

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

MARIANA MEDEIROS HERGESEL
RENATA DE ARAUJO ROCHA

**PRODUÇÃO DE EXTRATO SECO DE *Hansenula wingei*:
COMPOSIÇÃO PROXIMAL E ESTUDO DE SUA APLICAÇÃO EM
CARNE DE FRANGO COMO POSSÍVEL ANTIMICROBIANO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2021

MARIANA MEDEIROS HERGESEL
RENATA DE ARAUJO ROCHA

**PRODUÇÃO DE EXTRATO SECO DE *Hansenula wingei*:
COMPOSIÇÃO PROXIMAL E ESTUDO DE SUA APLICAÇÃO EM
CARNE DE FRANGO COMO POSSÍVEL ANTIMICROBIANO**

**Production of dry extract of *Hansenula wingei*: proximal composition and
application in antimicrobial potential chicken meat**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Mayka Reghiany Pedrão

LONDRINA
2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

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

PRODUÇÃO DE EXTRATO SECO DE *Hansenula wingei*: COMPOSIÇÃO PROXIMAL E ESTUDO DE SUA APLICAÇÃO EM CARNE DE FRANGO COMO POSSÍVEL ANTIMICROBIANO

MARIANA MEDEIROS HERGESEL
RENATA DE ARAUJO ROCHA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 09 de dezembro de 2021 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos e foi avaliado pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Mayka Reghiany Pedrão
Prof.(a) Orientador(a)

Profa. Dra. Amelia Elena Terrile
Membro Avaliador da Banca 1

Prof. Dr. Claudio Takeo Ueno
Membro Avaliador da Banca 2

Dedico este trabalho a todos que, de
maneira direta ou indireta, nos permitiram
e contribuíram em sua conclusão .

AGRADECIMENTOS

Durante a vida tudo o que aprendemos é oriundo de pessoas a nossa volta, sejam elas, familiares, professores ou outros, e se aqui estamos hoje é por todos que estiveram ao nosso lado nesta caminhada, sejam por palavras ou outros meios, á vocês toda a gratidão.

Algumas pessoas meu direto agradecimento, pois, sem elas não seria possível a conclusão deste trabalho:

Primeiramente a nossa orientadora prof. Dr. Mayka Reghiany Pedrão por todo o conhecimento passado, pela disponibilidade ao longo da execução deste, e por nos mostrar que não é impossível quando se há uma equipe dedicada.

Ao prof. Dr. Alexandre Coelho pela disponibilização de cepas.

Aos técnicos de laboratório pela disponibilidade com os equipamentos.

À Jael Carneiro pelo auxílio nos testes em carnes de aves.

A todos que trabalham no campus, que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste.

À secretaria do curso, pela cooperação.

E o nosso profundo reconhecimento à nossas famílias, pois acreditamos que sem o apoio deles seria muito difícil chegar até aqui.

A menos que modifiquemos à nossa
maneira de pensar, não seremos capazes
de resolver os problemas causados pela
forma como nos acostumamos a ver o
mundo.

(Albert Einstein)

RESUMO

O mercado de carnes e alimentos em geral busca incansavelmente por alimentos com reduzido teor de aditivos químicos. Logo estudar a viabilidade de novos métodos de conservação com ênfase no controle microbiano se faz necessário para expandir o mercado de carnes. Partindo-se dessa premissa, este estudo focou-se em cepa da levedura *Hansenula wingei* que é produtora de toxinas killer, que atua como fator antimicrobiano, para a cultura e extração de um conservante natural para aplicação em carne de frango, especificamente peito. A levedura foi fermentada aerobiamente em meio e condições específicas. O extrato de levedura passado por processo de secagem por atomização (spray dryer) foi testado *in vitro* e em amostras de peito de frango. O extrato seco obtido após secagem foi analisado e sua composição proximal foi determinada. As metodologias empregadas foram umidade em estufa 105°C, cinzas em mufla a 550°C, lipídios por Folch (1957) com adaptações, carboidratos por Fenol-Sulfúrico e proteínas por Bradford. Os resultados obtidos foram: 13,23%; 9,11%; 1,00%; 4,00% e 39,91% para carboidratos, proteínas, lipídios, umidade e cinzas, respectivamente. Do mesmo extrato foi definido a concentração inibitória mínima frente aos microrganismos *Staphylococcus* sp, *Salmonella* sp e *Escherichia coli*, onde se obteve a concentração de 8,3%, do extrato seco como um fator de inibição viável para inibição destes três microrganismos. A partir de então os testes *in situ* foram realizados em peito de frango refrigerado pelo período de quinze dias somente para a *Salmonella* sp. Os resultados obtidos foram satisfatórios em relação a redução deste microrganismo durante o período de armazenamento, indicando um potencial antimicrobiano viável para o extrato seco de *Hansenula wingei*.

Palavras-chave: toxina killer; conservante natural; bioconservante; carne de aves; *Salmonella* sp.

ABSTRACT

The meat and food market in general is relentlessly looking for foods with a reduced content of chemical additives. Therefore, studying the feasibility of new conservation methods with an emphasis on microbial control is necessary to expand the meat market. Based on this premise, this study focused on a *Hansenula wingei* yeast strain that produces killer toxins, which acts as an antimicrobial factor, for the culture and extraction of a natural preservative for application in chicken meat, specifically breast. Yeast was aerobically fermented in specific medium and conditions. The yeast extract passed through a spray drying process was tested *in vitro* and in chicken breast samples. The dry extract obtained after drying was analyzed and this proximal composition was determined. The methodologies used were moisture 105°C, ash at 550°C, lipids by Folch (1957) with adaptations, carbohydrates by Sulfuric Phenol and proteins by Bradford. The results obtained were: 13.23; 9.11; 1.00; 4.00 and 39.91 for carbohydrates, proteins, lipids, moisture and ash, respectively. The minimum inhibitory concentration against *Staphylococcus* sp, *Salmonella* sp and *E. coli* was defined from the same extract, where a concentration of 8.3% of the dry extract was obtained as a viable inhibition factor for the inhibition of these three microorganisms. From then on, *in situ* tests were performed on refrigerated chicken breast for a period of fifteen days only for *Salmonella* sp. The results obtained were satisfactory in relation to the reduction of this microorganism during the storage period, indicating a viable antimicrobial potential for the dry extract of *Hansenula wingei*.

