

BSLCM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

Para Dr. Melquiades
Pinto Paiva.
Atenciosamente.

Genésio Alves de Araújo
Fortaleza, 9 de dezembro de 1975.

REDUÇÃO DO ÓXIDO DE TRIMETILAMINA
POR BACTÉRIAS

Genésio Alves de Araújo

*Dissertação apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará,
como parte das exigências para a obtenção
do título de Engenheiro de Pesca.*

FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
Dezembro de 1975.

MONOG.
GRAD.

11

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A689r Araújo, Genésio Alves de.

Redução do óxido de trimetilamina por bactérias / Genésio Alves de Araújo. – 1975.
17 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1975.
Orientação: Prof. Francisco José Siqueira Telles.

1. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

SUPERVISOR

Aux. Ens. Francisco José Siqueira Telles

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira

-Presidente

Aux. Ens. Francisco José Siqueira Telles

Aux. Ens. Masayoshi Ogawa

VISTO

Prof. Ass. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira

Supervisor

Prof. Adj. Melquíades Pinto Paiva

Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Adj. Maria Ivone Mota Alves

Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a inestimável orientação dos Professores Francisco José Siqueira Telles e Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira (MS) do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

A bióloga Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, do Laboratório de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, pela sua valiosa colaboração, extensivo aos demais técnicos e auxiliares do Setor de Tecnologia do pescado do Laboratório de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará.

Ao Diretor do Laboratório de Ciências do Mar, Professor Dr. Melquíades Pinto Paiva, pela permissão da realização deste trabalho neste Laboratório.

Aos Professores José Fausto Filho e Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira por suas colaborações.

Finalmente, o autor agradece, de modo especial, aos seus pais, esposa e filho.

Genésio Alves de Araújo

Departamento de Engenharia de Pesca

Universidade Federal do Ceará

O óxido de trimetilamina (TMAO) é uma base nitrogenada encontrada em teleósteos e elasmobrânquias marinhos e em vários grupos de invertebrados, especialmente moluscos e crustáceos (Groniger, 1959 & Grollman, 1929). Uma grande parte do nitrogênio excretado por peixes marinhos está na forma de TMAO (Delaunay, 1967), tendo ainda, um papel na regulação intracelular, principalmente dos teleósteos (Forster & Goldstein, 1969). Se sua função osmoregulatória já está bastante clara, bioquimicamente sua origem ainda é obscura. Embora, Bilinski (1964) tenha encontrado TMAO após administração de metil-butilbetaina-14C, Goldstein et al (1967) trabalhando com este último composto não detectou formação de TMAO.

Já é bem conhecido que a redução do TMAO produz trimetilamina (TMA), sendo este último composto utilizado como um indicador da decomposição do tecido muscular da maioria dos animais marinhos. A qualidade dos filés de peixe tem sido estimada pela quantidade de TMA detectada nos mesmos (Castell et al, 1974; Mandelli, 1969).

A formação de TMA a partir de TMAO tem sido atribuída tanto a ação de bactérias, (Groniger, 1959); Stansby (1968) como também a de enzimas encontradas em ceco pilórico de peixes (Amano & Yamada, 1964). Stansby (1968) indica a enzima triminase como responsável pela redução de TMAO a TMA, atribuindo a causa, às bactérias, principalmente as do grupo Pseudomonas. Entretanto, ainda continua discutível uma possível relação entre a produção de TMA e a deteriora-

ção bacteriana no pescado (Laycock & Regier, 1971).

Poucos estudos tem sido feitos para demonstrar objetivamente a transformação do TMAO em TMA por ação das bactérias, sendo portanto poucas as informações disponíveis sobre as propriedades da reação que conduzem a formação de TMA. Por outro lado, os métodos para medir a formação de TMA a partir da reação entre TMAO e bactérias (Wood & Baird, 1943; Laycock & Regier, 1971) preconizam um tempo de reação de quatro dias.

Tendo em vista o que foi exposto e, considerando que a redução de TMAO a TMA parece ocorrer mediante uma enzima, a triaminase, o presente trabalho visa apresentar algumas modificações na reação envolvendo TMAO e bactérias no sentido de diminuir o tempo de reação e, estudar algumas propriedades desta, como também testar algumas bactérias quanto a sua eficiência na produção de TMA a partir de TMAO.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo utilizamos as bactérias Escherichia coli, Klebsiella sp. Proteus sp, e Estafilococos sp, classificadas por Breed et al (1957). A fim de se obter colônias isoladas, as bactérias foram semeadas nos meios de CHAPMANN para desenvolvimento de Estafilococos sp e CLED(Cystine-Lactose-Eletrolite-Deficient) para Escherichia coli, Klebsiella sp e Proteus sp; distribuidos em placa de Petri previamente esterilizadas, sendo depois incubadas na estufa a 37°C, durante 24 horas.

