

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

BRUNO SEBEN DE ALMEIDA

**ANÁLISE DA TOXINA *KILLER* PRODUZIDA POR *Hansenula wingei*
E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO ANTIMICROBIANO EM
CMS DE AVES**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2021

BRUNO SEBEN DE ALMEIDA

**ANÁLISE DA TOXINA *KILLER* PRODUZIDA POR *Hansenula wingei* E
SUA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO ANTIMICROBIANO EM CMS
DE AVES**

**Analysis of killer toxin produced by *Hansenula wingei* and its potential application as a
antimicrobial in poultry MDM**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do
título de Tecnólogo em Alimentos do Curso
Superior em Tecnologia em Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR campus Londrina.

Orientador: Profa. Dra. Mayka Reghiany
Pedrão
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo
Coelho

LONDRINA
2021



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es).

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

TERMO DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DA TOXINA *KILLER* PRODUZIDA POR *Hansenula wingei* E SUA
POTENCIAL APLICAÇÃO COMO ANTIMICROBIANO EM CMS DE AVES

BRUNO SEBEN DE ALMEIDA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 12 de maio de 2021 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos e foi avaliado pelos seguintes professores:

Dra. Mayka Reghiany Pedrão
Profa. Orientadora

Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Prof. Coorientador

Dra. Marly Sayuri Katsuda
Professora Avaliadora 1

Dra. Margarida Massami Yamaguchi
Professora Avaliadora 2

Dedico este trabalho à maior honra e glória de
Nosso Senhor Jesus Cristo.

AGRADECIMENTOS

Todo aprendizado se faz por meio do intermédio de diversas pessoas, e seria por demais dispendioso contemplar a todos com os devidos agradecimentos, me retenho então em obrigar-me àqueles que representam uma condição *sine qua non* para minha caminhada acadêmica e para a realização deste trabalho, sem diminuir, no entanto, os operários silenciosos que direta ou indiretamente contribuíram para esta causa:

Todo a glória e o merecimento a Deus que dando o dom da vida e da sabedoria me colocou nesse caminho.

À minha orientadora, profa. Dra. Mayka Reghiany Pedrão, o agradecimento pela disponibilidade constante, a proximidade fraterna e o ensino frutuoso.

Ao prof. Dr. Alexandre Coelho, que esteve sempre à disposição para sanar dúvidas e disponibilizou também equipamentos e substratos.

À Secretaria do Curso, pela cooperação.

À profa. Dra. Lyssa Setsuko Sakanaka pela disponibilização de reagentes para as análises.

Aos técnicos de laboratório da UTFPR campus Londrina, Sumaya, Roberta, Talita e Rodolfo pela disposição em me auxiliar e ensinar.

A todos os bons profissionais do campus que contribuíram direta ou indiretamente pela minha formação.

À empresa que colaborou cedendo a CMS usado nas análises microbiológicas e cedendo algumas das cepas usadas nos testes de antagonismo.

À profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia, que me introduziu ao campo de pesquisa científica e acadêmica, por ter iluminado o início dessa jornada.

Aos meus colegas de sala pelo suporte e companheirismo.

À minha mãe Lucia e avó Vanda, que me suportaram durante todo o período e me privilegiaram por poder me dedicar à pesquisa enquanto proviam pela maioria das minhas necessidades. E a à minha namorada Stefany Bernini, pelo apoio e incentivo constantes.

As portas do espírito só se abrem à perfeita
sinceridade de propósitos.
(CARVALHO, Olavo L. P., 2007)

RESUMO

O mercado nacional e internacional busca cada vez mais por alimentos com reduzido teor de aditivos químicos. Estudar a viabilidade de um novo método de conservação natural de um produto tão versátil como a carne mecanicamente separada (CMS) se faz necessário para expandir o mercado do produto, seguindo as tendências das demandas alimentares dos consumidores atuais. Portanto foi selecionada uma cepa de *Hansenula wingei*, uma levedura conhecida pela produção de toxinas *killer*, uma proteína de fator antimicrobiano, para a cultura e extração de um bioconservante para aplicação em CMS de aves. O extrato de levedura passado por processo de secagem por atomização foi testado *in vitro* e em CMS de aves para determinar seu fator antimicrobiano contra patógenos de alimentos como *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva, assim como seu efeito na conservação da estabilidade microbiológica da CMS congelada. Em concentração de 8,3%, o extrato seco obteve um fator de inibição superior ao dos sais de cura aplicados tradicionalmente pela indústria cárnea e pela viabilidade de seu crescimento e concentração por secagem, pode ser considerado um antimicrobiano viável e com boas perspectivas como bioconservante.

Palavras-chave: Bioconservante. Antagonismo. Eletroforese. Biocontrole.

ABSTRACT

The national and international market searches ever more for food with a reduced number of chemical additives. Therefore, studying the viability of a new natural conservation method of a product with such a variety of uses as the mechanically deboned meat (MDM) it's necessary for expanding the product market and acceptance, following the tendencies and demands of the today consumer. Hence was selected a strain of *Hansenula wingei*, a yeast known for its production of killer toxins, an antimicrobial factor protein, for the culture and extraction of a hypothesised biopreservative in poultry MDM. The yeast extract undergone a drying process by atomization and tested *in vitro* and in poultry MDM for its antimicrobial factor against food pathogens like *E. coli*, *Salmonella spp.* and coagulase-positive *Staphylococci* and its effects on the conservation of the microbiological stability of the frozen MDM. In 8,3% concentration the dried extract had an inhibition factor superior to those of curing salts used by the meat industry as antimicrobial and the extract's viability of growth and drying concentration, it can be considered a viable antimicrobial and a with good perspectives as a biopreservative.

Keywords: Biopreservative. Antagonism. Electrophoresis. Biocontrol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – CMS sendo extraída por máquina separadora.....	14
Figura 2 – Filtração do extrato de <i>Hansenula wingei</i>	20
Figura 3 – Esquema da placa de 96 poços utilizada para determinar CMI.....	22
Figura 4 – Aplicação das amostras na placa de gel de poliacrilamida.....	24
Figura 5 – Curvas de crescimento para <i>Hansenula wingei</i>	27
Figura 6 – Extrato seco de <i>Hansenula wingei</i> pós secagem por infravermelho.....	28
Figura 7 – Placas de CMI de extrato diluído de <i>Hansenula wingei</i>	29
Figura 8 – Contagem de Mesófilos em CMS de aves (em 100UFC/g)	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição proximal dos extratos secos de <i>Hansenula wingei</i>	27
Tabela 2: Redução da carga microbiana em CMS congelada em relação ao Controle (em %) com diferentes tratamentos.....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios microbiológicos da CMS.....	15
Quadro 2 – Absorbância dos sistemas de crescimento de <i>Hansenula wingei</i>	22
Quadro 3 – Contagem das colônias de microrganismos inoculados em CMS de aves (em UFC/g)	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 AGENTES ANTIMICROBIANOS E A CMS	13
3.1 CARNE MECANICAMENTE SEPARADA.....	13
3.2 ANTIMICROBIANOS E BIOCONTROLE	16
3.3 TOXINAS <i>KILLER</i> E SUA AÇÃO.....	17
3.4 <i>Hansenula wingei</i> E SUA APLICAÇÃO.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. CONDIÇÕES E CURVA DE CRESCIMENTO	19
4.2 FILTRAÇÃO E SECAGEM.....	20
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO SECO.....	20
4.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA.....	22
4.5 ISOLAMENTO DA TOXINA <i>KILLER</i> POR ELETROFORESE.....	23
4.6 EFICÁCIA DO EXTRATO SECO EM CMS.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A carne de frango é um alimento muito apreciado no Brasil e no exterior, principalmente pelo seu sabor e versatilidade, na culinária e na indústria. Ela se faz presente no cotidiano do brasileiro e está amplamente difundida no seu imaginário já que o consumo per capita de carne de frango no Brasil em 2017 foi de 42kg/hab (ABPA, 2018). É realçável sua importância econômica já que o Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango, apenas atrás dos Estados Unidos, tendo produzido em 2017 mais de 13 milhões de toneladas e um terço dessa produção foi exportada, com uma receita de mais de 7 milhões de dólares (Ibidem, 2018).