Keywords: Killer toxin; Natural preservative; Biopreservatives; Poultry meat; *Salmonella* sp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Levedura <i>Hansenula wingei</i>	15
Figura 2 – Ação da toxina killer da levedura <i>Cryptococcus pinus</i>	16
Figura 3 – Resultado do crescimento da levedura.....	18
Figura 4 – Secagem do extrato por spray dryer.....	19
Figura 5 – Tubos preparados pelo método Fenol-Sulfúrico.....	20
Figura 6 – Tubos preparados pelo método de Bradford.....	20
Figura 7 – Mufla com amostras para quantificação de cinzas.....	21
Figura 8 – Placa de 96 poços empregada na metodologia.....	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição proximal (%) do extrato seco de <i>Hansenula wingei</i>	24
Quadro 2 – Contagem de UFC/g da incubação de <i>Salmonella</i> e ácido acético do dia 1 e 15.....	25
Quadro 3 – Contagem de UFC/g da incubação de <i>Salmonella</i> sp do dia 1 e 15.	26
Quadro 4 – Contagem de UFC/g da incubação de <i>Salmonella</i> sp e <i>Hansenula wingei</i> do dia 1 e 15.....	26
Quadro 5 – Comparação de resultados do dia 15 do peito de frango com e sem extrato seco de <i>Hansenula wingei</i>	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	12
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
3 ANTIMICROBIANO NATURAL	13
3.1 <i>HANSENULA</i>	14
3.1.1 Toxina <i>killer</i>	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 MATERIA EM ESTUDO	18
4.2 CRESCIMENTO DA LEVEDURA.....	18
4.2.1 Secagem do extrato bruto.....	19
4.2.2 Caracterização físico-química do extrato seco.....	19
4.2.3 Concentração mínima inibitória.....	22
4.3 TESTES <i>IN SITU</i>	23
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia está sempre em busca de inovações para atender as necessidades do consumidor, e tais necessidades se transformam com o tempo, seja pelo dinamismo da vida cotidiana ou pelo fluxo de informações disponíveis. No que se refere ao dinamismo que a vida das pessoas pode ter, inclui-se a necessidade de otimizar o seu tempo com produtos de fácil preparo afim de trazer mais praticidade. Em contrapartida, este estilo de vida trouxe a nossa sociedade problemas a saúde e com isso uma procura por alimentos mais saudáveis, que agreguem mais qualidade e que, de alguma forma, estejam mais “limpos”. Os consumidores, estão cada vez mais buscando alimentos que passaram por tratamentos tecnológicos menos drásticos, fabricados com pouco ou nenhum aditivo químico (CASABURI *et al.*, 2016).

Nesse contexto, produzir alimentos saudáveis, saborosos, naturais com menos aditivos e que se apresentam naturalmente inócuos, tem sido um desafio para a indústria (OSWELL; THIPPARERDDI; PEGG, 2018). Na indústria cárnea não é diferente, e os consumidores aumentaram a procura por produtos cárneos com redução de aditivos sintéticos. A indústria tem concentrado esforços na pesquisa e no desenvolvimento de substitutos naturais para esses aditivos (BALZAN *et al.*, 2017; ŠOJIC *et al.*, 2019).

Em relação aos conservantes hoje disponíveis no mercado temos, o ácido sórbico e derivados, ácido benzoico com seus sais, ácido propanoico com seus sais, dióxido de enxofre e derivados, ácido acético e acetatos, ácido p-hidroxibenzoico e ésteres (parabenos), ácido láctico com seus sais, nisina e a natamicina, e em grandes quantidades os nitritos e nitratos que são utilizados em toda a cadeia de produtos cárneos, atualmente a legislação brasileira permite a adição de sais de nitrito e nitrato de sódio até os valores máximos de 0,015g/100g e 0,03g/100g respectivamente. Entretanto, o consumo de sais de nitrito e nitrato de sódio podem causar danos à saúde, e se o consumo for expressivo pode levar à incidência de alguns tipos de cânceres (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010; ADAMI, *et al.*, 2015).

Visando alternativas menos nocivas ao consumidor, tem-se aumentado a busca por antimicrobianos naturais, logo houve a necessidade de inovação e novos

métodos de conservação. Atualmente, há estudos que utilizam extratos de produtos naturais como antimicrobianos, dentre estes encontra-se a *H. wingei*, uma levedura aeróbia obrigatória com caráter *killer*, que tem a capacidade de inibir o crescimento de outras leveduras sensíveis, e outros microrganismos por meio de exotoxinas de natureza proteica ou glicoproteica (FONTANA *et al.*, 2017).

Com uma maior procura por métodos que substituam os conservantes químicos por antimicrobianos naturais, institui-se no setor industrial a necessidade de melhorar e inovar qualitativamente seus produtos com a possibilidade de incorporação de compostos de origem natural. Para indústria de carnes isso não é diferente, especificamente no setor avícola, tanto para as carcaças quanto para os cortes existe uma preocupação constante com sua qualidade e controle microbiano. Sendo assim, a proposta que será desenvolvida tem como base a utilização de metabólitos secundários provenientes do processo de crescimento das leveduras dos gêneros *Hansenula* sp. como antimicrobianos e adjuvantes de formulação para produtos cárneos.

O fator *killer* dessa levedura é capaz de inibir o crescimento de fungos e bactérias, todavia ainda não foi testado em produtos cárneos. Conforme a legislação sobre aditivos em carnes e produtos cárneos, é permitido aplicar apenas alguns conservantes sintéticos (nitritos e nitratos) e alguns antioxidantes artificiais (BHA, BHT e Galato de propila). No Brasil, os conservantes e antioxidantes naturais não são previstos como aditivos para produtos cárneos, todavia os aditivos sintéticos são usados por sua demonstrada aplicabilidade e reconhecida eficácia na manutenção das características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas preservadas por um tempo determinado.