Para a preparação da suspensão de bactérias foram tomadas 20 colônias e homogeneizadas em Potter, com 20 ml de tampão fosfato(KH_2PO_4) 0,01M em NaCl 0,1M, pH 7,0, previamente esterilizado. O homogenato foi filtrado através de papel filtro qualitativo de diâmetro de 9 cm e número 595(Carl Schleicher & Schull).

A atividade triaminásica, medida na suspensão de bactérias, foi determinada como a capacidade de reduzir o óxido de trimetilamina(TMAO) a trimetilamina(TMA). A reação desenvolveu-se pela adição de 0,5 ml da suspensão de bactérias a 5,0 ml do meio Wood & Baird(1943), previamente esterilizado, pH 7,2 e cuja composição é a seguinte:

<u>COMPOSIÇÃO</u>	<u>GRAMA POR LITRO</u>
Peptona	5,0
NaCl	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
Glicose	2,5
TMAO	1,0
K_2HPO_4	1,0

A incubação da mistura foi feita à temperatura de 37°C durante cinco horas. Parou-se a reação pela adição de

3,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 4%. Na mistura foi determinada a concentração de trimetilamina pelo método de Dyer's modificação por Shevan et al (1969). A mistura foi diluída de 1:5 (v/v) com água destilada e do diluído foi retirado 2,0 ml e colocado num funil de separação cilíndrico de 50 ml. Adicionaram-se 1,0 ml de formalina a 10%, 10 ml de tolueno desidratado com Na₂SO₄ e 3,0 ml de hidróxido de potássio a 45%. Após a agitação por um minuto, formaram-se duas fases, sendo a aquosa desprezada. A outra fase foi colocada em tubo de ensaio contendo Na₂SO₄ anidro. Em seguida, tomaram-se 5,0 ml e colocados em outro tubo de ensaio contendo 5,0 ml de ácido pícrico a 0,02% em tolueno. A cor amarela desenvolvida foi lida em 410 μ em espectrofotômetro Bausch & Lomb-spectronic 20. O tempo zero ou branco da reação correspondeu a adição de 0,5 ml da suspensão bacteriana a 5,0 ml do meio Wood & Baird (1943) sem TMAO, o qual foi adicionado após a adição de TCA a 4%, conservadas as mesmas condições de incubação do problema. Todos os valores de densidade ótica das amostras foram subtraídas dos valores dos brancos. A atividade triaminásica foi expressa em densidade ótica por colônia de bactéria.

A determinação do pH ótimo baseiou-se na incubação de bactérias no meio de Wood & Baird (1943) nos seguintes pHs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

A variação da atividade triaminásica em função da temperatura e tempo foi feito utilizando-se as temperaturas de 30, 37 e 45°C e tempo de 2, 3, 4, 5 e 6 horas.

A atividade triaminásica em função do pH, temperatura e tempo de reação; embora tenha sido feita para todas as bactérias em estudo, os dados apresentados são relativos a Escherichia coli, tendo as demais bactérias apresentado comportamentos semelhantes diante destes parâmetros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transformação de TMAO a TMA através de bactérias tem sido reportada por vários autores, Stansby(1963); Nicol (1967), Laycock (1971). Entretanto, eles não esclarecem de que maneira as bactérias estão envolvidas neste processo.

Os resultados apresentados na Tabela I, indicam a ação efetiva das bactérias em estudo, na redução do TMAO a TMA. Isto é evidenciado pelos valores assumidos pelas reações-problema e branco e, ainda, indicam a segurança dos dados obtidos.

A atividade triaminásica apresentou um pico máximo a pH 7,0 (Tabela II, Figura 1), semelhante ao pH encontrado por Wood & Baird (1943) e parece indicar a participação de somente uma enzima no sistema TMAO-TMA. Este pH está próximo àquele usado nos meios de cultura para o crescimento das bactérias em estudo.

A variação da atividade triaminásica em função da temperatura e do tempo de incubação (Tabela III, Figura 2) indica um aumento diretamente proporcional desta atividade com o tempo, sendo 37°C a temperatura ótima desta reação.

