantem segurança, além também de minimizar a oxidação lipídica, reduzir as perdas de cor se tornando grandes aliados na chamada biopreservação (BARCENILLA *et al.*, 2022).

Os ácidos orgânicos como agentes de biopreservação ideais devem apresentar atividade antimicrobiana exclusiva contra organismos deteriorantes ou patogênicos, agindo como parte de uma abordagem da tecnologia de barreiras sendo utilizados estrategicamente com outras barreiras para que possa culminar no sinergismo de uma series de obstáculos indesejáveis para o crescimento microbiano o que garantirá a inocuidade do produto (PISOSCHI *et al.*, 2018).

Estudos na literatura comprovam a eficácia na utilização de ácidos orgânicos na conservação de produtos cárneos, como reportado por Freiburger (2016) que relata que na produção de linguiças curadas cozidas embaladas a vácuo tiveram um aumento na vida útil após serem tratadas com uma mistura de ácidos orgânicos. Reis *et al.* (2018) observaram em seu estudo que a utilização de ácido láctico à 1% foi eficiente provocando menor escurecimento das amostras como também havendo uma redução da contagem de *Escherichia coli* após 14 dias.

Segundo Cramer e Prestegard (1977) a capacidade de inibição dos ácidos está relacionada ao valor do pH do meio que deve ser menor que o pKa do ácido em questão, pois a ação antimicrobiana é atribuída a forma não dissociada do ácido.

Considerado um eficiente antimicrobiano o ácido láctico (ácido fraco) de cadeia curta ( $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$ ), segundo Rebonatto *et al.* (2018), está comumente relacionado ao controle bacteriano, visto que ao observar os resultados obtidos em diversas pesquisa *in vitro* os autores propõem que a indústria realize mais testes *in loco*.

A ação antibacteriana do ácido láctico é atribuída à capacidade de atravessar as membranas celulares, resultando em pH intracelular diminuído e ruptura da força motriz do próton transmembrana, e vem sendo utilizados para reduzir a carga microbiológica em carcaças e, assim, preservar a qualidade da carne fresca (PISOSCHI *et al.*, 2018).

Já o ácido cítrico é geralmente reconhecido como seguro para uso como ingrediente alimentar e é frequentemente usado para inativar patógenos, podendo inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7, *Listeriamonocytogenes* e *Salmonella* spp. e seu efeito antimicrobiano é conferido pela ação de ruptura da membrana, inibição de reações metabólicas essenciais, estresse na homeostase do pH intracelular e acúmulo de ânions tóxicos (JEON e HÁ, 2020).

# Chagas Junior et al, 2023 -ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

Mediante os relatos supracitados é evidente o grande benefício de utilizar-se ácidos orgânicos em produtos alimentícios cárneos como o charque, por serem naturais constituindo uma alternativa aos sintéticos além de poder ter uma maior aceitação pelo consumidor.

## CONCLUSÃO

A cepa C11 não apresentou atividade enzimática frente aos substratos testados, enquanto a cepa V22 apresentou um bom potencial biotecnológico na produção e secreção de gelatinase. Em relação a sensibilidade dos ácidos orgânicos testados observou-se que em geral a utilização da concentração a partir de 2,5% pode ser utilizada para aumentar a vida útil do charque, mas que os ácidos lácticos e cítrico apresentaram maiores valores significativos em relação a inibição do crescimento das cepas testadas *in vitro*.

---

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

---

## REFERÊNCIAS

AMOOZEGAR, M.A.; SIROOSI, M.; ATASHGAHI, S.; SMIDT, H.; VENTOSA, A. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. **Microbiology**. v. 163, n.5, p. 623-645, 2017.

ANTUNES, A.; SIMÕES, M.F.; GRÖTZINGER, S.W.; EPPINGER, J.; BRAGANCA, J.M.; BAJIC, V. Bioprospecting archaea: focus on extreme halophiles. In: *Bioprospecting*. Springer. p. 81-112, 2017.

BALAN, S.S.; NETHAJI, R.; SANKAR, S.; JAYALAKSHMI, S. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp. isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, n. 3, p. S1811-S1816, 2012.

BARCENILLA, C.; DUCIC, M.; LÓPEZ, M.; PRIETO, M.; ÁLVAREZ-ORDÓNEZ. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. **Meat Science**. v. 183, p. 108661, 2022.

BRASIL. Instrução normativa nº 92, de 18 de setembro de 2020. Dispõe Sobre a Identidade e os Requisitos de Qualidade do Charque, da Carne Salgada Curada Dessecada, do Miúdo Salgado Dessecado e do Miúdo Salgado Curado Dessecado. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília, DF, 2020. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-92-de-18-de-setembro-de-2020-278692460>>. Acesso em: 02/08/2021.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diretoria Colegiada**. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <<https://in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>. Acesso em: 21/05/2021.

Chagas Junior et al, 2023\_ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

CRAMER, J.A.; PRESTEGARD, J.H. NMR studies of pH-induced transport of carboxylic acids across phospholipid vesicle membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**.v. 75, n.2, p. 295-301, 1977.

CHAGAS JUNIOR, A.F.C.; GUEDES, E.H.S.; SOARES, C.M.; CUNHA, M.G.; SANTOS, A.L.; AGUIAR, A.O.; MARTINS, A.L.L. Isolation and characterization of halophilic strains from beef jerky. **Research, Society and Development**.v. 11, n. 3, p. e21511326368, 2022.

EKPENYONG, M.; ASITOK, A.; ODEY, A.; ANTAI, S.P. Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia sp.* SLO3. **Nigerian Journal of Biopesticides**.v. 1, p. 70-82, 2016.

