



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
CURSO DE NUTRIÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso

**Sensibilidade de *Salmonella* Typhimurium à atividade de nisina *in vitro* e em
suco de laranja sob temperatura de refrigeração**

DISCENTE: Carla Gabriela Fernandes da Silva

ORIENTADOR (A): Cláudia Vieira Prudêncio

**BARREIRAS
2020**

Carla Gabriela Fernandes da Silva

Sensibilidade de *Salmonella Typhimurium* à atividade de nisina *in vitro* e em suco de laranja sob temperatura de refrigeração

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Oeste da Bahia, como requisito parcial para aprovação no componente curricular Trabalho de Conclusão de Curso II – TCC II.

**BARREIRAS
2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
CURSO DE NUTRIÇÃO**

**Sensibilidade de *Salmonella* Typhimurium à atividade de nisina *in vitro*
e em suco de laranja sob temperatura de refrigeração**

Carla Gabriela Fernandes da Silva

Aprovada em: 28 de Fevereiro de 2020.

Banca Examinadora

**Profa. Dra. Cláudia Vieira Prudêncio
Orientadora**

**Profa. Dra. Dayane Otero Rodrigues
Membro Avaliador**

**Dra. Camila Pinheiro do Carmo
Membro Avaliador**

À minha querida Mãe, pelo carinho e cuidado despendidos a mim, e pelo estímulo a sempre buscar o caminho do conhecimento e do amor ao próximo.

Ao meu esposo Fernando, pela parceria e dedicação, o qual, naqueles momentos mais exaustivos esteve ao meu lado impulsionando e fortalecendo meus sonhos.

À todos meus amigos e familiares pelos momentos de apoio e descontração.

À todos meus professores e colegas de curso que colaboraram e contribuíram para meu crescimento e aprendizagem nessa caminhada acadêmica, em especial, à Professora Cláudia, por ter acreditado e encorajado minhas superações.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens, e falasse a
língua dos anjos, sem amor, eu nada seria.”

(Paulo de Tarso)

Resumo

Objetivo: Avaliar a influência de fatores ambientais sobre a sensibilidade de *Salmonella* Typhimurium à atividade de nisina *in vitro* e em suco de laranja refrigerado.

Métodos e Resultados: Avaliou-se a viabilidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 exposta a diferentes valores de pH e concentrações de nisina incubada sob temperatura de refrigeração por diferentes intervalos de tempo. Para avaliar a atividade da bacteriocina no suco de laranja, inoculou-se *Salmonella* Typhimurium ($5 \log_{10}$ UFC/mL) em suco de laranja contendo nisina e manteve incubada sob temperatura de refrigeração por 240 horas. A atividade de nisina foi observada nas diferentes condições, porém a maior eficiência foi observada naquelas condições de pH mais baixo (4,0) e maior concentração da bacteriocina (174 μ M). Além disso, sua ação bactericida se mostrou diretamente proporcional ao período de incubação. Quando testada em suco de laranja, nisina se mostrou eficaz com redução de até 84% no número de células viáveis.

Conclusão: Fatores ambientais como baixo pH e baixa temperatura favoreceram a sensibilização das células de *Salmonella* Typhimurium à ação bactericida da nisina.

Importância e Impacto do estudo: A utilização de baixas temperaturas e baixo pH podem atuar sinergicamente com nisina no controle de *Salmonella* Typhimurium em alimentos refrigerados.

Palavras chave: nisina, bacteriocina, bioconservante, *Salmonella*, temperatura de refrigeração

Abstract

Objective: To evaluate the influence of environmental factors on the sensitivity of *Salmonella* Typhimurium to nisin *in vitro* and in refrigerated orange juice.

Methods and Results: The viability of *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 exposed to different pH values and nisin concentrations was evaluated under refrigeration temperature for different time intervals. To assess bacteriocin activity in orange juice, *Salmonella* Typhimurium cells ($5 \log_{10}$ CFU/mL) were inoculated in orange juice containing nisin and incubated under refrigeration temperature for 240 hours. The activity of nisin was observed in the different conditions, however, the highest efficiency was observed in those conditions with the lowest pH (4.0) and the highest concentration of bacteriocin (174 μ M), wherein its bactericidal action was directly proportional to the period incubation. When tested in orange juice, nisin was shown to be effective with reduction up to 84% in the number of viable cells.

Conclusion: Environmental factors such as low pH and low temperature favored the sensitization of *Salmonella* Typhimurium cells to the bactericidal action of nisin.