2 OBJETIVO

Produzir o extrato fermentado de *H. wingei*, realizar análise físico-química para obtenção de sua composição próxima, e analisar sua composição objetivando utilizar sua toxina *killer* como antimicrobiano em carnes de aves como possível redutor no crescimento de *Salmonella* spp.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter fermentado oriundo da levedura *H. wingei* para produção de peptídeo de baixo peso molecular (toxina *killer*);
- Testar a secagem do fermentado em *spray dryer* para obtenção de extrato seco;
- Fazer análise e caracterização físico-química do extrato seco;
- Realizar testes de concentração mínima inibitória do extrato seco;
- Realizar testes *in situ* (peito de frango) do extrato seco para controle de *Salmonella* spp.

3 ANTIMICROBIANO NATURAL

Os antimicrobianos naturais são compostos que inibem o crescimento de microrganismos incluindo os patógenos, podendo garantir um alimento saudável e seguro para o consumo, mantendo inalterada a qualidade dos alimentos. Por serem naturais não acarretam danos à saúde como os sintéticos já utilizados pela indústria, além de apresentarem propriedades que aumentam a vida útil dos alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Podem ser obtidos por vias de origem microbiana, animal e vegetal. São usados principalmente para inibir o crescimento de fungos e leveduras, e sua ação depende, em grande parte, do pH. Quanto mais ácido o alimento, mais ativo é contra os microrganismos ((BARROS, *et al.*, 2020; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010). Esses compostos interferem nas funções das células de microrganismos principalmente gerando modificações nas propriedades da membrana citoplasmática e no metabolismo energético além de inibirem a síntese de ácido nucleico (BARROS, *et al.*, 2020).

Estudos realizados pelo *Institute Food Technologist dos EUA* (IFT), revelaram que os mirtilos possibilitam a segurança da carne de maneira natural, pois suas propriedades reduzem o desenvolvimento de *Salmonella*, *Escherichia coli* e outros tipos de patógenos, após testes observou-se redução significativa do crescimento de bactérias, o responsável por esta redução é o composto denominado proantocianidina, que dificulta a aderência das bactérias, especialmente de *E. coli*. Alguns dos avanços obtidos têm sido no uso combinado dos agentes como a nisina e a lisozima, juntamente com alta pressão, ou a aplicação conjunta com tratamentos térmicos de baixa intensidade (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

É inegável que aditivos como os antimicrobianos naturais tem grande potencial de crescimento pela sua composição menos nociva a saúde, logo, cresce a procura por produtos de gênero mais natural e conseqüentemente a busca da indústria alimentícia para trazer alimentos com tais características (BARROS, *et al.*, 2020).

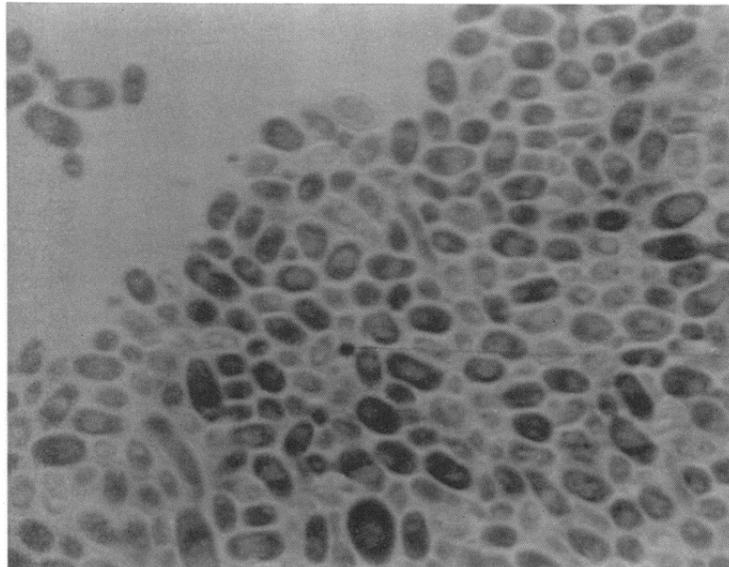
Este campo da biotecnologia já obteve diversos avanços nas últimas décadas, inclusive desenvolvendo antimicrobianos naturais amplamente usados na indústria como Nisina, bacteriocina utilizada na conservação de laticínios (SEBEN 2021).

Uma vez que as bactérias do ácido láctico (BAL) ocorrem naturalmente em muitos sistemas alimentares e têm um longo histórico de uso seguro em alimentos fermentados, portanto, geralmente reconhecido como seguro (GRAS), eles têm um grande potencial para uso estendido em biopreservação (GÁLVEZ et al. 2014).

3.1 HANSENULA

O gênero *Hansenula* tem como característica células esferoidais, elipsoidais ou alongadas e, em alguns casos, afuniladas. A reprodução assexuada é por brotamento multilateral e algumas espécies podem produzir pseudo-hifas (KURTZMAN; FELL, 1999).

Figura 1- Levedura *Hansenula Wingei*



Fonte: Thomas D. Brock (1958).

Baseado em estudos foi comprovado a produção de toxina *Killer* nos seguintes gêneros de *Hansenula*: *H. anômala*, *H. beckii*, *H. petersonii*, *H. polymorpha* e *H. wingei* (KAGIYAMA et al., 1988; ASHIDA et al., 1983). Quanto à *H. wingei*, além de apresentar o caráter *killer* é uma levedura aeróbia obrigatória e é capaz de formar aglutinações e se reproduzir via conjugação (CRANDALL 1973).

Quando testada em frutas pós-colheita, obteve-se uma maior ação sobre os fungos *Penicillium expansum* e *Aspergillus ochraceus*, indicando a possível produção de compostos antifúngicos pela mesma, mostrando resultados

promissores na aplicação contra fungos deteriorantes/micotoxigênicos (SIMER, 2012).

