

COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA ENTRE NISINA DE PADRÃO FARMACÊUTICO E PADRÃO ALIMENTAR CONTRA BACTÉRIAS DE INTERESSE MÉDICO-ODONTOLÓGICO

Palavras-Chave: Nisina, Peptídeos antimicrobianos, Bactérias

Autores/as:

Maria Eduarda Quintino Costa, FOP, UNICAMP

Murilo Vitor da Silva Pinto, FOP, UNICAMP

Lorena Rebeka Carvalho Simão, FOP, UNICAMP

Renata Ramiro da Silva, FOP, UNICAMP

Larissa Pavanello, FOP, UNICAMP

Iago Torres Cortês de Sousa, FOP, UNICAMP

Prof.^(a) Dr.^(a) Karina Cogo Müller (orientadora) FCF, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A nisina é um peptídeo antimicrobiano que possui origem bacteriana (*Lactococcus lactis*) e cujo mecanismo de ação antibacteriana ocorre pela ruptura da membrana plasmática e inibição da síntese de parede celular, ao se ligar a um precursor de peptidoglicano de parede celular (lipídeo II) (Gharsallaoui et al., 2016). Descoberta em 1928, vem recebendo destaque por seu amplo espectro de ação antimicrobiana, baixa indução de resistência bacteriana, baixa citotoxicidade, com maior eficácia contra bactérias Gram-positivas (Cotter et al., 2005; Asaduzzaman e Sonomoto, 2009; De Arauz et al., 2009; Van Heel et al., 2011; Balciunas et al., 2013; Cotter et al., 2013; Shin et al., 2015). É bastante utilizada como conservante natural na indústria alimentícia, atuando como conservante em laticínios, carnes, frutos do mar e vegetais (Gharsallaoui et al., 2016)

Quanto a sua atividade antimicrobiana, esse peptídeo já foi testado contra microrganismos associados a infecções sistêmicas, como *Staphylococcus aureus* (Okuda et al., 2013; Field et al., 2016) e *Pseudomonas*

aeruginosa (Giacometti et al., 1999). Na Odontologia, já demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias como *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* (Turner et al., 2004; Tong et al., 2010; Tong et al., 2011; Su et al., 2018), bem como contra fungos como *Candida albicans* (Le Lay et al., 2008; Akerey et al., 2009).

Comercialmente, pode ser encontrada em dois padrões: farmacêutico e alimentar. Apesar de ambos os padrões atenderem a requisitos de qualidade, é importante considerar que o grau farmacêutico passa por processos de fabricação mais rigorosos e é destinado a aplicações específicas na indústria farmacêutica, enquanto o grau alimentar é usado em produtos alimentícios, sendo produzido em maior escala para atender à demanda deste mercado. Sendo assim, o custo de produção é diferente entre os dois padrões, sendo o padrão alimentar mais barato.

Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar e comparar a atividade antimicrobiana das nisinas de padrão farmacêutico e alimentar contra bactérias de interesse médico-odontológico, tendo em vista sua aplicação em condições orais e sistêmicas.

METODOLOGIA:

Substâncias testadas, preparo das soluções e grupos experimentais

As substâncias testadas foram: Nisina de grau farmacêutico (Sigma-Aldrich) e de grau alimentar (S. Vale Alimentos), preparadas em água destilada. Levando em consideração a concentração de nisina na formulação (2,5% em NaCl), a concentração correspondente de NaCl presente na Nisina também foi testada para verificar a influência do NaCl no crescimento microbiano. Os grupos experimentais foram:

- a) Grupo teste: Nisina + bactéria + meio de cultura.
- b) Grupo controle de NaCl: NaCl + bactéria + meio de cultura.
- c) Grupo controle positivo: Bactéria + meio de cultura.
- d) Controles de turbidez e contaminação da nisina: Nisina + meio de cultura.
- e) Controle de contaminação: Meio de cultura.

Microrganismos e condições de cultivo

As bactérias foram armazenadas em freezer – 80°C em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo, contendo 20 % de glicerol. Para uso nos experimentos, os microrganismos foram reativados em meio ágar por 24 h. Os microrganismos e as condições de cultivo estão descritos no quadro 1.

Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antibacteriana (ATB) das substâncias foi determinada pelo ensaio de CIM, através do método de microdiluição seriada em placas de 96 poços, conforme protocolo recomendado pelas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

As bactérias foram cultivadas em meio ágar por 24 horas (Quadro 1). Para ajuste de inóculo, 2 a 3 colônias foram suspensas em tubos de vidro contendo meio de cultura até atingirem absorbância de 0,1 – 660 nm

(concentração de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL), seguido de diluição de 100x. Após, 100 µL do inóculo bacteriano foram adicionados nas placas de 96 poços contendo as substâncias a serem testadas e demais grupos experimentais (concentração final de bactérias na placa: 5×10^5 UFC/mL).

As nisinas foram testadas na faixa de concentração de 500 µg/mL até 0,25 µg/mL. O NaCl foi testado de 39.000 µg/mL (1,95%) até 19,04 µg/mL (0,0009%). As placas foram incubadas em condições específicas em meio de cultura caldo para cada microrganismo testado (Quadro 1).

Análise dos resultados

Após o período de incubação, a CIM foi analisada por meio da análise visual, análise em espectrofotômetro (660 nm) de placas e coloração com resazurina (0,01%). Foi considerada a CIM a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As nisinas de grau farmacêutico e alimentar apresentaram atividade ATB contra as bactérias Gram-positivas testadas. A CIM variou entre 3,91 µg/mL (*S. oralis*) e 125 µg/mL (*S. mutans*). Não houve diferença no valor da CIM para *S. oralis*, *S. mitis* e *S. sanguinis*. Para *S. mutans* e *S. aureus*, a nisina de grau farmacêutico apresentou atividade antimicrobiana em menor concentração (diferença de 1 x CIM).

A bactéria mais sensível à ação de ambas as nisinas foi a *S. oralis* e a menos sensível foi *S. mutans*. Para as bactérias Gram-negativas e para o controle de NaCl não foi encontrado efeito antimicrobiano. Os valores de CIM estão apresentados na Tabela 1.

Desse modo, este estudo destaca a maior susceptibilidade de bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas. Duas possíveis explicações podem estar relacionadas ao: 1) mecanismo de ação da nisina e; 2) diferenças estruturais das bactérias Gram-positivas e Gram-

Quadro 1: Condições de cultivo dos microrganismos utilizados.

Microrganismo	Meio de cultura utilizado para reativá-lo	Meio de cultura utilizado no ensaio de CIM	Cultivo
<i>Streptococcus mutans</i> (UA 159)	BHI ágar	BHI caldo	Estufa de aerobiose com 10% CO ₂ , durante 24 horas, a 37 °C.
<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10904)	BHI ágar	BHI caldo	Estufa de aerobiose com 10% de CO ₂ , durante 24 horas, a 37 °C.
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 494556)	BHI ágar	BHI caldo	Estufa de aerobiose com 10% de CO ₂ , durante 24 horas, a 37 °C.
<i>Streptococcus oralis</i> (ATCC 10556)	BHI ágar	BHI caldo	Estufa de aerobiose com 10% de CO ₂ , durante 24 horas, a 37 °C.
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33591)	MH ágar	MH caldo	Estufa de aerobiose por 24 horas a 37 °C.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	MH ágar	MH caldo	Estufa de aerobiose por 24 horas a 37 °C.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	MH ágar	MH caldo	Estufa de aerobiose por 24 horas a 37 °C.

Legenda: BHI: Brain Heart Infusion, MH: Mueller-Hinton.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Nisinas testadas.

Microrganismo	CIM nisina Sigma-Aldrich (µg/mL)	CIM nisina S. Vale Alimentos (µg/mL)	CIM NaCl (µg/mL)
<i>Streptococcus oralis</i> (ATCC 10556)	3,91	3,91	NE
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 494556)	7,8	7,8	NE
<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10904)	62,5	62,5	NE
<i>Streptococcus mutans</i> (UA 159)	62,5	125	NE
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33591)	7,81	15,63	NE
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	NE	NE	NE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NE	NE	NE

Legenda: CIM: concentração Inibitória Mínima; NE: Não Encontrado.

-negativas. A nisina, como já mencionado, atua ligando-se ao precursor de peptidoglicano (lipídeo II) presente na membrana plasmática das bactérias (Gharsallaoui et al., 2016). Tal ligação, que envolve interações eletrostáticas entre a nisina (carga positiva) e os fosfolipídios da membrana (carga negativa), resulta na formação de poros na membrana plasmática, levando ao extravasamento de componentes celulares e à inibição ou morte da bactéria, e na inibição da biossíntese da parede celular (Martin et al., 1996; Breukink et al., 1999; Wiedemann et al., 2001; Gharsallaoui et al., 2016; Wang et al., 2020).