O baixo custo da carne de frango em relação a outras fontes de proteína de alto valor biológico também representa uma alternativa para a redução da fome e da subnutrição tanto no Brasil quanto no exterior (OCDE-FAO, 2014). Mesmo com um mercado tão bem-sucedido sempre há espaço para o crescimento, principalmente num país emergente como o Brasil, com potencial para ser o novo celeiro do mundo (Ibidem, 2014). O investimento em tecnologia inovadora, principalmente na área das indústrias de alimentos e visando a exportação é uma das grandes perspectivas de promover o crescimento da economia nacional (OCDE, 2018).

Entre as diversas formas como a carne de frango é comercializada, a carne mecanicamente separada (CMS) tem se expandido muito, principalmente pela sua facilidade de obtenção e transformação de produtos industrializados com melhor sabor e facilidade de preparação doméstica (GONÇALVES, 2006). O mercado internacional, aceitando mais a carne de frango brasileira, é, todavia, exigente, listando diversas características necessárias para a exportação, principalmente no Oriente Médio. Entre as exigências mais comuns estão os abates diferenciais (como o halal), diminuição de carga microbiana e de aditivos químicos (UBABEF, 2013). E para manterem-se competitivas, muitas indústrias brasileiras têm buscado se adaptar à essa realidade.

Visando a diminuição de carga microbiana, além da adoção de Boas Práticas de Fabricação (BPFs) a indústria de alimentos pode aplicar adição de antimicrobianos desde que não acoberte irregularidades no processo (BRASIL, 2000). Conforme Mendes et al. (2013): “Antimicrobianos são substâncias de origem natural, semissintética ou sintética, capaz de matar ou inibir o desenvolvimento de um microrganismo responsável por determinada doença infecciosa provocando pouca ou nenhuma lesão”. Porém o consumidor, sempre mais exigente, pede por alimentos com sabor fresco, com menos processamento e adição de

conservantes químicos, e para atender essa demanda nasce a busca por bioconservantes (Gálvez et al. 2014).

A bioconservação ou biocontrole se refere ao uso controlado de microrganismos ou de seu produto antimicrobiano com o intuito de estender a *shelf life* de um produto ou de assegurar sua segurança. Este campo da biotecnologia já obteve diversos avanços nas últimas décadas, inclusive desenvolvendo antimicrobianos naturais amplamente usados na indústria como Nisina, bacteriocina utilizada na conservação de laticínios (IBIDEM, 2014). Um dos produtos antimicrobianos estudados para aplicação como bioconservantes são as toxinas *killer*, proteínas extracelulares produzidas por leveduras, capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos sensíveis (MARTINS, 2018). As leveduras que carregam fator *killer* já foram aplicadas extensivamente *in vivo* no controle do crescimento fúngico em vegetais e em mostos fermentativos, destacando-se as leveduras do gênero *Hansenula* (FONTANA et al., 2017).

Considerando o crescimento da área de pesquisa e a necessidade mercadológica, decidiu-se por utilizar uma cepa de *Hansenula wingei* para a produção de antimicrobiano e analisar suas características assim como sua possível aplicação na forma seca como bioconservante em CMS de aves.

2 OBJETIVO

Analisar o extrato de *Hansenula wingei* em suas características físico-químicas e determinar sua eficácia antimicrobiana após processo de secagem e sua possível aplicação como bioconservante em carne mecanicamente separada (CMS) de aves.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar a levedura *Hansenula wingei* e obter seu extrato;
- Secar o extrato de *H. wingei*;
- Determinar a composição proximal;
- Isolar a proteína *killer* do extrato seco;
- Identificar a concentração mínima inibitória do extrato seco;
- Avaliar a eficácia antimicrobiana do extrato seco em CMS.

3 AGENTES ANTIMICROBIANOS E A CMS

3.1 CARNE MECANICAMENTE SEPARADA

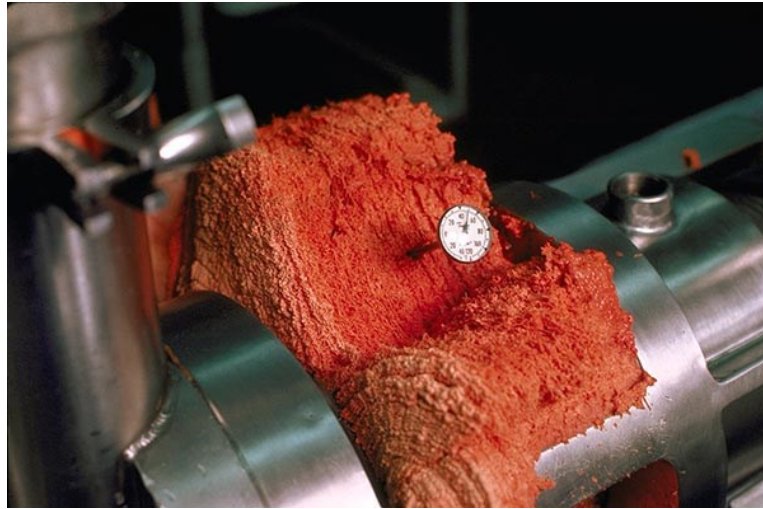
A carne mecanicamente separada é um produto de frigoríficos, feito a partir de diversas partes da carne da carcaça em questão. Segundo a definição da legislação: “Entende-se por Carne Mecanicamente Separada (CMS) a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue, destinada a elaboração de produtos cárneos específicos”, e ainda segundo a mesma pode ser designada como CMS de ave, de bovino ou de suíno (BRASIL, 2000).

O surgimento da CMS aconteceu nos Estados Unidos na década de 50 quando a demanda dos consumidores por cortes de ave ao invés da ave inteira levou a indústria a buscar meios de aproveitar melhor a carne que sobrava após a retirada dos cortes principais, como pescoço, dorso e a carne junto aos ossos. Essa mesma carne que fica muitas vezes presa junto aos ossos após a retirada dos cortes mais nobres, significa prejuízo para a indústria se vier a perder-se. A CMS surgiu como um meio de aproveitar ao máximo essa carne (GONÇALVES, 2006).

A separação mecânica que caracteriza o produto é vantajosa pois é feita com equipamentos específicos que conseguem retirar a carne até dos ossos mais difíceis como o pescoço e as costas da carcaça das aves (TRINDADE; FELÍCIO; CASTILLO, 2004). Dependendo da qualidade desejada para a CMS, podem ser adicionadas no processo partes de ainda menor qualidade (ponta de asa e cartilagem do peito) (BERAQUET, 2000).

No processo produtivo da CMS a matéria-prima escolhida (ossos com resíduos cárneos não removidos durante a desossa manual) é forçada de encontro a faces perfuradas de um crivo metálico, mecanicamente ou por pressão hidráulica, o CMS então é obtido como na figura 1. Segundo a descrição de Nunes (2003) o processo mais comumente utilizado consiste em cortar a matéria prima inicial, separar tendões e ossos da carne, utilizando uma rosca sem fim no interior do equipamento para forçar a passagem por cilindros perfurados, ou em placas justapostas com um espaço entre si funcionando como uma peneira.

Figura 1 – CMS sendo extraída por máquina separadora



Fonte: SCHULZE (2017).

Alguns equipamentos têm como princípio o uso de dois estágios de compressão: num primeiro estágio o material é submetido a uma pressão suave para remover a carne da superfície dos ossos evitando a incorporação da medula óssea; a carne obtida mantém sua integridade e poderia ser considerada carne moída. Num segundo estágio, a carne é comprimida por uma rosca sem fim contra uma peneira similar às máquinas de um estágio só, e a carne obtida é considerada CMS (BERAQUET, 2000 apud GONÇALVES, 2006). O rendimento da CMS das aves varia de 55 a 70%. Desossadores mecânicos podem processar de 230-9100 kg/hora dependendo do tipo e da capacidade do equipamento (FRONING e McKEE, 2001).

3.1.1 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA CMS

Segundo a legislação, a CMS deve ser armazenada refrigerada a 0°C ou 4°C e pode ser utilizada em até 72h ou 24h, respectivamente. Pode ser mantida congelada a -18°C por até 90 dias (BRASIL, 2000). Os critérios microbiológicos para a CMS são severos como é apresentado no quadro 1.