Considerando que o crescimento bacteriano é exponencial era de se esperar uma reação diretamente proporcional entre a atividade triaminásica e o tempo de incubação. Entretanto, este não era o objetivo procurado e, sim verificar a influência da preparação da amostra sobre o tempo de reação. Os resultados na Tabela III, demonstram que um homogenato de bactérias preparado como no presente estudo possibilita a formação de TMA em nível favorável à sua medição, a partir de 4 horas de incubação, enquanto que pelos trabalhos de Wood & Baird (1943) e Laycock & Regier

(1971), isto só é possível em torno de 4 dias de incubação, Isto se reveste de grande importância, tendo em vista a grande redução do tempo de reação, favorecendo extremamente o estudo das propriedades desta enzima.

Dentre as bactérias estudadas, a Escherichia coli foi a que apresentou maior atividade triaminásica (Tabela IV, Figura 3). Em relação a atividade triaminásica apresentada pela Escherichia coli, Proteus sp apresentou 85% desta atividade, Klebsiella sp 30% e Estafilococos sp apenas 4,0%. De acordo com Mandelli (1969) baseado em Jepsen (1959) afirma ser as bactérias do gênero Achromobacter e Pseudomonas, as bactérias que mais eficientemente reduzem TMAO a TMA. Laucock & Regier (1971), trabalhando com bactérias do grupo Pseudomonas e Coryneformes determinaram ser a Pseudomonas putrefaciens a que mais reduzia o TMAO a TMA.

TABELA I - atividade triaminásica (expressa em densidade ótica) de várias espécies de bactérias, incubadas a 37°C por 5 horas.

	Densidade ótica	
	Problema	Controle
<u>Escherichia coli</u>	.730	.050
<u>Estafilococos sp</u>	.060	.030
<u>Klebsiella sp</u>	.260	.040
<u>Proteus sp</u>	.660	.040

TABELA II - variação da atividade triaminásica de Escherichia coli, em função do pH.

pH	Densidade ótica.colônia ⁻¹
5,0	34,1
6,0	55,0
7,0	88,0
8,0	73,7
9,0	59,4
10,0	27,4
11,0	4,4
12,0	11,1

TABELA III - variação da atividade triaminásica das bactérias Escherichia coli, em função da temperatura e tempo de ensaio.

Temperatura (°C)	Densidade ótica.colônia ⁻¹				
	Tempo de incubação (Hora)				
	2	3	4	5	6
30	0,0	1,7	22,5	66,0	103,4
37	1,1	11,0	66,0	74,8	110,0
45	1,1	3,9	38,5	70,4	104,5

TABELA IV - atividade triaminásica de várias espécies de bactérias, incubadas à 37°C por 5 horas

Espécies de bactérias	Densidade ótica.colônia ⁻¹
<u>Escherichia coli</u>	80,3
<u>Estafilococos</u> sp	3,3
<u>Klebsiella</u> sp	24,2
<u>Proteus</u> sp	63,2

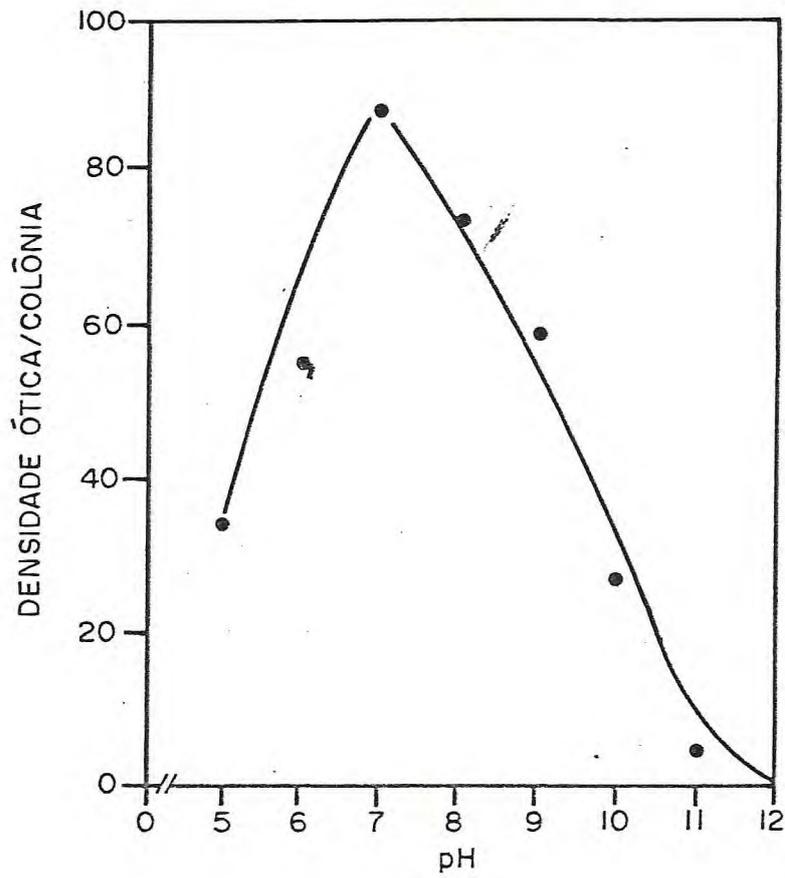


FIGURA 1 - Variação da atividade triaminásica de Esche richia coli, em função do pH