Ao ser utilizada em revestimento para maçã pós-colheita de forma preventiva para inibir o crescimento da podridão azul não impediu a evolução da doença e da infecção em maçãs. Porém, conteve significativamente a evolução das lesões causadas por *P. expansum* (FERREIRA, 2020).

Análises mostraram eficácia na inibição da germinação de esporos para *A. ochraceus* (98,91 %) e *P. expansum* (96,49 %), assim como um controle eficaz na inibição do desenvolvimento de hifas (78,15 % e 78,34 %, respectivamente). A toxina *killer* (<1 kDa) é termo resistente, o que possibilitaria a sua aplicação em revestimentos comestíveis, com o intuito de prolongar a vida útil de frutos frescos pós-colheita, destinados ao consumo direto. A toxina ultrafiltrada permaneceu inibindo o desenvolvimento de micelas dos dois fungos testados em ~70%, mostrando amplo espectro de ação, estimulando ensaios com demais bolores deteriorantes (MARTINS, 2018).

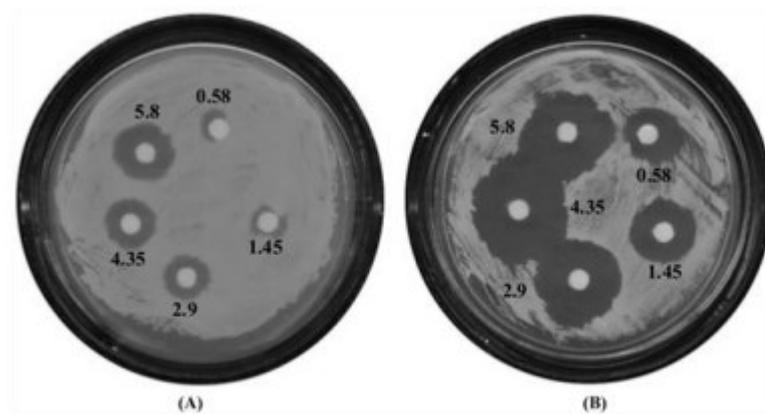
3.1.1 Toxina *Killer*

Os seres vivos têm condições específicas para seu crescimento e desenvolvimento, tais como, a disponibilidade de oxigênio, de fontes de carbono, minerais e água entre outros. Pelo fato de muitos microrganismos compartilharem seu substrato de sobrevivência, é inevitável que num sistema ocorra competição pelos recursos disponíveis, o que Darwin se referiu como a “luta pela sobrevivência” (DARWIN, 1859).

Muitos microrganismos apresentam algum tipo de fator biológico de competição e são usados para inibir o crescimento de outros em seu sistema, sendo que as bactérias conhecidas pela produção de bacteriocinas e as leveduras por produzirem uma exotoxina relacionada à toxina *killer*. Essa toxina é uma proteína ou glicoproteína de cadeia curta que possui ação inibitória contra outros fungos e/ou bactérias, porém a levedura produtora é imune. A primeira descrição do fator *killer* foi descrita por Bevan e Makawer em 1963, em *Saccharomyces cerevisiae* e, desde então, têm sido exploradas novas toxinas produzidas por diversos gêneros e espécies de leveduras, assim como, suas aplicações e desdobramentos na compreensão celular das mesmas (MAGLIANI et al., 1997).

Estudos referentes a toxina *killer* produzida por *Cryptococcus pinus* constataram um espectro bastante amplo de atividade, possui ação fungicida em baixos valores de pH, é inativada a temperaturas maiores que 100° e é resistente à proteinase.

Figura 2 – Ação da toxina *killer* da levedura *Cryptococcus pinus*



(A) *Cryptococcus terreus* (B) Toxina *killer* de *Cryptococcus pinus*

Fonte: Journal os Biosciences and medicines (2019)

A toxina *killer* do *C. pinus* apresenta alta atividade fungicida contra o conhecido patógeno *Filobasidiella neoformans*, é estável durante o armazenamento de longo prazo em temperaturas de -20°C e seu mecanismo de ação é baseado em danos às membranas das células-alvo (KULAKOVSKAYA; ZVONAREV; FAROFONOVA 2019).

Quanto às características das toxinas *killer*, estas podem variar conforme a levedura que a produz e em sua maioria pelo meio de cultura, sendo proteínas de pequenos tamanhos (massa molecular entre 10 e 20 kDa), de caráter ácido com ponto isoelétrico ao redor de 4,0 e são pouco suscetíveis ao tratamento térmico. Quanto ao seu mecanismo de ação antagônica há diversas hipóteses, entre as quais se destacam a criação de canais iônicos na membrana causando a desestabilização elétrica e inibição na produção de DNA ou de betaglucono.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi obtido o extrato bruto de *H. wingei* e após seco, foi avaliado em caráter experimental e exploratório, expandindo a visão a partir da hipótese da aplicação do extrato seco de *H. wingei* como bioconservante em carnes de aves, visando a redução de *Salmonella* spp. no período de 6 meses no laboratório de carnes A004 na UTFPR campus Londrina.

4.1 MATERIAL EM ESTUDO

A levedura de *H. wingei* que é material estudado deste trabalho tem sua cultura depositada na coleção microbiológica de interesse biotecnológico da UTFPR/Ponta Grossa (CMIB-UTFPR) e as duas cepas distintas de *Salmonella* spp., *Staphylococcus coagulase positiva* e uma cepa de *Escherichia coli* que foram utilizadas em testes de CMI do possível bioconservante foram cedidos pelo Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho.

4.2 CRESCIMENTO DA LEVEDURA

Partindo de cultura sólida de *H. wingei* cultivada em ágar batata dextrose (BDA), padronizamos um pré-inóculo em Escala Mac Farland 1 – cerca de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL, e dele transferimos a alíquota de 100µL para doze 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%). Esse material foi mantido a 25°C por 108 horas em BOD no laboratório de Carnes A004 da UTFPR campus Londrina.