Quadro 1 – Critérios microbiológicos da CMS

Microrganismo	Critério de aceitação	Métodos de análise
<i>Salmonella</i>	n=5, c=2 25g	APHA- 1992, ou FDA 7th Ed., 1992. ISO
<i>S. aureus</i> (UFC/g)	n=5, c=2 m= 5x10 ² M= 5x10 ³	

Fonte: Brasil (2000)

Critérios tão estritos são justificados pela alta instabilidade oxidativa e microbiológica da CMS. Por possuir um pH superior à média de carne de ave (em torno de 5,8), e mais próximo da neutralidade, a CMS apresenta características favoráveis ao crescimento microbiano, juntamente pela maior atividade de água, causada pela menor capacidade de retenção de água devido ao pH mais neutro. Uma superfície de contato maior, unido a essas características também promove a mais rápida oxidação, o que explica o pouco tempo de armazenamento seguro sob refrigeração (PEREIRA, 2009).

Segundo diversas pesquisas a CMS, pelas razões referidas, é suscetível a contaminação microbiológica, como relatado por Carvalho e Cortez (2005) 25% das amostras de CMS analisadas apresentaram carga microbiológica acima do previsto na legislação (de CMS), em comparação com 13% de carcaça e de coxa e sobrecoxa (sob a própria legislação). Também resultado similar foi encontrado por Carvalho et al. (2002) e por Garcia (2002), respectivamente 16% e 26%.

Conforme a legislação regulamentadora dos aditivos em carnes e produtos cárneos, pode-se aplicar alguns conservantes sintéticos (nitritos e nitratos) e alguns antioxidantes também artificiais (BHA, BHT e Galato de propila) na CMS, incluindo-a na classificação carnes industrializadas frescas. Conservantes e antioxidantes naturais não são previstos como aditivos para produtos cárneos no Brasil (BRASIL, 1998).

A carga microbiológica da CMS é em muito, fruto do processo de produção, pois a higienização dos equipamentos, a assepsia dos manipuladores, e a esterilidade das embalagens, assim como o grau de contato dos manipuladores com a matéria prima da CMS, influenciam diretamente na contaminação por diversos microrganismos patogênicos, como apontado pelos dados levantados por Junior e Garcia (2007).

3.2 ANTIMICROBIANOS E BIOCONTROLE

A utilização de microrganismos para melhorar a durabilidade de alimentos é algo presente em diversas culturas milenares, em especial pelo uso das bactérias ácido lácticas (BALs) na produção de alimentos e bebidas fermentadas como o salame e o vinagre que, reduzindo o pH e produzindo certas moléculas antimicrobianas como peróxidos e bacteriocinas, inibem o crescimento de microrganismos patógenos, retardando também a deterioração do mesmo (JONES; WESCOMBE; TAGG, 2011) Com o advento da ciência moderna e da descoberta do mundo microscópico, o antagonismo é pesquisado desde Pasteur, e aplicação variada dos compostos antimicrobianos abrange usos desde antibióticos a desinfetantes e conservantes de alimentos (IBIDEM, 2011).

No estudo do biocontrole, a atenção se volta mais facilmente para os microrganismos já utilizados pelos seres humanos para os diversos processos na produção de alimentos, tais como as BALs e certas leveduras de capacidade fermentativa como as da família *Saccharomycetaceae*, em outras palavras, que têm o reconhecimento GRAS (*Generally Regarded As Safe*) como seguras para o uso humano (GÁLVEZ, 2014). Esses microrganismos podem ser aplicados diretamente na forma de culturas selecionadas ou ainda podem produzir um metabólito que será purificado e aplicado. Para escolher um microrganismo ou seu produto como possível agente de biocontrole Jones, Wescombe e Tagg (2011) apresentam uma lista de características desejáveis:

- (i) Atóxicos.
- (ii) Regulamentados (GRAS)
- (iii) Baixo custo
- (iv) Não afetam as características sensoriais
- (v) Efetivo em baixas concentrações
- (vi) Estável no período de armazenamento
- (vii) Sem aplicações médicas

Uma cultura ou metabólito com ações antimicrobianas que cumpra com esses requisitos pode ser aplicada em alimentos como bioconservante uma vez que seja aprovada como aditivo pelos órgãos competentes. Tal aconteceu com a Nisina, bacteriocina produzida pela bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, que após sua descoberta em 1928 foi desenvolvida como bioconservante na década de 50 em diversas publicações e no uso

comercial no Reino Unido. Atualmente ela é aceita como aditivo de alimentos em mais de 50 países, incluindo o Brasil (DELVES-BROUGHTON; WEBER, 2011).

A técnica de *screening* é a mais utilizada para verificar a capacidade antimicrobiana de um composto tendo diversas variações de antibiograma (JONES; WESCOMBE; TAGG, 2011). Mas para a aplicação do composto, é necessária a utilização do teste de concentração mínima inibitória, no qual diversas concentrações do composto de atividade antimicrobiana comprovada são testadas visando a menor concentração possível que tem uma ação antimicrobiana aceitável contra os microrganismos testados (SILVEIRA, 2019).

3.3 TOXINAS *KILLER* E SUA AÇÃO

Entre os agentes antimicrobianos usados no biocontrole, estão as leveduras *killer*, fungos que produzem como metabólito secundário uma proteína capaz de inibir e até destruir células de outros microrganismos sensíveis (FONTANA, 2018). Descoberta inicialmente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* na década de 60, foi posteriormente sendo identificada em diversas outras leveduras da família *Saccharomycetaceae* principalmente em sua ação antifúngica, e apenas teve sua ação antibacteriana comprovada em 1986 (POLONELLI; MORACE, 1986).

Atualmente acredita-se que as toxinas *killer* têm diversos mecanismos de ação, variando com a espécie que a produziu e até com o meio da fermentação. Em geral os mecanismos utilizados pela levedura *killer* para eliminar os microrganismos sensíveis são: Inibição da replicação de DNA, indução de mudança na permeabilidade da membrana, aprisionamento da célula na sua fase G1, e principalmente pela inibição na produção da parede celular ou da hidrólise da mesma (LIU et al., 2013).

Devido à variedade de leveduras *killer*, as toxinas também carregam muitas diversidades, tais como ponto isoelétrico, massa molar e termoestabilidade, mesmo dentro de um mesmo gênero, sendo que algumas têm ponto isoelétrico em pH 3,6 outras em 2,9 e outras ainda apresentando estabilidade em até pH 11,0. (KAGIYAMA; KADOWAKI; MOGI, 1988; FONTANA et al., 2018).

3.4 *Hansenula wingei* E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO

O gênero *Hansenula*, também chamado de *Pichia*, é caracterizado por células esféricas, elipsoidais ou alongadas e, em alguns casos, afuniladas, e diversas de suas espécies carregam o fenótipo *killer*, e suas toxinas com peso molecular entre 8 e 12 kDa apresentaram estabilidade ampla a pH e temperatura para proteínas, suportando até tratamento térmico de 100°C por 4 min. (IBIDEM, 2018).

A aplicação do metabólito em alimentos é limitada tanto pela concentração, já que se vê necessário o uso do menor volume possível (JONES; WESCOMBE; TAGG, 2011), quanto pelo seu estado, já que um produto líquido – tal como é o extrato bruto de leveduras – terá maior dificuldade em ser empregado em um alimento sólido como a CMS. Carboni et al. (2020) aplicaram método de secagem por liofilização de toxinas rKpkt para uso em alimentos e na fermentação de vinhos, enquanto Loh et al. (2009) secaram os metabólitos de *L. plantarum* por *spray drying* para aplicação de suas bacteriocinas na alimentação de ratos e Huang et al. (2017) revisaram diversos métodos de secagem de culturas bacterianas via *spray drying* para uso como probióticos e *starters*, dados que abrem o horizonte para a possibilidade da secagem das toxinas visando sua melhor aplicação.