Importance and Impact of the study: The use of low temperatures and low pH can act synergistically with nisin to control *Salmonella* Typhimurium in refrigerated foods.

Keywords: nisin, bacteriocin, bioconservative, *Salmonella*, refrigeration temperature

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos.....	3
2.1. Micro-organismo e condições de cultivo.....	3
2.2. Preparo da bacteriocina.....	3
2.3. Determinação das condições ambientais para avaliação da sensibilidade de <i>Salmonella</i> Typhimurium à nisina.....	4
2.4. Avaliação da viabilidade das células de <i>Salmonella</i> Typhimurium expostas à nisina em diferentes condições ambientais.....	6
2.5. Ensaios de validação dos resultados.....	6
2.6. Avaliação da atividade de nisina contra <i>Salmonella</i> Typhimurium em suco de laranja.....	7
3. Resultados	9
3.1. Influência das condições ambientais sobre a sensibilidade de <i>Salmonella</i> à nisina.....	9
3.2. Atividade da nisina contra <i>Salmonella</i> Typhimurium no suco de laranja refrigerado.....	14
4. Discussão.....	16
5. Conclusão.....	21
6. Conflito de interesses.....	21
7. Referências	22

1. Introdução

As Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) são consideradas uma das causas mais importantes de morbimortalidade, associadas ao adoecimento de uma em cada dez pessoas no mundo anualmente (WHO 2019). Dentre essas, as doenças diarreicas são as mais comuns, e responsáveis por adoecer 550 milhões de pessoas e causar 230 mil mortes a cada ano no mundo (WHO 2019). Neste cenário, as salmoneloses, causadas pela ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella*, são as que se apresentam com maior frequência e gravidade, sendo consideradas uma das quatro principais causas globais de doenças diarreicas (WHO 2019). Ainda que, casos de salmonelose se apresentem, geralmente, com sintomas leves e autolimitados, fatores como a carga bacteriana, a cepa do micro-organismo infectante e o estado de saúde do indivíduo infectado podem favorecer o surgimento de complicações mais graves e até mesmo fatais (WHO 2019).

Embora os produtos de origem animal, como ovos, leite e carnes sejam considerados os principais veículos de *Salmonella*, diversos produtos de origem vegetal, tais como brotos de feijão, tomates, amendoim e sucos de fruta não pasteurizados também já foram relacionados a contaminação com o patógeno (Guo *et al.* 2002; Sivapalasingam *et al.* 2004; Berger *et al.* 2010; Callejón *et al.* 2015). Dentre estes, o suco de laranja se destaca por sua alta produção e consumo mundial (Shahbaz *et al.* 2018). Diversos surtos envolvendo contaminação com *Salmonella* através do consumo de suco de laranja minimamente processado já foram reportados (Castillo *et al.* 2006; Jain *et al.* 2009; Lee *et al.* 2012; Aneja *et al.* 2014; Shahbaz *et al.* 2018). Ainda que, devido ao seu baixo pH, o suco de laranja pareça um alimento seguro com baixo risco para contaminação microbiológica, Parish *et al.* (1997) demonstraram que *Salmonella* é capaz de sobreviver

por até 27 dias em pH 3,5 e por mais de 60 dias em pH 4,1, mesmo sob condições de refrigeração, o que pode tornar este alimento uma importante fonte de contaminação.

Por outro lado, o aumento da demanda por produtos minimamente processados e com baixa quantidade de conservantes tem se tornado um desafio para a produção de alimentos, o que impulsiona a busca por técnicas alternativas de conservação capazes de garantir a segurança microbiológica dos alimentos sem comprometer sua qualidade sensorial e nutricional (Yusuf 2018). Neste cenário, a bioconservação ganha evidência como técnica alternativa, pois, envolve a utilização de micro-organismos e/ou seus metabólitos antimicrobianos na inibição ou inativação de outros micro-organismos, o que apresenta pouco ou nenhum efeito sobre as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (Oluk e Karaca 2018).