A primeira variável que pode justificar a diferença de susceptibilidade de diferentes bactérias à ação da nisina é a eficácia da interação nisina-lipídeo II, que depende da composição e da quantidade de fosfolipídios na membrana celular (Gharsallaoui et al., 2016; Wang et al., 2020). A segunda possibilidade pode envolver a composição da membrana e parede celular das bactérias. Enquanto as bactérias Gram-positivas possuem uma membrana plasmática e uma parede celular espessa, as Gram-negativas possuem uma membrana plasmática extra, que confere uma proteção adicional a alguns antibióticos, estando o alvo lipídico II da nisina em bactérias Gram-negativas protegido por esta membrana externa menos permeável, que exclui substâncias hidrofóbicas e macromoléculas (Charest et al., 2024).

Uma vez que isto pode ocorrer, um mecanismo ação antibacteriana alternativo foi proposto, no qual a nisina parece aglomerar a membrana externa (MO), resultando em interações não específicas com moléculas lipídicas da membrana (Prince et al., 2016).

De fato, nas concentrações testadas em nosso estudo, as bactérias Gram-negativas não

foram inibidas por nenhuma das nisinas testadas nas concentrações testadas.

Entretanto, dadas as possíveis aplicações na nisina como antimicrobiano, diversos estudos têm buscado melhorias na atividade antimicrobiana da nisina, principalmente associando a outras substâncias antimicrobianas ou atuando em escala nanométrica. Na área médica, estudos demonstraram que nanopartículas de nisina com quitosana apresentaram melhorias na atividade antimicrobiana contra bactérias como *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* (forma planctônica e em biofilmes) (Zohri et al., 2010; Lee et al., 2018; Khan et al., 2018; Üstün et al., 2022; Hu et al., 2024). Formulações em nanogéis de carboximetilquitosana carregadas nisina também destacaram as melhorias na atividade antimicrobiana com utilização de nisina e formulações em nanoescala (Wu et al., 2023).

Na Odontologia, o uso de nanopartículas de nisina mostrou aumento da atividade antibiofilme contra *Tannerella denticola* (Radaic et al., 2022). Todas estas evidências embasam a necessidade de mais estudos que investiguem o potencial dos peptídeos antimicrobianos, neste caso especial da nisina, em condições orais e sistêmicas que envolvam a patogênese microbiana, associada ou não a antibióticos já disponíveis no mercado, além da necessidade de tecnologias que possam aprimorar a atividade antimicrobiana dessa substância.

CONCLUSÕES:

Tanto a nisina de padrão farmacêutico quanto a alimentar apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas testadas, com valores de CIM iguais ou próximos, sugerindo que a nisina de padrão

alimentar pode ser uma alternativa financeiramente viável para futuras pesquisas. Ademais, podemos sugerir que a nisina apresenta um grande potencial como agente antimicrobiano na Odontologia e na Medicina, contra bactérias orais e de interesse médico, tendo em vista sua aplicação em condições orais e sistêmicas.