A espécie *Hansenula wingei* (daqui por diante chamada *H. wingei*) já teve comprovada sua eficácia na ação contra fungos filamentosos e teve tanto sua atividade antimicrobiana quanto sua toxina *killer* avaliadas anteriormente (Ibidem, 2018; MARTINS, 2018; SIMER 2013). E foi escolhida para a realização do presente trabalho sendo membro de um gênero cujas toxinas *killer* apresentam certa estabilidade térmica, o que corrobora com a hipótese de secagem do extrato. A cepa foi originalmente isolada de milho por Gasperini (2011) a partir de uma cooperativa do município de Francisco Beltrão – PR teve confirmada a produção de toxina *killer* eficaz contra *P. expansum* e *A. ochraceus* por Simer (2013) e mais recentemente foi usada para isolamento parcial de sua toxina (FONTANA et al., 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho que consiste na obtenção e avaliação do extrato bruto de *H. wingei*, sua secagem e consequentes análises até sua aplicação em CMS de frango, tem caráter exploratório, expandindo a visão a partir da hipótese da aplicação do extrato seco de Hw como bioconservante em CMS, e foi realizado no laboratório de Carnes A004 da UTFPR campus Londrina. A cultura *H. wingei*, depositada na coleção microbiológica de interesse biotecnológico da UTFPR/Ponta Grossa (CMIB-UTFPR), foi cedida pelo prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho para ser utilizada no presente trabalho. Aplicou-se diferentes alíquotas do extrato em uma placa de 96 poços, visando a inibição de duas cepas distintas de *Staphylococcus* coagulase positiva, duas cepas distintas de *Salmonella* spp. e uma cepa de *Escherichia coli*, microrganismos cedidos pela Bacterioteca do laboratório de microbiologia da UTFPR, e pelo laboratório de análise microbiológica de uma empresa privada de carne de aves.

4.1. CONDIÇÕES E CURVA DE CRESCIMENTO

A partir de cultura sólida de *H. wingei* em Ágar batata dextrose (BDA), padronizou-se um pré-inóculo em Escala McFarland 1 – cerca de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL – e dele foi transferida a alíquota de 100µL para seis frascos de 1L com Caldo Meio Para Levedura (Caldo MPL - glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, sulfato de amônio 0,5% e fosfato de sódio monobásico 1%), destes, transferiu-se 3L para frascos erlenmeyer de 500mL e incubou-se sob agitação de 110rpm em *shaker* e os 3L restantes de forma estática, ambos a 25°C por 148 horas.

Durante o período de incubação recolheu-se assepticamente uma alíquota de 3 ml de cada condição de crescimento (agitação e estático), submetendo essas amostras a leitura de absorbância por espectrofotometria nos comprimentos de onda 600nm, 640nm e 660nm, conforme indicado pela literatura para a identificação de uma curva de crescimento de leveduras. As leituras foram realizadas nos tempos 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 e 148 horas.

4.2 FILTRAÇÃO E SECAGEM

Após o período de incubação, o caldo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10min e o sobrenadante separado do precipitado, passou-se então o primeiro por filtração por bomba a vácuo em membrana de 0,44 μ m de porosidade, processo ilustrado na figura 2, enquanto o precipitado foi descartado. O extrato bruto foi submetido então a secagem por atomização *spray dryer* nos parâmetros: fluxo de alimentação 0,7L/h, temperatura de entrada 112°C, fluxo de ar 1,93m³/h e bico de 0,7mm. Os mesmos parâmetros foram escolhidos tendo em vista que a toxina *killer*, segundo apontado pela bibliografia, não é estável após ser submetida a altas temperaturas. O processo da secagem foi feito de 700mL por vez para não sobrecarregar o equipamento e em seguida o extrato seco foi pesado em frasco com rosca tarado para verificar o rendimento da secagem.

Figura 2 – Filtração do extrato de *H. wingei*



Fonte: Autoria própria (2020).

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO SECO

Para analisar a composição proximal do extrato seco, realizou-se as determinações de carboidratos totais, pelo método fenol-sulfúrico por Dubois et al. (1956) com adaptação; de proteínas totais pelo método de biureto proposta por Gornall et al. (1949), de umidade por

método infravermelho de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985); e determinou-se o resíduo mineral fixo (cinzas) submetendo as amostras a 550°C. Os resultados foram expressos em g/100 g (AOAC, 1995).

O método fenol-sulfúrico consiste na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e derivados incluindo os metil-ésteres e seus grupos redutores livres, após a desidratação pela ação do ácido sulfúrico e posterior complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra, deixando uma coloração amarronzada detectada pela absorvância na espectrofotometria visível. Para tal primeiramente foi feita uma curva padrão utilizando glicose 0,1%. Seguiu-se então a preparação da amostra, que consistiu na diluição dos extratos secos – estático e sob agitação – à concentração de 0,05g/mL e a 0,5mL dessas amostras acrescenta-se 0,5mL de fenol e 2,5mL de ácido sulfúrico. Esperou-se o tempo da reação e leu-se a absorvância no comprimento de onda de 550nm, comparando em seguida com a curva padrão.

O método de biureto consiste em acrescentar à mostra o sulfato de cobre em meio alcalino cujo cobre interage com as ligações peptídicas, conferindo uma coloração azulada ao meio, coloração esta que pode ser medida pela absorvância em espectrofotometria visível (540nm) e comparada a uma curva padrão para a determinação da concentração proteica. A curva padrão foi feita utilizando-se albumina bovina 0,1% e, para a preparação da amostra, diluiu-se os extratos secos – estático e sob agitação – à concentração de 0,12g/mL e a 1mL dessas amostras, após tratamento térmico, foi acrescentado 2,5mL de biureto, e, após o tempo de reação realizou-se a leitura da absorvância a 540nm, comparando em seguida com a curva padrão, para determinar o teor proteico.

Para a determinação da umidade, submeteu-se 3g dos extratos secos a 20min a 240°C de radiação infravermelha, que evapora a água e pesa gravimetricamente a diferença antes e depois da secagem, determinando o teor de água evaporada.

Para a realização da determinação do teor de cinzas, os extratos secos evaporados pelo método infravermelho foram transferidos para cadinhos tarados e colocados em mufla 550°C por 8 horas, pesando-se eles via balança analítica e a diferença entre o peso inicial e final é o teor de minerais, visto que os carboidratos, lipídios, proteínas e água foram evaporados devida a alta temperatura.

A determinação de lipídios foi feita por diferença, sendo somado o teor de umidade, cinzas, proteínas e carboidratos, o que faltar a 100% é teor lipídico.

4.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

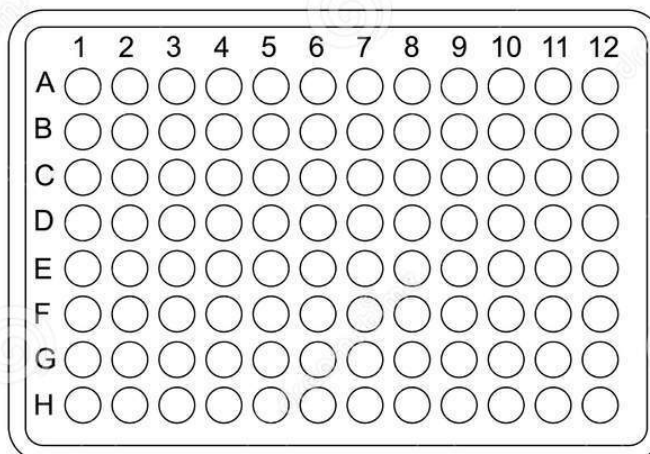
Para assegurar a eficácia da toxina *killer* após o processo de concentração por secagem, foram realizados testes de concentração mínima inibitória (CMI), com o extrato seco de Hw, diluído na concentração de 0,25g/mL. Como controle negativo foi empregado ácido láctico a 1,5%.

As bactérias testes foram ativadas em caldo BHI por 24hrs em estufa de crescimento a 38°C, e inoculadas em placas de meio Mueller Hinton (MH) para crescimento por mais 24hrs e adaptação ao meio de teste. Desta placa as colônias foram diluídas em caldo MH à escala 0,5 de McFarland o que corresponde a $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL e diluídas novamente 100x para a contagem correspondente a $1,5 \cdot 10^6$ UFC/mL.

Cada poço foi adicionado de 100µL de caldo MH e, à exclusão do controle, 100µL das bactérias testes ($1,5 \cdot 10^5$ UFC) e acrescentou-se seis alíquotas do extrato diluído, a saber: 50, 60, 70, 80, 90 e 100µL, constituindo assim seis concentrações de extrato seco a serem testados, visando assim saber a menor concentração possível que causa a inibição completa dos microrganismos testes. As concentrações são: 0,041g/mL, 0,05g/mL, 0,058g/mL, 0,066g/mL, 0,075g/mL e 0,083g/mL.