Dentre os bioconservantes já identificados, as bacteriocinas se destacam como compostos seguros, com eficácia comprovada contra importantes agentes deterioradores e patogênicos (Chikindas *et al.* 2017). Bacteriocinas são peptídeos de origem ribossomal produzidos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que possuem ação bactericida e/ou bacteriostática sobre outros micro-organismos (Ahmad *et al.* 2017). Na área de bioconservação de alimentos, nisina é a bacteriocina mais conhecida e utilizada (Chikindas *et al.* 2017). Suas características de baixa toxicidade e alta resistência térmica favorecem sua ampla utilização, principalmente na conservação de laticínios e embutidos cárneos (Chikindas *et al.* 2017). Além disso, nisina é a única bacteriocina liberada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em alimentos com aprovação em mais de 80 países (Chikindas *et al.* 2017). No Brasil, sua utilização é autorizada na conservação de queijos desde 1996 (Brasil 1996).

Devido à presença da membrana externa, que atua como uma barreira de proteção, nisina, geralmente, não demonstra efeito antimicrobiano contra micro-organismos Gram-

negativos, como *Salmonella* (Cleveland *et al.* 2001). Todavia, apesar desta resistência natural, evidências demonstram que a aplicação de métodos físicos e químicos, como o uso de compostos quelantes, e de tratamentos térmicos, como o uso de calor e de baixas temperaturas, pode ser capaz de desestabilizar a membrana externa das células Gram-negativas e, assim, torná-las suscetíveis à ação de antimicrobianos, como as bacteriocinas (Prudêncio *et al.* 2015). Este comportamento foi demonstrado por Adams e Boziaris (2001) ao observarem que a adição de nisina durante o tratamento aumentou o efeito bactericida de tratamentos com baixas temperaturas contra micro-organismos Gram-negativos (Adams e Boziaris 2001). Dessa forma, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade de nisina contra *Salmonella* Typhimurium em diferentes condições de pH *in vitro* e seu uso em suco de laranja mantido sob refrigeração.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos e condições de cultivo

Salmonella enterica sorovar Typhimurium ATCC 14028 foi cultivada em caldo Luria Bertani (LB) segundo Lenox (Acumedia, E.U.A.) a 37 ± 1 °C por um período de 20 a 24 h. As células foram centrifugadas a 2500 *g* e lavadas com solução salina 0,85 %.

2.2. Preparo da bacteriocina

A solução estoque de nisina (Global Food, Alemanha) foi preparada diluindo o composto em solução de fosfato de sódio (5 mM, pH 2,0). Solução de fosfato de sódio (pH 2,0) também foi utilizada como controle.

2.3. Determinação das condições ambientais para a avaliação da sensibilidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 à nisina

Para avaliar o efeito das condições ambientais sobre a sensibilidade de *Salmonella* Typhimurium à nisina foi utilizada a temperatura de refrigeração (10 ± 1 °C). Um delineamento central de composto rotacional (DCCR) com três fatores foi elaborado para se verificar a influência das condições de pH, tempo de incubação e concentração de nisina sobre a viabilidade do patógeno (Tabela 1). As variáveis independentes foram pH (4,0 a 7,2), tempo (2 a 120 h) e concentrações de nisina (14,5 a 290 µM). Para determinação do valor mínimo de pH, levou-se em conta aquele relatado por Jay *et al.* (2005) como a faixa mínima de crescimento do patógeno. Já para determinação do valor máximo de pH levou-se em conta o fato de que em pH neutro, nisina tem sua atividade reduzida (Harris *et al.* 1992). Diferentes intervalos de tempo foram utilizados para permitir a avaliação da sensibilidade de *Salmonella* à bacteriocina em baixa temperatura. Além disso, foi avaliada uma ampla faixa de concentração da bacteriocina, na qual foram incluídas concentrações já estabelecidas como antimicrobianas para o patógeno quando associadas a tratamentos que desestabilizem a membrana externa (Prudêncio *et al.* 2016).

Tabela 1. Delineamento de composto central rotacional (DCCR) com três variáveis independentes (pH, período de incubação e concentração de nisina) para avaliação da viabilidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 sob condições de refrigeração.

ENSAIO	Y1	Y2	Y3
	pH	Tempo (horas)	Concentração de nisina (uM)
1	4,65	25,9	70,24
2	6,25	25,9	70,24
3	4,65	84,9	70,24
4	6,25	84,9	70,24
5	4,65	25,9	207,99
6	6,25	25,9	207,99
7	4,65	84,9	207,99
8	6,25	84,9	207,99
9	4,0	61,0	152,25
10	7,2	61,0	152,25
11	5,6	2,0	152,25
12	5,6	120,0	152,25
13	5,6	61,0	14,50
14	5,6	61,0	290,00
15	5,6	61,0	152,25
16	5,6	61,0	152,25
17	5,6	61,0	152,25

2.4. Avaliação da viabilidade das células de *Salmonella* Typhimurium expostas à nisina em diferentes condições ambientais

Para avaliação da viabilidade das células expostas a bacteriocina, a cultura foi inoculada em concentração inicial de $5 \log_{10}$ UFC/mL, em caldo LB (Acumedia, E.U.A) com valores de pH e concentrações de nisina definidas de acordo com o delineamento experimental (Tabela 1). Os tubos foram incubados a 10 ± 1 °C por diferentes intervalos de tempo (Tabela 1). Como controle, as células foram cultivadas nas mesmas condições ambientais, sem a presença de nisina.