Figura 3 – Resultado do crescimento da levedura



Fonte: Autoria própria (2021).

4.2.1 SECAGEM DO EXTRATO BRUTO

Após o período de incubação, o caldo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi separado do precipitado. O sobrenadante foi submetido então a secagem por atomização (*spray dryer*) nos parâmetros: Fluxo de alimentação 1,0 L/h, temperatura de entrada 112°C e temperatura de saída a 83°C, fluxo de ar 1,93m³/h em bico de 0,7mm.

Figura 4 – Secagem do extrato por *spray dryer*



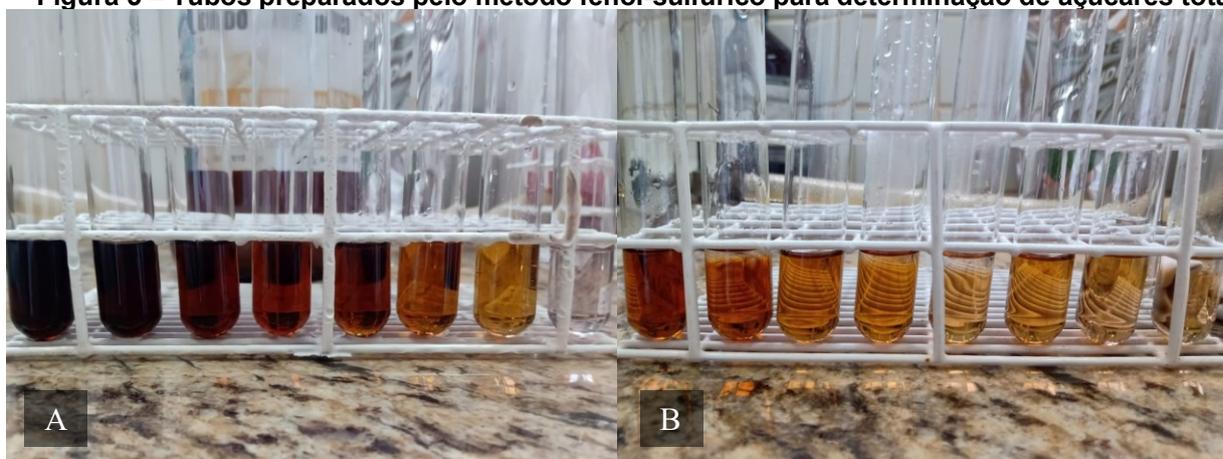
Fonte: Autoria própria (2021).

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO SECO

Para analisar a composição proximal do extrato seco foi realizado as determinações de carboidratos totais, pelo método fenol-sulfúrico por Dubois et al (1956) com adaptação; Proteínas totais pelo método de Bradford (1976); Umidade por método de estufa 105 °C de acordo com Instituto Adolf Lutz (1985); determinou-se o resíduo mineral fixo (cinzas) submetendo as amostras a 550°C; Lipídios foi feita segundo metodologia proposta por Folch (1967) com adaptações. Os resultados foram expressos em g/100g (AOAC, 1995).

O método fenol-sulfúrico consiste na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e derivados, 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. Foi feita uma curva padrão utilizando glicose 0,1%.

Figura 5 – Tubos preparados pelo método fenol-sulfúrico para determinação de açúcares totais



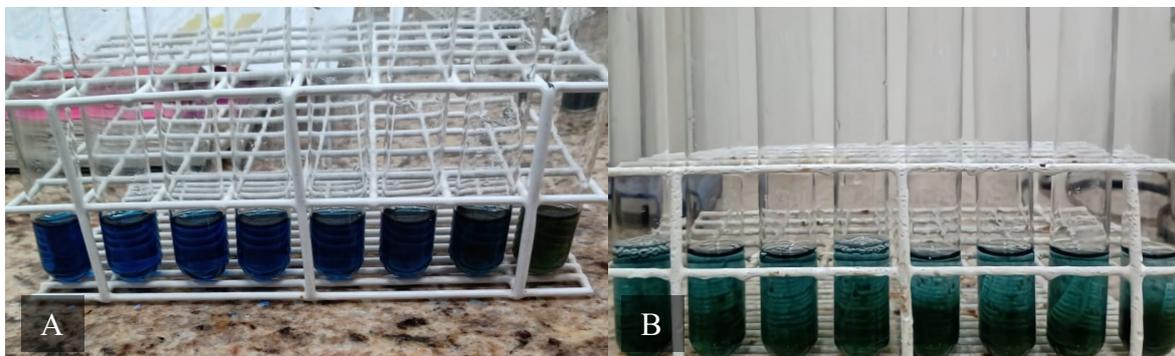
Fonte: Autoria própria (2021)

Para a preparação da amostra foi diluído o extrato seco à concentração de 0,5g/mL, acrescentou-se 0,5mL de fenol e 2,5mL de ácido sulfúrico. Após o tempo da reação foi feita a leitura de absorvância no comprimento de onda de 490nm e 620nm, comparando em seguida com a curva padrão.

A determinação de proteína total foi feita pelo método de Bradford que consistiu na solução de 0,05g de azul de *comassie brilliant g-250* diluída em 25 mL de etanol, que após agitado foi adicionado 50mL de ácido ortofosfórico 85%, e em

balão volumétrico foi completado o volume de 500mL, para solução de BSA foi diluído 1mg de BSA em 1mL de água destilada.

Figura 6 – Tubos preparados pelo método de Bradford para determinação de proteínas



A – Tubos de curva padrão B – Tubos com amostra.

Fonte: Autoria própria (2021)

Para leitura de absorbância do extrato seco de *H. wingei* foi feita a diluição de 0,1g de extrato seco de *H. wingei* em 5mL de H₂O, e a solução de 0,05g de azul de *comassie brilliant g-250* diluída em 25 mL de etanol, com 50mL de ácido ortofosfórico 85%, e completado o volume em balão volumétrico de 500mL. Após o tempo da reação foi feita a leitura de absorbância no comprimento de onda de 595nm, e calculado em seguida a curva padrão.