Na figura 3 apresenta-se o desenho esquemático das placas para realização da Concentração Mínima Inibitória. Com esse esquema poderá ser compreendido melhor os resultados descritos na sequência deste trabalho. Os microrganismos foram adicionados em colunas, em duplicatas, sendo 2-3 *Escherichia coli*, 4-5 *Salmonella* spp cepa A, 6-7 *Salmonella* spp cepa B, 8-9 *Staphylococcus* coagulase positiva cepa A, 10-11 *Staphylococcus* coagulase positiva cepa B. Nas linhas foram adicionadas concentrações crescentes de extrato seco de *H. wingei* na seguinte proporção: 0, 50, 60, 70, 80, 90 e 100µL e controle na linha H com ácido láctico a 1.5% e na coluna 1 sem inóculo.

Figura 3 – Esquema da placa de 96 poços utilizada para determinar CMI



Fonte: TEMPLATES (2012).

4.5 ISOLAMENTO DA TOXINA *KILLER* POR ELETROFORESE

Devido às questões levantadas pela CMI e caracterização proximal do extrato seco produzido do caldo de crescimento da *H. wingei*, viu-se como necessária a realização de outra análise, a eletroforese, para isolar da toxina *killer* entre as proteínas presentes no extrato, sendo que correspondem a aproximadamente 4,3% do produto. A eletroforese consiste na separação das diferentes proteínas presentes numa amostra de acordo com sua densidade e afinidade elétrica, fazendo a amostra correr por um gel e um meio líquido ionizado.

Para a realização desse experimento foram utilizadas as placas *Pre-cast for SDS-PAGE*, kit para eletroforese em gel de poliacrilamida da Sigma-Aldrich, na concentração de 20% de gel, e tampões *Tris-MOPS SDS* compatíveis da mesma empresa, seguiu-se o protocolo neles expresso (SIGMA-ALDRICH, 2012)

Os tampões de corrida foram diluídos na concentração indicada e também foi preparado o antioxidante, conforme indicado para o tampão de corrida rápida utilizado. O preparo da amostra foi feito na seguinte proporção: Diluição do extrato seco (1:5) em cinco concentrações diferentes (5%, 10%, 15%, e 20%), 25% de tampão de amostra (4x), 10% de redutor de amostra DDT (10x) e água ultrapura totalizando 30 μ L de amostra. Uma amostra de padrão também foi preparada usando 10% de proteína. Em seguida aqueceu-se as amostras em banho maria por 10 minutos a $\pm 70^{\circ}\text{C}$ para promover a abertura dos enovelamentos proteicos. As placas de gel foram preparadas e cobertas com a mistura de tampão de corrida e antioxidante. Inseriu-se então os 30 μ L de amostra nos poços da placa em duplicata com o auxílio de uma micropipeta conforme a figura 4 I e II. Em seguida a corrente elétrica foi

ligada em voltagem constante (180V) por cerca de 50min, esperando que a tintura azulada chegasse até o fim da placa.

Para visualizar os resultados da corrida, a placa passou então por processo de coloração. Utilizou-se uma solução de 40% etanol/10% ácido acético e 0,1% Coomassie Azul Brillhante. A placa foi retirada da cuba de corrida e lavada gentilmente com água destilada para remover a solução tampão, em seguida deixada recoberta pela solução Coomassie sob agitação leve de 60rpm por 30min e por fim deixado recoberto numa solução descorante (20% etanol e 5% ácido acético por 24 horas.

Figura 4: Aplicação das amostras na placa de gel de poliacrilamida



I- Aplicação na cuba de corrida utilizando II- Detalhe da diferença dos poços com e sem amostra.

Fonte: Autoria própria (2020).

4.6 EFICÁCIA DO EXTRATO SECO EM CMS

A amostra de CMS de frango cedida pela empresa fora analisada pela mesma, conforme a legislação vigente (BRASIL, 2000), seguindo o método FDA 7th Ed., 1992. para *Salmonella spp.* *Staphylococcus aureus*, assim como mesófilos aeróbios e todos os resultados apresentaram-se dentro dos padrões. Essa análise prévia visou descartar a possibilidade de contaminação cruzada ou influência de microrganismos já existentes.

Para avaliar a eficácia antimicrobiana do extrato seco, a CMS foi fracionada em 36 porções de 25g em sacos plásticos estéreis, identificados de acordo com o inóculo que receberia e o período que permaneceria congelada. Das 36 amostras, 12 foram inoculadas com uma alíquota de *Staphylococcus* coagulase positiva, 12 com *E. coli* (representando microrganismos mesófilos) e 12 com *Salmonella* spp., todos os microrganismos eram de culturas com 24h de crescimento e 24h de armazenamento em caldo BHI e o inóculo foi padronizado na proporção $1,5 \cdot 10^5$ UFC/g de amostra. Entre as amostras que receberam inóculo bacteriano: 3 receberam uma solução de água e nitrato de sódio de forma a ficarem com a concentração de 0,03g/100g sendo o padrão (P) para simular a aplicação dos sais de cura em produtos cárneos em que a CMS é utilizada; 6 receberam inóculo de extrato seco de Hw, sendo 3 de extrato de regime estático (Hw1) e 3 de extrato de regime de agitação (Hw2), ambos foram diluídos em água estéril (1:1), o inóculo foi de forma a ficar com concentração do extrato de 83mg/g de CMS; as últimas 3 amostras não receberam nenhum inóculo ou tratamento, sendo o controle (C).

Após a separação, inóculo e homogeneização e identificação das amostras, elas foram congeladas a -8° C por até 90 dias, conforme indica a legislação para CMS (BRASIL, 2000). No marco 30, 60 e 90 dias, 12 amostras foram retiradas para análise, sendo uma para cada tipo de tratamento. As análises realizadas foram adaptadas dos seguintes métodos: Método de plaqueamento APHA 39.63:2015 para *Staphylococcus aureus* (para as amostras com inóculo de Estafilococos coagulase positiva), Método de plaqueamento APHA 08:2015 para contagem total de aeróbios mesófilos (para as amostras com inóculo de *E. coli*), Método ISO 6579 para presença/ausência de *Salmonella* em alimentos (para as amostras com inóculo de *Salmonella* spp) segundo a descrição de Silva et al. (2018). Todos os plaqueamentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em UFC/g. Para análise de *Salmonella*, os resultados foram expressos em presença ou ausência em 25 g.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de crescimento as leituras de absorbância via espectrofotometria indicaram turbidez do meio devido ao crescimento da levedura. No quadro 2 pode ser observado a diferença entre a amostra incubada sob agitação e a amostra mantida estática. A maior absorbância das amostras de crescimento sob agitação desde as primeiras 24 horas indica maior turvação, logo maior crescimento celular.

Quadro 2: Absorbância dos sistemas de crescimento de *Hansenula wingei*

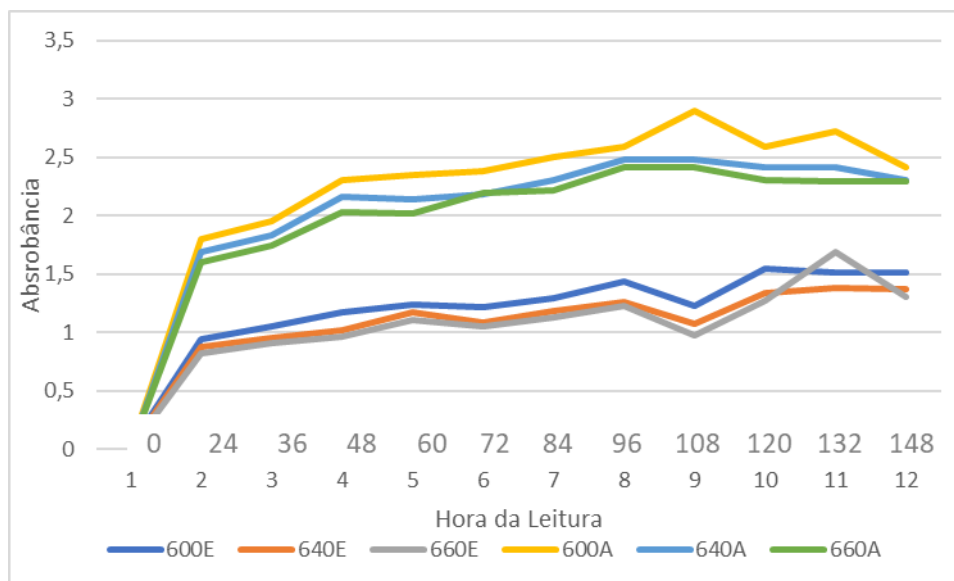
Tempo (h)	600nm		640nm		660nm	
	Estático	Agitação	Estático	Agitação	Estático	Agitação
0	0,035	0,038	0,025	0,031	0,022	0,025
24	0,945	1,805	0,873	1,69	0,825	1,6
36	1,046	1,957	0,949	1,828	0,909	1,741
48	1,169	2,303	1,023	2,162	0,962	2,031
60	1,243	2,353	1,167	2,146	1,109	2,025
72	1,213	2,384	1,084	2,183	1,049	2,197
84	1,296	2,5	1,188	2,306	1,128	2,214
96	1,436	2,597	1,264	2,482	1,227	2,411
108	1,231	2,896	1,073	2,48	0,978	2,411
120	1,547	2,597	1,336	2,416	1,271	2,306
132	1,519	2,721	1,382	2,414	1,693	2,294
148	1,516	2,42	1,373	2,305	1,304	2,297