BIBLIOGRAFIA

- Akerey B, Le-Lay C, Fliss I, Subirade M, Rouabhia M. In vitro efficacy of nisin Z against *Candida albicans* adhesion and transition following contact with normal human gingival cells. *J Appl Microbiol*. 2009 Oct;107(4):1298-307. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04312.x.
- Asaduzzaman SM, Sonomoto K. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J Biosci Bioeng*. 2009; 107(5):475–487.
- Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*. 2013; 32(1):134–142.
- Breukink E, Wiedemann I, van Kraaij C, Kuipers O P, Sahl H G, & de Kruijff B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286, 2361e2364.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. 2012; 32(3). 188 p
- Charest AM, Reed E, Bozorgzadeh S, Hernandez L, Getsey NV, Smith L, Galperina A, Beauregard HE, Charest HA, Mitchell M, Riley MA. Nisin Inhibition of Gram-Negative Bacteria. *Microorganisms*. 2024 Jun 19;12(6):1230. doi: 10.3390/microorganisms12061230. PMID: 38930612; PMCID: PMC11205666.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(10):777–788.
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11(2):95–105.
- De Arauz LJ, Jozala AF, Mazszola PG, et al. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci Tech*. 2009; 20(3):146–154
- Field D, O' Connor R, Cotter PD, Ross RP, Hill C. In Vitro Activities of Nisin and Nisin Derivatives Alone and In Combination with Antibiotics against *Staphylococcus* Biofilms. *Front Microbiol*. 2016 Apr 18;7:508. doi: 10.3389/fmicb.2016.00508
- Gharsallaoui A, Oulahlal N, Joly C, Degraeve P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Jun 10;56(8):1262-74. doi: 10.1080/10408398.2013.763765.
- Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Fortuna M, Scalise G. In-vitro activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1999 Nov;44(5):641-5. doi: 10.1093/jac/44.5.641.
- Hu X, Du X, Li M, Sun J, Li X, Pang X, Lu Y. Preparation and characterization of nisin-loaded chitosan nanoparticles functionalized with DNase I for the removal of *Listeria monocytogenes* biofilms. *J Food Sci*. 2024 Apr;89(4):2305-2315. doi: 10.1111/1750-3841.16976.
- Khan I, Tango CN, Miskeen S, Oh DH. Evaluation of nisin-loaded chitosan-monomethyl fumaric acid nanoparticles as a direct food additive. *Carbohydr Polym*. 2018 Mar 15;184:100-107. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.034.
- Lee EH, Khan I, Oh DH. Evaluation of the efficacy of nisin-loaded chitosan nanoparticles against foodborne pathogens in orange juice. *J Food Sci Technol*. 2018 Mar;55(3):1127-1133. doi: 10.1007/s13197-017-3028-3. Epub 2018 Jan 15.
- Le Lay C, Akerey B, Fliss I, et al. Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form. *J Appl Microbiol*. 2008; 105(5):1630–1639.
- Martin, I., Ruyschaert, J.-M., Sanders, D. and Giffard, C. J. (1996). Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *Eur. J. Biochem*. 239:156–164
- Okuda K, Zendo T, Sugimoto S, et al. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(11):5572–9.
- Prince, A.; Sandhu, P.; Ror, P.; Dash, E.; Sharma, S.; Arakha, M.; Jha, S.; Akhter, Y.; Saleem, M. Lipid-II Independent Antimicrobial Mechanism of Nisin Depends on Its Crowding And Degree of Oligomerization. *Sci. Rep*. 2016, 6, 37908
- Radaic A, Malone E, Kamarajan P, Kapila YL. Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Nisin (SLN-Nisin) are More Effective Than Free Nisin as Antimicrobial, Antibiofilm, and Anticancer Agents. *J Biomed Nanotechnol*. 2022 Apr 1;18(4):1227-1235. doi: 10.1166/jbn.2022.3314.
- Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Front Microbiol*. 2015 Jun 18;6:617. doi: 10.3389/fmicb.2015.00617.
- Su, M., Yao, S., Gu, L., Huang, Z., & Mai, S. (2018). Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. *Peptides*, 99, 189–194.
- Tong, Z., Dong, L., Zhou, L., Tao, R., & Ni, L. (2010). Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides*, 31(11), 2003–2008.
- Tong, Z., Zhou, L., Jiang, W., Kuang, R., Li, J., Tao, R., ... Ni, L. (2011). An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides*, 32(10), 2021–2026.
- Turner SR, Love RM, Lyons KM. An in vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *I Endod J*. 2004; 37(10):664–671.
- Üstün A, Örtücü S. Evaluation of Nisin-Loaded PLGA Nanoparticles Prepared with Rhamnolipid Cosurfactant against *S. aureus* Biofilms. *Pharmaceutics*. 2022 Dec 9;14(12):2756. doi: 10.3390/pharmaceutics14122756.
- Van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Kuipers OP. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011; 7(6):675–680.
- Wang X, Gu Q, Breukink E. Non-lipid II targeting lantibiotics. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020 Aug 1;1862(8):183244. doi: 10.1016/j.bbmem.2020.183244.
- Wiedemann, I, Breukink E, van Kraaij C, Kuipers O P, Bierbaum, G., de Kruijff B, et al. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1772e1779.
- Wu C, Zhi Z, Duan M, Sun J, Jiang H, Pang J. Insights into the formation of carboxymethyl chitosan-nisin nanogels for sustainable antibacterial activity. *Food Chem*. 2023 Feb 15;402:134260. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134260.
- Zohri M, Alavidjeh MS, Haririan I, Ardestani MS, Ebrahimi SE, Sani HT, Sadjadi SK. A Comparative Study Between the Antibacterial Effect of Nisin and Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Raw and Pasteurized Milk Samples. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2010 Dec;2(4):258-66. doi: 10.1007/s12602-010-9047-2.