Para quantificação de células viáveis, as amostras foram coletadas, diluídas e plaqueadas em triplicata pela técnica de microgotas em ágar padrão de contagem (Kasvi, Itália). As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C durante 8 a 12 h.

A quantificação das colônias foi obtida a partir de contagem realizada em contador de colônias (Quimis, Brasil) e convertidas em UFC/mL. Para análise dos dados, utilizou-se a variação do número de células viáveis, obtida pela diferença entre o logaritmo do número de células final e inicial. Para cada condição, foram realizadas três repetições independentes.

2.5. Ensaios de validação dos resultados

A partir dos resultados do delineamento de composto central rotacional (Tabela 1), foram escolhidas doze condições não utilizadas no DCCR para validação da influência das variáveis analisadas sobre a viabilidade de *Salmonella* Typhimurium (Tabela 2). Para isso, em cada condição, foram desenvolvidos ensaios para avaliação e quantificação da viabilidade como descrito no item anterior. Foram realizadas três repetições

independentes e diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5% e auxílio do programa AgroEstat, versão 1.1.0.712.

Tabela 2. Condições para validação da influência das variáveis pH, período de incubação e concentração da nisina sobre a viabilidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 incubada sob refrigeração.

Ensaio	pH	Tempo (horas)	Concentração de nisina (uM)
1	4,0	60,0	87,01
2	4,0	60,0	174,00
3	4,0	60,0	261,01
4	5,5	24,0	145,00
5	5,5	36,0	145,00
6	5,5	48,0	145,00
7	5,5	60,0	145,00
8	5,5	90,0	145,00
9	6,5	24,0	87,01
10	6,5	48,0	87,01
11	6,5	60,0	87,01
12	6,5	90,0	87,01

2.6. Avaliação da atividade de nisina contra *Salmonella* Typhimurium em suco de laranja

O suco de laranja foi escolhido como matriz alimentar para análise por ser um alimento relatado como veículo para surtos de salmonelose (Castillo *et al.* 2006; Jain *et al.* 2009; Lee *et al.* 2012; Aneja *et al.* 2014; Shahbaz *et al.* 2018) e apresentar faixa de pH similar (4,0 – 5,0) àquela em que foi observada maior atividade da bacteriocina.

Para obtenção do suco, laranjas do tipo Pêra Rio (*Citrus sinensis*) em adequado estágio de maturação, foram higienizadas com hipoclorito de sódio (Sumaveg, Jonhson Diversey, Brasil - 200 ppm por 15 minutos) e espremidas. Em seguida, coou-se o sumo para separação do suco e da polpa. Para garantir a qualidade microbiológica e inativação da enzima pectinesterase, o suco foi submetido à pasteurização sob temperatura de 92 °C durante 60 segundos conforme proposto por Brugos *et al.* (2018) e armazenado em temperatura de refrigeração (10 ± 1 °C) por 72 horas (Brugos *et al.* 2018).

O pH do suco foi avaliado em potenciômetro (Yoke, China), e apresentou valor de 4,85. Já a acidez titulável, mensurada através de teste de titulação volumétrica com indicador como proposto por IAL (2008), foi de 0,26% (IAL 2008).

Para avaliar a atividade antimicrobiana de nisina no suco, foi inoculado aproximadamente $5 \log_{10}$ UFC/mL de células de *Salmonella* Typhimurium em suco de laranja contendo 174 µM de nisina, o qual foi incubado sob temperatura de 10 ± 1 °C por até 240 horas (10 dias).

Para avaliação da viabilidade, amostras coletadas a cada 24 horas de incubação foram diluídas e plaqueadas em triplicata pela técnica de microgotas em ágar padrão de contagem (Kasvi, Itália). As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C por um período de 8 a 12 h. Para o controle, foram utilizadas amostras com inoculação do patógeno em mesma concentração, mas sem a adição de nisina.