Fonte: Autoria própria (2020).

Observando o gráfico 1 fica evidente a diferença entre as leituras de absorbância do sistema estático (600E, 640E, 660E) e com agitação (600A, 640A, 660A). A partir da visualização das curvas de crescimento, foi observado que o crescimento das leveduras sob sistema de agitação, demonstrado pela turvação do meio, é cerca do dobro das leveduras sob sistema estático, levando a crer que o crescimento sob agitação é maior, corroborando com os dados de que a *Hw* é uma levedura aeróbia restrita, quando sob o sistema de agitação o oxigênio se torna mais disponível para as células promovendo um maior crescimento numérico.

Através da análise realizada, o comprimento de onda de 600nm é o melhor para acompanhar o crescimento da *Hw* tanto para o sistema estático quanto para o com agitação

Figura 5 - Curvas de crescimento para *Hansenula wingei*



Crescimento em sistema: agitação (A) e estático (E)

Fonte: Autoria própria (2020).

Em relação a pesagem dos extratos, obteve-se um rendimento médio de 0,55% sobre o extrato bruto no sistema estático e de 1,13% sobre o extrato bruto no sistema sob agitação. A partir das determinações físico-químicas obteve-se os resultados expressos na Tabela 1. Foi realizado teste T para verificar se há diferença significativa entre as médias obtidas entre os diferentes sistemas de crescimento.

Tabela 1 - Composição proximal dos extratos secos de *Hansenula wingei*

	Agitação (%)	Estático (%)
Carboidratos	5,73(±0,31) ^a	4,40(±0,7) ^b
Proteínas	4,26(±0,66)	4,37(±0,01)
Umidade	10,45(±0,35) ^b	12,65(±0,35) ^a
Cinzas	49,6(±1,7)	48,72(±0,32)
Lipídios	30,18	31,5
Total	100	100

a,b - Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que as amostras são diferentes entre si.

Fonte: Autoria própria (2020).

Os resultados da composição proximal levantam uma série de dúvidas. A diferença entre as composições dos extratos não responde a diferença na eficácia da secagem, sendo que

o extrato sob sistema de agitação apresentou o dobro do rendimento. A principal diferença está relacionada aos teores de carboidratos e umidade. Todavia proteínas, que é o ponto chave deste estudo não apresentou diferença significativa entre ambos os sistemas de crescimento.

A concentração de cinzas está em concordância com a quantia inserida no meio de cultivo das leveduras que foi adicionada na forma de sulfato de amônio e cloreto de sódio. Observa-se os pontos brancos na figura 6, que são cristais de sal, resultantes de sua elevada concentração no extrato, uma vez que o próprio meio de crescimento da levedura é rico em sulfato de sódio, sulfato de amônio e cloreto de sódio.

Figura 6 – Extrato seco de *Hansenula wingei* pós secagem por infravermelho

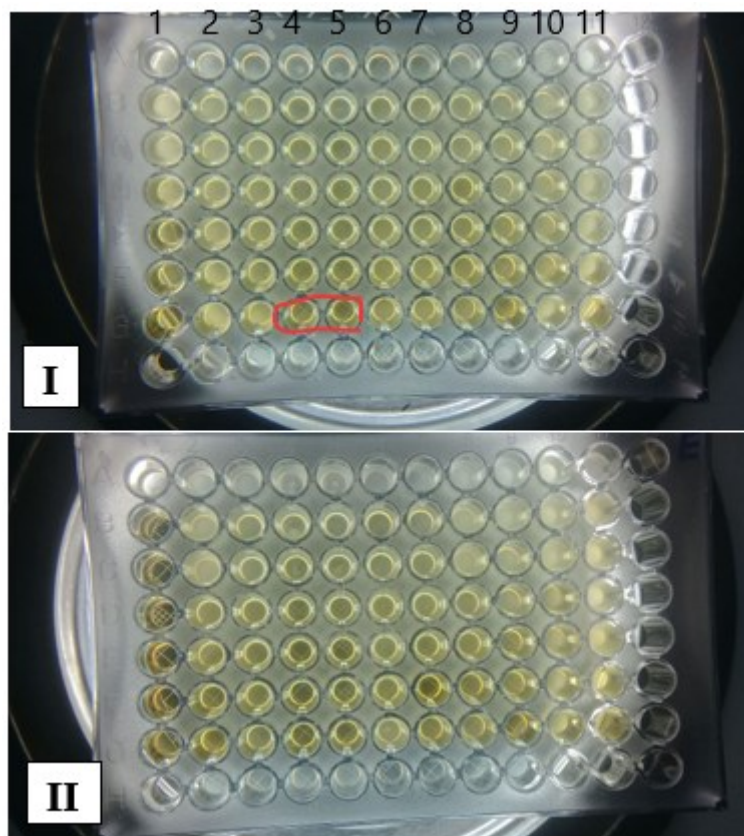


Fonte: Autoria própria (2020).

Outro questionamento é o alto teor lipídico encontrado, que não está de acordo com a alta solubilidade do extrato seco em água, formando uma solução homogênea com facilidade. Essa discrepância pode ser fruto da metodologia usada e outras análises para a determinação de lipídios poderiam auxiliar nessa confirmação. Acredita-se, a priori, que há uma incoerência nesse resultado, necessitando repetir as análises de composição proximal e quantificar efetivamente lipídios totais.

Sugere-se que metodologias mais sensíveis sejam testadas para análise de carboidratos e proteínas, uma vez que as metodologias utilizadas nesse estudo podem não ter sido as mais adequadas para o extrato seco de *Hw*.

Figura 7 – Placas de Concentração Mínima Inibitória (CMI) de extrato diluído de *H. wingei*



I- Inibição por extrato sob agitação; II- Inibição por extrato em sistema estático.

. Colunas: 1 = Controle negativo; 2-3 = *E. coli*; 4-8 = *Salmonella* spp.; 9-11 = *Staphylococcus coagulase positiva*.

Fonte: Autoria própria (2020).

A partir dos testes de antagonismo na placa de 96 poços, observando a turvação dos poços, sendo que quanto menos turvo, maior a inibição das bactérias testes, obteve-se resultados distintos entre o extrato sob agitação e sob sistema estático, conforme pode ser visualizado na figura 7. Na placa utilizando o extrato sob agitação apresentou inibição de apenas uma das cepas patógenas (*Salmonella* spp.) na maior concentração testada, de 0,083g/mL (circulada na figura). Enquanto na placa que foi utilizado extrato seco no sistema estático, houve inibição de algumas cepas em concentrações menores, como de *Salmonella* spp. a 0,066g/mL, e também houve inibição da cepa de *E. coli* e inibição mesmo que não completa de *Staphylococcus coagulase positiva*. A CMI definida, a partir destas observações foi de 0,083g/mL, a maior concentração testada, uma CMI alta, tendo em vista que o extrato já passou por um processo de concentração por secagem, mas mesmo sabendo o teor proteico (4-6%) do extrato, o teor da toxina *killer*, inserido nessa porcentagem é ainda desconhecido, para o qual seguiu-se a eletroforese.