Na determinação da umidade colocamos 3g do extrato seco de *H. wingei* em cadinhos tarados e levamos a estufa por 6 horas a 105°C para secagem completa da água, após resfriamento em dessecador pesamos as amostras em balança analítica determinando assim teor de água evaporada.

Fórmula

$$\% \text{ teor de umidade} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso amostra}} \times 100$$

Para a realização de cinzas colocamos 3g do extrato seco de *H. wingei* na mufla a 550°C por 8 horas, após resfria-los no dessecador, pesamos via balança analítica, e a diferença entre o peso inicial e final resulta o teor de minerais, visto que os carboidratos, lipídios, proteínas e água foi evaporado devida à alta temperatura.

Formula

$$\% \text{ teor de cinzas} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso amostra}} \times 100$$

Figura 7 – Mufla com amostras para quantificação de cinzas



Fonte: Autoria própria (2021)

A determinação de lipídios foi feita pelo método de Folch, com adaptações, onde foi pesado 1g de amostra que foi diluída em 16mL de água destilada, essa diluição foi incorporada aos outros compostos na proporção de 2:2:1 formando a solução metanol, clorofórmio e água, para homogeneização foi colocado em ultrassom por 30 minutos a 30°C, após o tempo determinado a amostra foi separada em duas fases sendo a fase aquosa que por sua densidade estacionou-se ao fundo do béquer, e a fase menos densa contendo o lipídio, ficou contida na superfície, com a o auxílio de uma pipeta Pasteur foi retirado grande parte da fase aquosa, o que remanesceu foi para estufa até secar completamente a água, ao fim foi pesado novamente a amostra, e a diferença foi o resultado da composição lipídica.

4.2.3 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

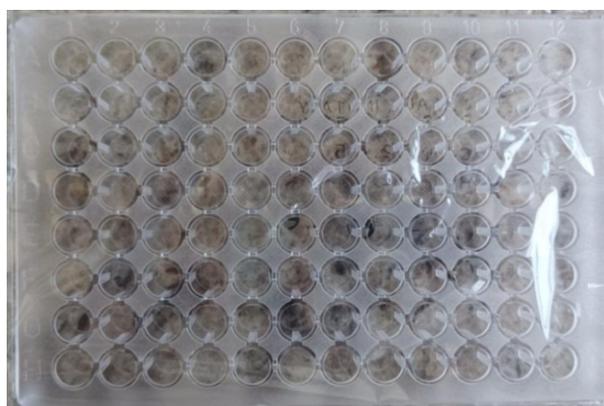
Para assegurar a eficácia da toxina *killer* após o processo de concentração por secagem, foi realizado o teste de concentração mínima inibitória (CMI) de acordo com o proposto por CLSI (2008 e 2009) e Ostrosky et al., (2008) com o extrato seco

de *H. wingei*, diluído na concentração de 0,25g/mL, como controle negativo foi empregado ácido láctico a 1,5%.

A metodologia empregada foi realizada da seguinte forma: as bactérias testes foram ativadas em caldo *brain heart infusion* (BHI) por 24 horas em estufa de crescimento a 38°C, e inoculadas em placas de meio *Mueller Hinton* (MH) e levadas para crescimento por mais 24 horas para 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.

Figura 8 – Placa de 96 poços empregada na metodologia



Fonte: Autoria própria (2021)

Em cada poço foi adicionado 100µL de caldo MH e, à exclusão da linha de controle foi adicionado 100µL das bactérias testes ($1,5 \cdot 10^5$ UFC) e foi acrescentado seis alíquotas do extrato diluído: 0, 50, 60, 70, 80, 90 e 100µL, estabelecendo assim seis concentrações de extrato seco a serem testados.

Os microrganismos que foram adicionados em duplicata nas colunas da placa de 96 poços, foram 2-3 *E. 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 foi adicionado concentrações crescentes do 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, logo após a finalização foi colocada em estufa 38 °C por 24 horas para incubação.

4.3 TESTES *IN SITU*

Foram coletadas amostras (peito de frango) testadas para aus/25g de *Salmonella* spp. onde posteriormente foram utilizadas para testes *in situ*. Para o início dos testes foi determinada a concentração inicial de *Salmonella* spp. a ser inoculada nas amostras, já que as amostras foram testadas aus/25grs. Foi inoculado uma alça de 1 microlitro em 1000mL de água estéril, homogeneizada e estriadas em placas de XLD e incubadas em estufa de 35° C por 24hrs +/- 3hrs, obtendo uma concentração de 10³.

Para realizar o teste controle, foi imerso três amostras de peito de frango em triplicata em solução de ácido acético 0,1%, e inoculado no período de 15 dias. Com o intuito de comparação foi inoculado *Salmonella* spp. a 10³ em outras três amostras em triplicata que também foram inoculadas pelo período de 15 dias. Com a intenção de atestar a eficiência da *Hansenula* como antimicrobiano, foi diluído 9g de extrato seco em 150mL de água estéril, foi então colocado 50mL em três embalagens estéreis. As últimas três amostras em triplicata pré inoculadas com *Salmonella* spp. a 10³ foram alocadas nas embalagens e inoculadas pelo período de 15 dias.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa biostat 5.3 (Software gratuito) onde foi realizado teste t para comparação de diferença entre as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os parâmetros de secagem foram escolhidos tendo em vista que a toxina *killer*, segundo apontado pela bibliografia, não é estável após ser submetida a altas temperaturas. Todavia, nos parâmetros utilizados neste experimento, ou seja, 112°C como temperatura de entrada e 83°C como temperatura de saída foi observado que a toxina continua ativa, e que o processo de secagem não foi danoso para sua estrutura. O processo da secagem foi feito de 1000mL por vez para não sobrecarregar o equipamento e em seguida o extrato seco foi pesado em frasco com rosca tarado para verificar eficácia da secagem. Foram produzidos 12L de levedura fermentada que renderam aproximadamente 18 g de produto seco. A composição do extrato seco obtido após secagem em spray dryer pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição proximal (%) do extrato seco de *H. wingei*

Componentes	g/100g
Carboidratos	13,23 ± 0,96
Proteínas	9,11 ± 0,09
lipídios	1,00 ± 0
Umidade	4,00 ± 0,01
Cinzas	39,91 ± 1,88
TOTAL	≅67,25

Muitas considerações podem ser realizadas para os resultados obtidos acima. Em trabalho de conclusão de curso realizado por Seben (2021) que desenvolveu atividade com experimento semelhante, houve o mesmo problema com os dados da composição proximal. O que diferiu as análises realizadas neste experimento com os de Seben (2021) foram as metodologias para proteínas e carboidratos, que realmente resultou em valores maiores para estes analitos. Ele também não quantificou lipídios, fez cálculo por diferença. Contudo ainda há um “gap” de mais de 20% de erro na análise.