Como forma de controlar a qualidade microbiológica do suco, uma porção do mesmo, sem adição de nisina e do micro-organismo foi estocada pelo mesmo tempo e temperatura e, avaliada a cada 24 horas em ágar Xilose lisina Deoxilato (XLD) (Kasvi, Itália) pela técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C por tempo de 24 h.

Foram realizadas três repetições independentes para cada ensaio. As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa AgroEstat, versão 1.1.0.712 (Barbosa e Maldonato 2010). Para avaliar a existência de diferenças entre o tratamento e o grupo controle, foi utilizado o teste de Tukey com adoção do nível de significância de 0,05.

3. Resultados

3.1. Influência das condições ambientais sobre a sensibilidade de *Salmonella* à nisina

Em ausência de nisina não houve grande variação no número de células de *Salmonella* Typhimurium (Figura 1). No entanto, reduções de até 0,4 ciclos logarítmicos foram observadas após aproximadamente 110 horas de incubação em ampla faixa de pH (Figura 1).

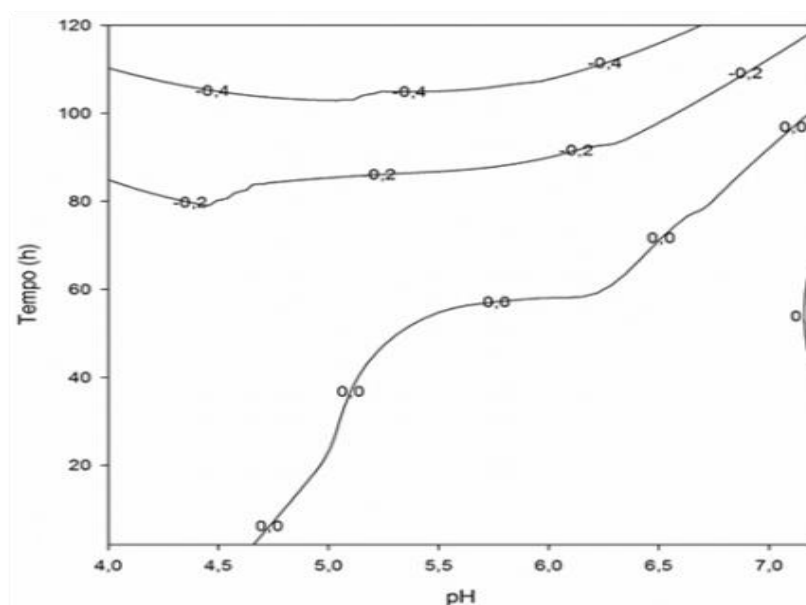


Figura 1. Variação na viabilidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Log_{10} UFC/mL) em ausência de nisina cultivada em meio LB a 10 °C.

A presença de nisina, mesmo em baixas concentrações, reduziu a viabilidade do micro-organismo, especialmente em condições de baixo pH, nas quais foram observadas reduções de até 1,2 ciclos logarítmicos (Figura 2A). A redução da viabilidade do micro-organismo foi diretamente proporcional ao aumento na concentração da bacteriocina, com maior eficiência com uso de pelo menos 140 μM de nisina (Figura 2A). Em condições de pH neutro ($\text{pH} > 6,8$) não foram observadas variações substanciais na viabilidade do micro-organismo, possivelmente pela menor atividade da bacteriocina nestas condições (Figura 2A).

Nas diferentes condições de pH, o período de incubação influenciou na redução da viabilidade do micro-organismo (Figura 2B-C). Mesmo em condições de menor acidez ($\text{pH} > 5$) foram observadas reduções de até 1 ou mais ciclos logarítmicos a partir de 100 horas de incubação (Figura 2C). Resultados similares foram observados após 120 horas de tratamento quando baixas concentrações de nisina foram utilizadas ($< 100 \mu\text{M}$) (Figura 2C). Tais resultados podem se relacionar ao possível efeito da temperatura de refrigeração na sensibilização das células de *Salmonella* Typhimurium à ação de nisina.