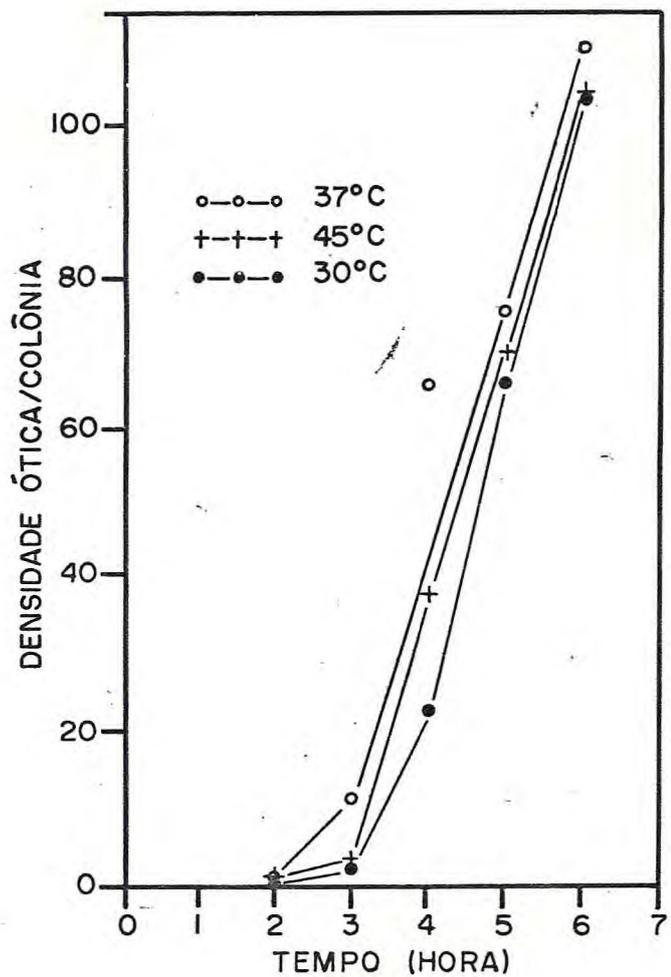


FIGURA 2 - variação da atividade triaminásica das bactérias Escherichia coli, em função da temperatura e tempo de ensaio.

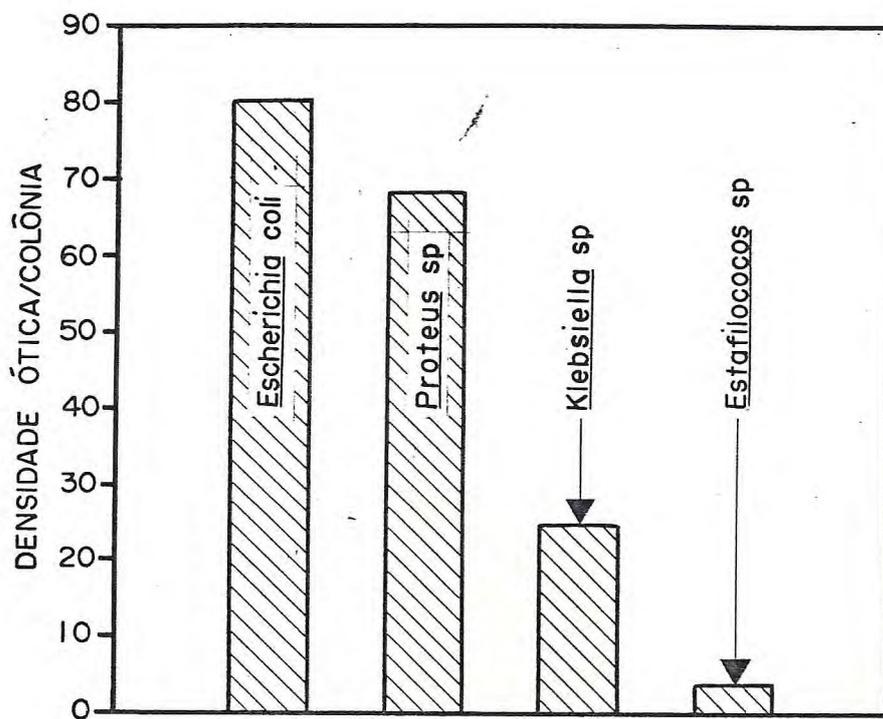


FIGURA 3 - atividade triaminásica de várias espécies de bactérias, incubadas a 37°C por 5 horas.