Quanto à eletroforese, tanto antes quanto após a coloração da placa de gel se configurou impossível ver as bandas características de qualquer densidade proteica. Algumas hipóteses foram levantadas: a) a concentração proteica na amostra estava dentro da sensibilidade do método, porém como na corrida há a separação das proteínas por seu peso, cada uma individualmente pode estar em concentração inferior a essa sensibilidade, portanto não sendo demarcada e b) pode ter havido uma alteração no preparo da amostra, tanto no tratamento térmico, já que o banho maria teve que ter sua temperatura controlada manualmente, ocorrendo variações de até 10°C, quando na própria mistura para a amostra, visto que alguns reagentes, como o redutor DDT é acrescentado em volume muito pequeno (1-3µL) gerando possibilidade de erro. Conclui-se que novas tentativas, com géis de poliacrilamida, devem ser realizadas, aumentando a concentração do extrato, que consequentemente aumentará a concentração de proteína injetada no gel, assim havendo possibilidade de melhor padronização das amostras para este tipo de metodologia.

Quanto às análises microbiológicas da CMS inoculada os resultados são apresentados abaixo no quadro 4, sendo que Controle se refere às amostras que receberam inóculo do microrganismo teste, mas nenhum tratamento. Padrão se refere às amostras que receberam além do inóculo, tratamento com sal de cura enquanto Hw1 e Hw2 se referem às amostras que receberam além do inóculo, tratamento com extrato seco de *Hw* de crescimento respectivamente estático e sob agitação.

Quadro 3 - Contagem das colônias de microrganismos inoculados em CMS de aves (em UFC/g)

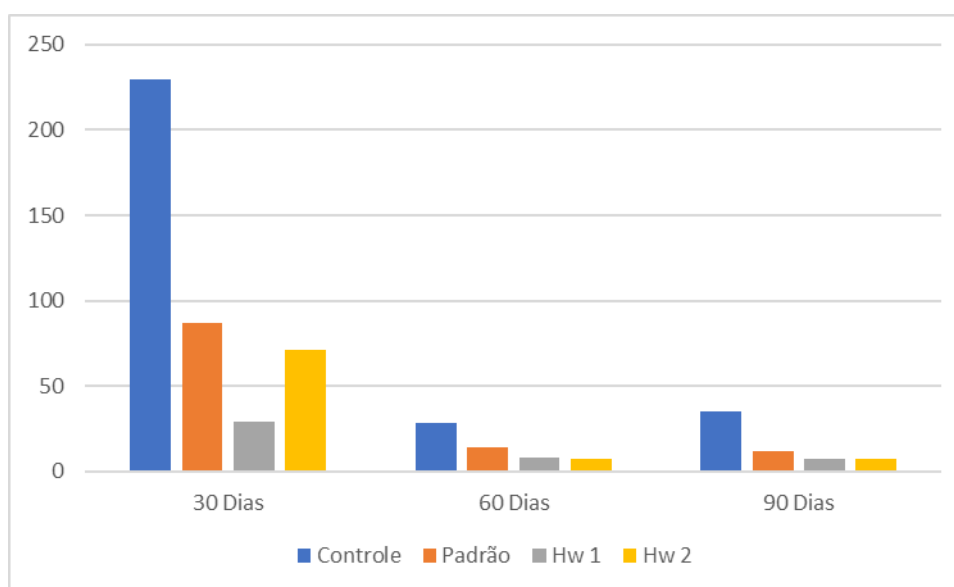
<i>Staphylococcus</i>			
	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Controle	1,2.10 ⁴	<10	<10
Padrão	3,5.10 ²	<10	<10
Hw 1	5.10 ²	<10	<10
Hw 2	3,5.10 ³	<10	<10
<i>Mesófilos</i>			
	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Controle	2,3.10 ⁴	2,8.10 ³	3,5.10 ³
Padrão	8,7.10 ³	1,4.10 ³	1,2.10 ³
Hw 1	2,9.10 ³	8,2.10 ²	6,9.10 ²
Hw 2	7,1.10 ³	6,7.10 ²	7,1.10 ²

Controle = Sem tratamento; Padrão = tratamento de sais de cura; Hw 1 = tratamento com extrato seco estático; Hw 2 = tratamento com extrato seco com agitação

Fonte: Autoria Própria (2021)

A ausência de colônias típicas de *Salmonella* sp. nos meios de cultura seletivos e diferenciais está relacionado com a temperatura de congelamento, uma vez que apresentam crescimento inibido mesmo em faixas consideradas baixas como 2°C, mas dificilmente em temperaturas de congelamento (D'AUST, 1991). Nota-se um crescimento mais expressivo de mesófilos em relação ao de colônias típicas de *Staphylococcus*, isso pode ser em grande parte devido às conhecidas proteínas de choque frio, conhecidamente presentes em *E. coli* (PHADTARE, 2004). Quanto à eficácia do extrato seco de *Hw* na ação antimicrobiana, é mais observável na contagem de mesófilos aeróbios, conforme o gráfico 2.

Figura 8 - Contagem de Mesófilos em CMS de aves (em 100UFC/g)



Fonte: Autoria própria (2021).

Percebe-se, naturalmente, a diferença entre a contagem de microrganismos nos diversos tratamentos, em especial na análise feita aos 30 dias. A diferença entre as contagens de 30 e 60 dias é em grande parte devido à morte celular dos microrganismos que não foram capazes de se manter em temperatura de congelamento por muito tempo. Nota-se também como mesmo em 30 dias a contagem do controle está abaixo do inóculo, sendo este $1,5 \cdot 10^5$ e aquele $2,3 \cdot 10^4$, o que também indica o efeito negativo do congelamento nas bactérias, principalmente pela lise celular causada pela formação de cristais de água (MADIGAN et al. 2019). Pode-se constatar a diferença entre as amostras tratadas e a controle, e entre a amostra tratada com extrato seco de *Hw* de crescimento estático e os demais tratamentos, concluindo que o extrato seco obtido da fermentação estática de *Hw* possui maior ação antimicrobiana que os sais de cura utilizados tradicionalmente pela indústria cárnea, o que reforça de maneira imperativa a hipótese de sua aplicação como bioconservante na CMS.

Na tabela 2 é comparado o fator de inibição dos extratos secos de *Hw* com o padrão usado de sais de cura, relacionando a contagem microbiana dos diferentes tratamentos com a contagem realizada no controle, ambas expressas no quadro 3. Quanto maior a porcentagem, maior a inibição do crescimento microbiano e percebe-se que na contagem de *Staphylococcus* o tratamento padrão da indústria tem eficácia semelhante à com extrato seco de *Hw* em sistema estático, enquanto na contagem de mesófilos, o mesmo extrato tem eficácia bem superior em todas as contagens, o que indica que o extrato seco de *Hw* de sistema estático possui uma ação de inibição igual ou superior que dos sais de cura usados tradicionalmente como antimicrobianos na indústria cárnea.

Tabela 2 - Redução da carga microbiana em CMS congelada em relação ao Controle (em %) com diferentes tratamentos

<i>Staphylococcus</i>			
Tratamento	30 dias	60 dias	90 dias
Padrão	97,1	0	0
Hw 1	95,8	0	0
Hw 2	70,83	0	0
Mesófilos			
Tratamento	30 dias	60 dias	90 dias
Padrão	62,17	50,0	65,7
Hw 1	87,39	70,7	80,3
Hw 2	69,13	76,1	79,7

Padrão = tratamento de sais de cura; Hw 1 = tratamento com extrato seco por sistema estático; Hw 2 = tratamento com extrato seco por sistema com agitação

Fonte: Autoria própria (2021).

Avaliando em linhas gerais pelos dados apresentados em comparação com os parâmetros expressos por Jones, Wescombe e Tagg (2011) para distinguir um potencial bioconservante, pode-se considerar o extrato seco de *Hw*: Atóxico e regulamentado pois é produzido por uma linhagem com reconhecimento GRAS; de baixo custo, pois tanto o meio de crescimento, seu processo e secagem são processos baratos e com matéria prima encontrada facilmente; efetivo em baixas concentrações, pois tanto a CMI quanto o teste em CMS provaram sua eficácia na concentração de 8,3%; sem aplicações médicas, já que não foram encontradas publicações propondo o uso do extrato de *Hw* para usos médicos. Ficam enfim para futura pesquisa a avaliação do impacto sensorial da aplicação do extrato seco em alimentos e da sua eficácia após período prolongado de resfriamento ou congelamento.