FREIBERGER, R.C.D.P. Utilização de ácidos orgânicos como conservantes em linguiças curadas cozidas embaladas a vácuo. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, 2016.

GHANMI, F.; CARRE-MLOUKA, A.; ZARAI, Z.; MEJDOUB, H.; PEDUZZI, J.; MAALEJ, S.; REBUFFAT, S. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* etd5 from the solar saltern of Sfax (Tunisia) produces multiple halocins. **Research in Microbiology**.v. 171, n. 2, p. 80-90, 2020.

GIBTAN, A.; PARK, K.; WOO, M.; SHIN, J.; LEE, D.; SOHN, J.H.; SONG, M.; ROH, S.W.; LEE, S.; LEE, H. Diversity of extremely halophilic archaeal and bacterial communities from commercial salts. **Frontiers in Microbiology**.v. 8, p. 799, 2017.

GILL, R.; KAUR, R.; RANI, N.; KAUR, S. Recent Biotechnological Applications of Archaeal Domain. **Plant-Microbe Dynamics: Recent Advances for Sustainable Agriculture**.v. 1, p. 135, 2021.

HASAN, S.M.; MOHAMMADIAN, J. Isolation and characterization of *Halobacterium salinarum* from saline lakes in Iran. **Jundishapur J Microbiol**.v. 4, p. 59-66, 2011.

HOLDING, A.J.; COLLEE, J.G. Chapter I Routine biochemical tests. In: *Methods in Microbiology*. Academic Press. p. 1-32, 1971.

JEON, M.; HA, J. Synergistic bactericidal effect and mechanism of X-ray irradiation and citric acid combination against food-borne pathogens on spinach leaves. **Food Microbiology**.v. 91, p. 103543, 2020.

KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current Microbiology**.v. 57, n.5, p. 503-507, 2008.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. **Pathogens**.v. 10, n. 2, p. 165, 2021.

LEALEM, F.; GASHE, B.A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied bacteriology**.v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LIN, L.; HU, J.Y.; WU, Y.; CHEN, M.; OU, J.; YAN, W.L. Assessment of the inhibitory effects of sodium nitrite, nisin, potassium sorbate, and sodium lactate on *Staphylococcus aureus* growth and

Chagas Junior et al, 2023 -ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

staphylococcal enterotoxin A production in cooked pork sausage using a predictive growth model. **Food Science and Human Wellness**.v. 7, n. 1, p. 83-90, 2018.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora; 2016.

MENASRIA, T.; AGUILERA, M.; HOCINE, H.; BENAMMAR, L.; AYACHI, A.; BACHIR, A.S.; DEKAK, A.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. **Microbiological Research**.v. 207, p. 289-298, 2018.

MOSCHETTI, G.; APONTE, M.; BLAIOTTA, G.; CASABURI, A.; CHIURAZZI, M.; VENTORINO, V.; VILLANI, F. Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. **Annals of Microbiology**.v. 56, n. 2, p. 119-127, 2006.

NASCIMENTO, E.P.S. Efeito do ácido láctico sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais na carne de sol. **Dissertação (Mestrado Engenharia Química)**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil, p. 104 f, 2011.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v. 18, p. 301-307, 2008.

PENHA, J.C.Q. Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e parasitológica da carne bovina salgada comercializada em estabelecimentos e feiras livres na zona norte do município do Rio de Janeiro. **Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária)**, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p. 114 f, 2017.

PISOSCHI, A.M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUS, V.; OLAH, N.K.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**.v. 143, p. 922-935, 2018.

REBONATTO, B.; RUSCHEL, J.; PRADO, N.V.; HIROOK, E.Y.; MACHADO, A.; HASHIMOTO, E.H. Sinergismo entre ácidos orgânicos e sorbato de potássio no controle de *Aspergillus flavus*. **Segurança Alimentar e Nutricional**.v. 25, n. 3, p. 114-125, 2018.

REIS, H.Z.M.; POZZA, M.S.; OLIVO, P.M.; SANTOS, A.C.; JACOMINI, J.; MADRONA, G.S. Utilização de ácidos orgânicos para a conservação de carnes: alterações físicas e microbiológicas. **Archives of Veterinary Science**.v. 23, n. 3, p. 1-10, 2018.

SAHLI, K.; GOMRI, M.A.; ESCLAPEZ, J.; GÓMEZ-VILLEGAS, P.; GHENNAI, O.; BONETE, M.J.; LEÓN, R.; KHARROUB, K. Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. **Journal of Basic Microbiology**.v. 60, n. 7, p. 624-638, 2020.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 23, n.1, p. 15-22, 1957.

Chagas Junior et al, 2023\_ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS

SINGH, A.; SINGH, A.K. Isolation, characterization and exploring biotechnological potential of halophilic archaea from salterns of western India. **3 Biotech**.v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Food Science and Technology**.v. 18, p. 382-385, 1988.

TORTORA, G.; CASE, C.; FUNKE, B. Doenças microbianas dos sistemas urinário e reprodutor. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VASCONCELOS, W.E.; RIOS, M.S.; SOUSA, A.H.; MEDEIROS, E.V.; SILVA, G.M.C.; MARACAJÁ, P.B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biotecnologia e Ciência da Terra**. Anápolis, GO, Brasil, v.3, p. 18, 2003.

XU, Q.; CUI, H.L.; MENG, F. *Haloprofundushalophilus* sp. nov., isolated from the saline soil of Tarim Basin. **Antonie van Leeuwenhoek**.v. 112, n. 4, p. 553-559, 2019.