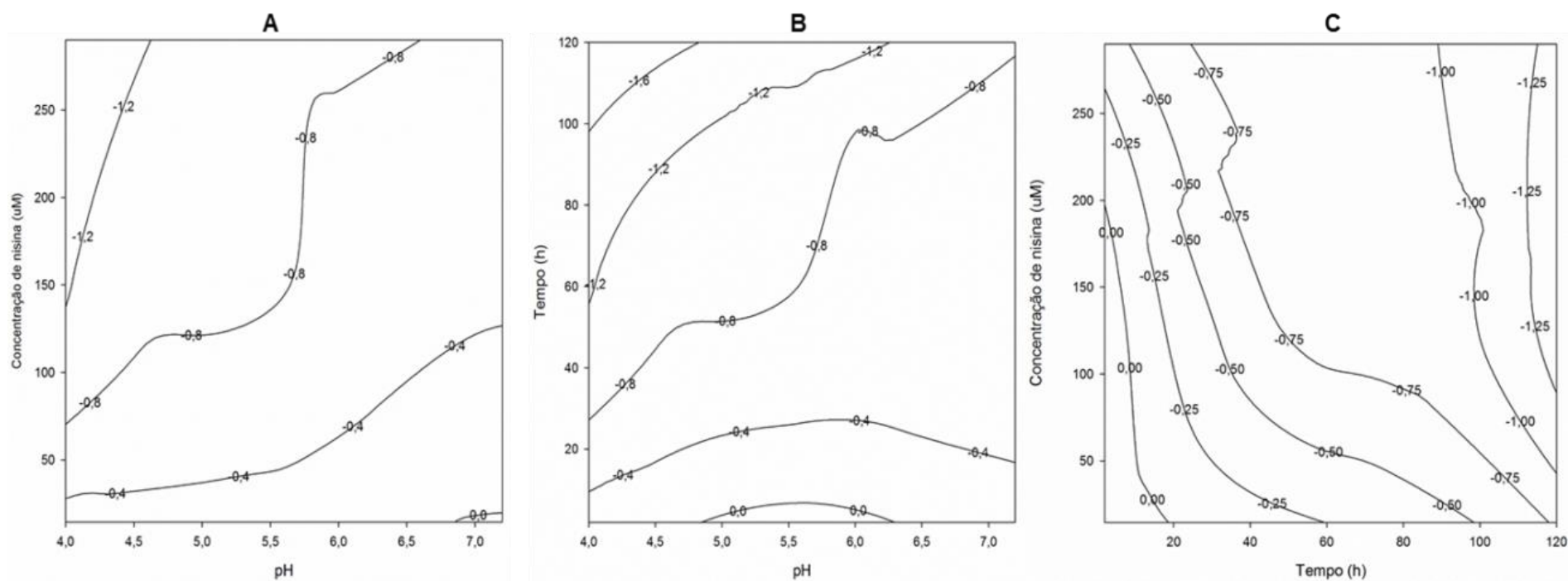


Figura 2. Variação na viabilidade de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 (Log₁₀ UFC/mL) em presença de diferentes concentrações de nisina cultivada em meio LB a 10 °C.

O efeito de nisina sobre a viabilidade do patógeno foi evidente nas condições escolhidas para validação dos dados (Tabela 3). A presença de nisina reduziu significativamente ($p < 0,01$) a população do micro-organismos em todas as condições avaliadas.

Tabela 3. Variação na viabilidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 exposta à diferentes condições ambientais em presença (tratamento) e ausência (controle) de nisina.

Ensaio	pH	Tempo (horas)	Concentração de nisina (μM)	Controle Log UFC/mL	Tratamento Log UFC/mL
1	4,0	60,0	87,01	$-0,071^a \pm 0,026$	$-0,954^b \pm 0,079$
2	4,0	60,0	174,00	$-0,109^a \pm 0,003$	$-1,250^b \pm 0,036$
3	4,0	60,0	261,01	$-0,176^a \pm 0,026$	$-1,111^b \pm 0,069$
4	5,5	24,0	145,00	$0,012^a \pm 0,083$	$-0,834^b \pm 0,301$
5	5,5	36,0	145,00	$-0,011^a \pm 0,002$	$-0,912^b \pm 0,010$
6	5,5	48,0	145,00	$-0,044^a \pm 0,119$	$-1,531^b \pm 0,175$
7	5,5	60,0	145,00	$-0,073^a \pm 0,018$	$-1,196^b \pm 0,052$
8	5,5	90,0	145,00	$-0,054^a \pm 0,002$	$-0,985^b \pm 0,036$
9	6,5	24,0	87,01	$-0,031^a \pm 0,009$	$-0,321^b \pm 0,005$
10	6,5	48,0	87,01	$-0,012^a \pm 0,001$	$-0,454^b \pm 0,020$
11	6,5	60,0	87,01	$0,099^a \pm 0,034$	$-0,299^b \pm 0,028$
12	6,5	90,0	87,01	$-0,015^a \pm 0,005$	$-0,510^b \pm 0,046$

Nota: Média $\pm$ Desvio padrão. ^{a-b} Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

Um menor efeito foi verificado com uso de baixas concentrações da bacteriocina (87 μM) e em condições de pH próximo a neutralidade (pH = 6,5) (Tabela 3). Nestas condições o aumento no tempo de incubação favoreceu, ainda que discretamente, o efeito inibitório da bacteriocina (Tabela 3).