6 CONCLUSÃO

Considera-se viável a concentração do produto de crescimento da *Hansenula wingei* por meio de secagem *spray dryer* nos parâmetros utilizados assim como sua utilização como antimicrobiano *in vitro* e *in loco*, sendo que o mesmo apresentou melhor eficácia que os sais de cura usados pela indústria como antimicrobianos. Futura pesquisa é necessária para esclarecer a composição proximal do extrato assim como a relação do regime de fermentação com o fator inibitório e a determinação do teor de toxinas *killer* no extrato seco. Também outras pesquisas devem ser realizadas para avaliar a aplicação do extrato seco de *H. wingei* em emulsões cárneas ou em biofilmes para cobertura de carcaças. De qualquer forma desenvolvimento do campo no debate científico e tecnológico contribui para a possibilidade de novos aditivos de alimentos serem desenvolvidos e aceitos a nível industrial e comercial.

REFERÊNCIAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2018**. Carne de frango. ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. São Paulo. Brasil. 2018. p. 30-64.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the **Association of the Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1995.
- BERAQUET, N.J. Carne mecanicamente separada de aves. In: **Seminário e curso teórico-prático “agregando valor à carne de aves”**. Campinas, 2000. Campinas: CTC, ITAL, 2000.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS) de Aves, Bovinos e Suínos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF 05 mai. 2000. Seção 1, p. 6. Disponível em: < http://enggetecno.com.br/port/legislacao/carnes_cms.htm > Acesso em: 27 abr. 2021
- _____. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento Técnico para Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF. 14 dez. 1998.
- CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, Ana L.L. Salmonella spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Cienc. Rural**, vol.35, no.6 Santa Maria Nov./Dec. 2005
- CARVALHO, A. C. F. B. et al. Avaliação microbiológica da carne de ave mecanicamente separada (CAMS). **Higiene Alimentar**, v.16, n.98, p.91-100, 2002.
- CARVALHO, O. L. P. São Ricardo Musse. **Diário do Comércio**. Uberlândia: 8 out. 2007. Disponível em: < <https://olavodecarvalho.org/sao-ricardo-musse/> > Acesso em: 19 mai. 2021.
- DELVES-BROUGHTON, J.; WEBER, G. “Nisin, natamycin and other commercial fermentates used in food biopreservation” p. 63-99. In: LACROIX, C. **Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011.
- DUBOIS et al. - DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method Form Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, v. 28, n. 3, p. 350 — 356, 1956.
- FONTANA, H. Y. Y.; PAIÃO, F. G.; PEDRÃO, M. R.; COELHO, A. R.; **Purificação parcial de toxina killer de *Hansenula wingei* visando aplicação no controle do desenvolvimento de fungos filamentosos deteriorantes de alimentos**, p. 199 -218. In: Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas - Vol. 3. São Paulo: Blucher, 2017

FRONING, G.W.; MCKEE, S.R.; Mechanical separation of poultry meat and its use in products. In: SAMS, A.R. (Ed.). **Poultry meat processing**. Boca Raton: Lewis Publishers. Cap. 14, p.243-256, 2001.

GÁLVEZ, A.; BURGOS, M. J. G; LOPEZ, R. L.; PULIDO, R. P. **Food Biopreservation**. New York: Springer, 2014. 121p.

GARCIA, T.C.L.F. **Avaliação da qualidade microbiológica de carnes mecanicamente separadas de origem avícola obtidas por dois processos de produção**. 2002. 66f. Dissertação (Mestrado) - UNESP, Jaboticabal.

GASPERINI, A. M. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2011.

GONÇALVES, R. M. **Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em CMS (carne mecanicamente separada) de frango e de bovino produzidas no estado de Goiás**. Goiânia, GO: Escola de Veterinária, 2006. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal De Goiás, 2006.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**. Vol.177, p. 751-766

HUANG, S et al. Spray Drying of Probiotics and Other Food-grade Bacteria: A Review. **Trends in Food Science & Technology** doi: 10.1016/j.tifs.2017.02.007. 2017

INSTITUTO ADOLFO LUTZ; **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 1985, p. 21.

JONES, R. J.; WESCOMBE, P. A.; TAGG, J. R. "Identifying new protective cultures and culture components for food biopreservation" p. 3-26. In: LACROIX, C. **Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011.

JUNIOR, O. D. R.; GARCIA, T. C. L. F. Avaliação da qualidade microbiológica de carnes mecanicamente separadas de origem avícola obtidas por dois processos de produção. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 14, n. 3, p. 133-138, set./dez. 2007.

LIU, G. et al. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. **Crit. Rev. Biotechnol**, Early Online: 1–13. 2013

LOH, T. C.; CHONG, S. W.; FOO, H. L.; LAW, F. L. Effects on growth performance, faecal microflora and plasma cholesterol after supplementation of spray-dried metabolite to postweaning rats. **Czech Journal of Animal Science**. Vol. 54, no. 1. 2009, p. 10-16

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. New York: Pearson. 2019.

MARTINS, R. A. **Biocontrole *in vitro* de bolores deteriorantes por toxina Killer de levedura antagonista**. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos) – UTFPR, Londrina

MENDES, F. R. et al. Utilização de antimicrobianos na avicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**. Vol. 10. No. 02. p. 2352 – 2389. Março-Abril. 2013.

NUNES, P. T. **Efeito da pré-cura na estabilidade microbiológica da carne mecanicamente separada e elaboração de um produto reestruturado de filés de peito de galinhas de descarte**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 2003. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, 2003.

OCDE-FAO. **Perspectivas Agrícolas 2015-2024**. OECD Publishing, Paris. 2014. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/ocde-fao-perspectivas-agricolas-2015_agr_outlook-2015-pt>. Acesso em: 24 out. 2019.

OCDE. **Relatórios Econômicos OCDE: Brasil**. OECD Publishing, Paris. 2018. Disponível em: <<https://www.oecd.org/eco/surveys/economic-survey-brazil.htm>>. Acesso em: 19 out. 2019.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137(2– 3), p. 312–316. 2010.

PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal De Santa Maria, 2009.

PHADTARE, S. Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. **Curr. Issues Mol. Biol.** Vol.6. 2004. p. 125-136

POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the Yeast Killer Phenomenon. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 24, no. 5 Nov. 1986, p. 866-869

SHULZE, E. CHARCUTARIA. **Carne Mecanicamente Separada CMS, 2017**. Disponível em: <<https://charcutaria.org/diversos/carne-mecanicamente-separada-cms/>>. Acesso em: 04 nov. 2019.

SIGMA-ALDRICH. **TruPAGE Precast Gel System Technical bulletin**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/2/pcg2012bul.pdf>> Acesso em: 17 ago. 2020.

SILVA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água 5e**. São Paulo: Blucher, 2018. 561p

SILVEIRA, V. A. I. **Avaliação do potencial antimicrobiano dos soforolipídios de *Candida bombicola* contra bactérias contaminantes da indústria avícola**. 2019. 107p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Londrina. 2019.

SIMER, P. **Efeito de frações ultrafiltradas do cultivo de *Hansenula wingei* no controle de *Penicillium expansum* e *Apergillus ochraceus***. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2013.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. The Importance of The HALAL Market for Brazil's Chicken Exports. **Brazilian Poultry Magazine**. Brazilian Poultry Association (UBABEF), São Paulo, Brasil. No. 2. p. 07-10. 2013.

TEMPLATES. **Cell Signaling Networks**. Disponível em: . Acesso em: 24 out. 2019

TRINDADE, M.A.; DE FELÍCIO, P.E.; CASTILLO, C.J.C. Mechanically separated meat of broiler breeder and white layer spent hens. **Scientia Agricola**. (Piracicaba, Braz.), v.61, n.2, p.234-239, Mar./Apr. 2004.

VAN BOGAERT, I. N. A., ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, 46(4), 821–833. 2011.

XIN, H. L.; MUJUNDAR, A. S. Spray Drying and Its Application in Food Processing. In: RIBEIRO, C. P.; PASSOS, M. L. **Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2010.