Os resultados da composição proximal obtido é impreciso, e assim levantam alguns questionamentos. As análises físico-químicas foram efetuadas a partir do extrato seco, logo 4% para umidade é um valor aceitável tendo em vista que é um produto seco.

Para cinzas 39,91% obteve-se um valor elevado, porém há uma grande quantidade de sulfato de amônio, cloreto de sódio e fosfato de sódio monobásico, que foram acrescentados ao meio de cultivo, justificando o valor obtido.

A análise de carboidratos resultou em 13,23%, porém aqui há necessidade de algumas especulações, pois, ao ser realizado a secagem foi observado uma grande quantidade de açúcar caramelizado dentro do equipamento *spray dryer* que não foi possível ser retirado e quantificado, uma vez que este ficou em grande parte caramelizado e aderido a camisa do equipamento. Isto poderia justificar o baixo rendimento na secagem.

O valor de proteína total foi de 9,11%, resultado esse que é interessante, uma vez que aproximadamente 10% de proteína é expressiva para uma levedura produzir. Para lipídios obteve-se 1,00%, o que pode ser um valor considerado aceitável. Todavia há de se levantar pontos importantes nesta composição proximal, uma vez que o seu total este em 67%, ou seja, como justificar esta diferença de 33%? Onde poderiam estar distribuídos o valor faltante nesta análise (Tabela 1). A justificativa mais aceitável são as perdas que ocorreram durante o processo de secagem no *spray dryer*, pois houve perda considerável de material que sofreu caramelização e que ficou aderido dentro do equipamento. Acredita-se que essa diferença seja baseada em açúcar e material proteico, pois possivelmente ocorreu reação de Maillard durante o processo de secagem.

O resultado obtido na concentração mínima inibitória foi a inibição de *Salmonella spp.* à concentração de 0,066g/mL, e para *E. Coli* e *Staphylococcus coagulase* positiva também houve inibição, porém não por completo. A partir da CMI foi iniciado os testes *in situ*, onde foi aplicado o extrato seco de *H. wingei* na concentração 0,083g/mL que foi analisado pelo período de 15 dias pois é o tempo permitido para refrigeração de carnes. Foi feito três análises diferentes para comparação, na primeira análise foi adicionado uma quantidade 0,083g/mL de extrato seco de *H. wingei* e *Salmonella spp.* em três peitos de frango, na segunda análise foi acrescentado *Salmonella spp.* Na concentração 10^3 em três outros peitos de frango, e para terceira análise foi feito o controle onde foi adicionado ácido acético na concentração 0,1% em três peito de frango com *Salmonella spp.* Na concentração 10^3 .

Quadro 2 – Contagem de UFC/g da incubação de *Salmonella* e ácido acético do dia 1 e 15

Dia 1	Peito de frango + <i>Salmonella</i> + 1% de solução Ácido acético		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
1	2x10 ³	4x10 ³	10x10 ³
	2x10 ³	2x10 ³	2x10 ³
	1x10 ³	3x10 ³	16x10 ³
Dia 15	Peito de frango + <i>Salmonella</i> + 1% de solução Ácido acético		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
2	21x10 ²	31x10 ²	53x10 ²
	15x10 ²	25x10 ²	12x10 ²
	21x10 ²	26x10 ²	30x10 ²

Comparando as informações do quadro 1 observa-se a diminuição de 1log de crescimento da *Salmonella*, o que é previsto pois o ácido acético já é um antimicrobiano eficiente para a inibição de microrganismos, por isso utilizado como controle.

Quadro 3 – Contagem de UFC/g da incubação de *Salmonella* do dia 1 e 15

Dia 1	Peito de frango + <i>Salmonella</i> sp		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
1	2x10 ³	4x10 ³	10x10 ³
	2x10 ³	2x10 ³	2x10 ³
	1x10 ³	3x10 ³	16x10 ³
Dia 15	Peito de frango + <i>Salmonella</i> sp		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
2	288x10 ²	220x10 ²	164x10 ²
	312x10 ²	100x10 ²	208x10 ²
	320x10 ²	116x10 ²	148x10 ²

Realizando teste *T* de Student para amostras independentes o valor de *p* foi menor que 0,05 indicando que a contagem de UFC/g entre os tempos inicial e final são diferentes. Isso indica que a refrigeração foi um obstáculo para o crescimento do microrganismo, porém este continua presente em quantidade significativa nas amostras.

Quadro 4 – Contagem de UFC/g de incubação de *Salmonella* e *H. wingei* do dia 1 e 15

Dia 1	Peito de frango + <i>Salmonella</i> sp + Extrato de <i>Hansenula</i>		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
1	1x10 ³	3x10 ³	1x10 ³
	0x10 ³	2x10 ³	2x10 ³
	1x10 ³	2x10 ³	1x10 ³

Dia 15	Peito de frango + <i>Salmonella</i> sp + Extrato de <i>Hansenula</i>		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
2	3x10 ²	47x10 ²	86x10 ²
	2x10 ²	48x10 ²	28x10 ²
	18x10 ²	59x10 ²	39x10 ²

1 – Contagem de UFC/g no dia 1 da inoculação 2 – Contagem de UFC/g 15 dias após a inoculação

Realizando teste *T* de Student para amostras independentes o valor de $p < 0,05$ indicando que a contagem de UFC/g entre os tempos inicial e final são diferentes.