CONCLUSÕES

Do presente estudo, as seguintes conclusões podem ser evidenciadas:

- 1 - as bactérias Escherichia coli, Estafilococos sp Klebsiella sp e Proteus sp, reduzem o TMAO a TMA.
- 2 - a apresentação da amostra utilizada neste trabalho, permite a medição da TMA a partir de 4 horas da reação envolvendo TMAO e suspensão de bactérias.
- 3 - a triaminase mostrou uma atividade máxima a pH 7,0 e à temperatura de 37°C.
- 4 - em termos de atividade triaminásica a Escherichia coli foi a que se apresentou mais eficiente, vindo por ordem Proteus sp, Klebsiella sp e, finalmente o Estafilococos sp que praticamente não apresentou atividade triaminásica.

SUMMARY

The present work deals with some modifications in the reaction involving trimethylamine oxide (TMAO) and bacteria, in order to diminish the duration of the reaction and to study some of its properties. It also tests the efficacy of some bacteria in the reduction of TMAO to trimethylamine (TMA).

The triaminasic activity showed its highest level at pH 7,0 and varied in a direct proportion to the time of reaction.

The optimum temperature reaction was 37°C.

Among the studied bacteria, Escherichia coli showed the highest activity, but this activity was at standstill in Stafilococos sp suspensão.

LITERATURA CITADA

Amano, K. & Yamada, K. - 1964 - Formaldehyde for
mation from trimethylamine oxide by the action of *pyloria*
caeca of cod. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 30 (8): 639-645,
3 figs.

Bilinski, E. - 1964 - Formation of excretory pro
ducts, In: Fish physiology, Academic Press, 1^a ed pp 313 -
350, ilus, New York.

Breed, S.R.; Murray, R.; et al - 1957 - Berge's
manual of determinative bacteriology. The Williams & Wil -
kins Company; xviii + 1094 p, Baltimore.

Castell, C.H. Smith, B. & Dyer, W.J. - 1973 - Si
multaneous measurements of trimethylamine and Dimethylami-
ne in fish, and their use for estimating quality of frozen
-stored Gadoid fillets. J. Fish. Res. Bol. Canada, 31 (4):
383 - 389, 5 figs.

Delaunay, H. - 1967 - Excretion. In: The biology
of marine animals. Sir Isac Pitman & Sons, Ltd, 2^a ed. pp.,
276 - 301, London.

Dyer's W. J. - 1945 - In: Utilization of marine
products. Japan; Overseas Technical Cooperation Agency Go -
vernment of Japan, 1972, pp 204 - 240, ilust.

Forster, R.P. & Goldstein, - 1969 - Formation
of excretory products. In: Fish physiology, Academic Press,
1^a ed pp. 313 - 350, ilus, New York.

Goldstein et al. - 1967 - Formation of excretory
products. In: Fish physiology, Academic, Press, 1^a ed, pp
313 - 350, ilus, New York.

Grollman, A. - 1929 - Formation of excretory products. In: Fish physiology, Academic Press, 1ª ed, pp 313-350, ilus, New York.

Groniger, H.S. - 1959 - Formation of excretory products. In: Fish physiology, Academic Press, 1ª ed, pp, 313 - 350, ilus New York.

Laycock, R.A. & Regier, L.W. - 1971 - Trimetylamine producing bacteria ou Haddock (Melanogrammus aeglefinus) fillets during refrigerated storage. J. Fish. Res. Bol. Canada, 28 (3): 305 - 309, 5 figs.

Mandelli, M.O. - 1969 - Trimetilamina. Equipescaportal, São Paulo (26).

Stansby, M.E. et al - 1968 - Bases químicas e bacteriológicas de los alteraciones del pescado. In: Tecnologia de la Industria pesqueira. Editorial Acribia, pp. 403 - 416, Zaragosa, Espâna.

Wood, A.J. & Baird, E.A. - 1943 - In: Principles of bacteriology and Imunit, Edward Arnold Ltd, 5ª ed pp. 486 - 498, ilus, Londres.