Em condições de baixo pH (pH = 4,0) o maior efeito da bacteriocina foi claramente demonstrado (Tabela 3). Pois, ainda que com mesmo tempo de incubação e de concentração de nisina (87 μ M), a redução na viabilidade do patógeno foi de 1,83 vezes maior do que quando comparada ao resultado obtido em condições de maior pH (pH=6,5). Tal efeito prevalece mesmo quando comparado às condições de médio pH (pH=5,5) (Tabela 3).

Em condições de acidez menos intensas (pH=5,5) e com uso de concentrações medianas de nisina (145 μ M) a redução na viabilidade do patógeno foi similar àquela observada com uso de baixas concentrações em ambiente ácido (pH = 4,0), o que demonstra a importância do baixo pH para maior atividade do peptídeo (Tabela 3). Nestas condições, semelhante aos resultados anteriores, observou-se que a atividade da bacteriocina tende a aumentar com o tempo de tratamento, o que sugere o efeito da temperatura de refrigeração, durante o período de incubação, sobre a resposta do micro-organismo ao efeito da bacteriocina.

Assim, estes resultados sugerem que fatores ambientais como baixo pH e a baixa temperatura favorecem a sensibilização das células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 à ação bactericida da nisina.

3.2. Atividade da nisina contra *Salmonella* Typhimurium no suco de laranja refrigerado

Durante o período de 240 horas não foram observadas reduções na viabilidade de *Salmonella* Typhimurium em ausência da nisina (Figura 6). Pelo contrário, observou-se crescimento gradativo de cerca de 1 ciclo logarítmico a cada 24 horas.

Similarmente ao observado nos ensaios *in vitro*, nisina demonstrou atividade bactericida contra o patógeno em suco de laranja com redução de até 1,43 ciclos

logarítmicos após 24 horas de incubação (Figura 6). A partir de 48 horas de incubação, foi observada menor intensidade na redução das contagens, com média de 0,20 ciclos logarítmicos/dia (Figura 6). Mesmo ao final das 240 horas de tratamento, ainda foi observada a presença do patógeno, mas em quantidade 84% (4,46 ciclos logarítmicos) menor que o tempo zero (Figura 6).