Quadro 5 – Comparação de resultados do dia 15 do peito de frango com e sem extrato seco de *Hansenula*

Dia 15	Peito de frango + <i>Salmonella</i> sp		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
1	288x10 ²	220x10 ²	164x10 ²
	312x10 ²	100x10 ²	208x10 ²
	320x10 ²	116x10 ²	148x10 ²

Dia 15	Peito de frango + <i>Salmonella</i> sp + Extrato de <i>Hansenula</i>		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
2	3x10 ²	47x10 ²	86x10 ²
	2x10 ²	48x10 ²	28x10 ²
	18x10 ²	59x10 ²	39x10 ²

Realizando teste *T* de Student para amostras independentes entre amostra de peito contaminada com *Salmonella* sem o ESH e comparando-o com a amostra adicionada com ESH obteve-se diferença significativa a 5% comprovando que a adição do extrato seco atua na redução do crescimento deste microrganismo.

6 CONCLUSÃO

Mediante aos resultados obtidos para a composição proximal do extrato seco de *H. wingei*, conclui - se que há necessidade de novos trabalhos empregando outras metodologias de forma a obter melhor rendimento do extrato, porém utilizando o extrato seco de *H. wingei* como antimicrobiano, quando aplicado em peito de frango é eficiente para a redução do crescimento de *Salmonella sp.*

REFERÊNCIAS

- ASHIDA, SHINZO et. al. New *Killer Toxin* of *Hansenula mrakii*. **Agricultural and Biological Chemistry**. Vol. 47, No. 12, p. 2953-2955, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10866066> Acesso em: 31 jul. 2021.
- BALZAN, S. et. al. Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives. **Food Science and Technology**, v. 85, p.89-95, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.001>. Acesso em: 25 jun. 2021.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976. Disponível em: <https://doi: 10.1006 / abio.1976.9999>. Acesso em: 31 jul. 2021.
- BARROS, D. M. et al. Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares. **Brazilian Journal of Development**. v. 6 p. 40476-40491 jun. 2020. Disponível em: <https:// DOI:10.34117/bjdv6n6-547> . Acesso em: 31 jul. 2021.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. **Norma aprovada 3ª ed. Wayne, PA, CLSI document M31-A3**, 2008. Acesso em: 31 jul. 2021.
- _____. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, **CLSI document M02-A10**, 2009. Acesso em: 31 jul. 2021.
- CRANDALL, M. Comparison of *Hansenula wingei*, a Petite-negative, Obligately Aerobic Yeast, to the Petite-positive Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. Vol.75 p. 363-375, 1973. Disponível em: <https:// doi: 10.1099 / 00221287-75-2-363>. Acesso em: 31 jul. 2021.
- CASABURI, A.et. al. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. **Food Control**. v. 59 p. 31-45, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.016>. Acesso em: 30 jul. 2021.
- DARWIN, Charles. A origem das espécies: por meio de seleção natural (1859). Tradução MESQUITA A. C. São Paulo, 2017. Acesso em: 31 jul. 2021.
- DUBOIS et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>. Acesso em: 31 jul. 2021.
- FOOD INGREDIENTS BRASILE. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. **Food Ingredients Brasil**. Ed. 15, p. 36-42, 2010. Disponível em: <https://revista->

fi.com/upload_arquivos/201606/2016060739062001465320470.pdf Acesso em: 31 jul. 2021.

_____. Conservação de Alimentos por Aditivos Químicos. Edição 22, 2012. Disponível em: https://revistafi.com/upload_arquivos/201606/2016060331891001467132636.pdf Acesso em: 31 jul. 2021

FOLCH J. LEES M. SLOANE S. GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem.** (1) 226 p.497-509, 1957. PMID: 13428781. Acesso em: 31 jul. 2021.

FONTANA, H. Y. Y. et. al. 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. Disponível em: [https:// DOI: 10.5151/9788580392722-08](https://doi.org/10.5151/9788580392722-08) Acesso em: 27 jul. 2021.

GÁLVEZ, A. et.al. **Food Biopreservation**. New York: Springer, 2014. 121p.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, Ed 6. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2021.

KAGIYAMA, SHOGO. et. al. New Killer Toxins, of Halophilic *Hansenula anomala*. **Agriculture and Biological Chemistry**. Vol. 52, No. 1, p. 1-7, 1988. Disponível em: <https://www.scienciaplena.org.br/sp/article/view/2382/1209>. Acesso em: 28 jul. 2021.

KULAKOVSKAYA, Ekaterina. et. Al. Characteristics of Killer Toxin of the Yeast *Cryptococcus pinus*. **Journal of Biosciences and Medicines**. Vol. 7, No. 4, April 2019. Disponível: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=91952> Acesso: 31 jul. 2021.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts – **A taxonomic study**. 2. ed. *Amsterdam*: Elsevier, 1999. Acesso em: 31 jul. 2021.

MAGLIANI, W. et. al. Yeast Killer Systems. **Clinical microbiology reviews**, Vol. 10, No. 3, p. 369–400, (1997). Disponível em: [https://doi: 10.1128 / CMR.10.3.369](https://doi.org/10.1128/CMR.10.3.369). Acesso em: 31 jul. 2021.

SEBEN, Bruno 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. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina. 2021. 39p. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/26452/1/toxinakillercmsaves.pdf> Acesso em: 16 nov. 2021.

ŠOJIĆ, B. et. al. Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. **Meat Science**. v. 157, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107879>. Acesso em: 30 jul. 2021.

OSTROSKY, E.A. et. al. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, n.2, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>. Acesso em: 31 jul. 2021.

OSWELL, N, J.; THIPPARERDDI, H.; PEGG, R. B. Practical use of natural antioxidants in meat products in the U.S.: A review. **Meat Science**. v. 145, p.469-479,2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.020>. Acesso em: 30 jul. 2021.