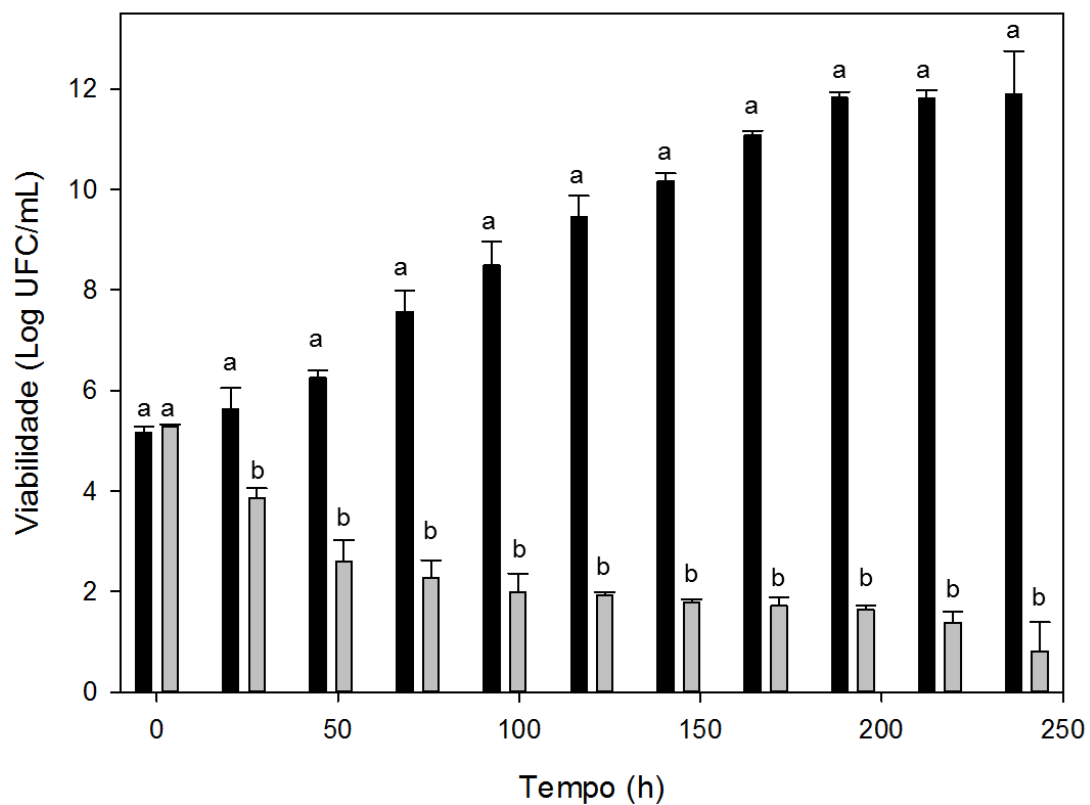


Figura 6. Viabilidade de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 em suco de laranja sob refrigeração (10 °C) com ausência (■) ou presença de nisina (■). ^{a-b} Médias seguidas por uma mesma letra no mesmo tempo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

4. Discussão

Devido à grande capacidade de adaptação às diversas condições ambientais, *Salmonella* sp. é considerada mundialmente como um dos micro-organismos de maior frequência em casos de contaminação alimentar (WHO 2018). Por isso, a elaboração de estratégias que permitam seu controle e, conseqüentemente, garantam a produção de alimentos seguros é relevante para a saúde pública e indústria alimentícia (Cleveland *et al.* 2001).

Aliado a isso, a crescente busca por alimentos minimamente processados e livres de aditivos químicos, evidencia uma mudança no perfil do consumidor (Morales De La Peña *et al.* 2019). Essa modificação é marcada pelo aumento no número de evidências que associam o uso de aditivos químicos em alimentos à maior prevalência de doenças na população (Carocho *et al.* 2015; Lerner e Matthias 2015; Fiolet *et al.* 2018). Esse contexto potencializa os desafios existentes nas formas de produção e conservação dos alimentos e intensifica a procura por técnicas alternativas, que possam aumentar a vida útil do produto, com redução do processamento e uso de aditivos químicos, de forma a preservar as características sensoriais e nutricionais do alimento sem afetar sua segurança microbiológica (Ananou *et al.* 2007; Carocho *et al.* 2015).

Além disso, acredita-se que o aumento na demanda por alimentos frescos, marcado pela busca de um estilo de vida mais saudável, seja uma das principais causas do aumento no número de surtos provocados por *Salmonella* sp. envolvendo alimentos de origem vegetal (Guo *et al.* 2002; Sivapalasingam *et al.* 2004; Berger *et al.* 2010; Callejón *et al.* 2015). Dentre estes alimentos, o suco de laranja se destaca como um dos produtos de maior consumo e produção mundial, o que o torna uma importante fonte de contaminação por esse patógeno (Shahbaz *et al.* 2018).

Tradicionalmente, o aquecimento é o principal método utilizado no controle microbiológico e na preservação de sucos industrializados e de diversos outros alimentos (Shahbaz *et al.* 2018). No entanto, estudos demonstram que o uso de altas temperaturas pode comprometer propriedades nutricionais, sensoriais e organolépticas dos alimentos (Agcam *et al.* 2016; Shahbaz *et al.* 2016; Ricke *et al.* 2018). Assim, há um estímulo na busca por tratamentos alternativos que garantam essas propriedades sem interferir na segurança microbiológica (Munõz *et al.* 2012; Sung *et al.* 2014; Mansor *et al.* 2014; Ferrario *et al.* 2015; Shahbaz *et al.* 2016).

Dentre as diversas técnicas pesquisadas, o uso de bioconservantes, em combinação com métodos físicos e/ou químicos, tem demonstrado grande potencial para conservação de alimentos (Alpas e Bozoglu 2000; Liang *et al.* 2002; Mosqueda-Melgar *et al.* 2008; Utkun *et al.* 2012; De Oliveira Jr. 2015; Charfi 2019). Nessas pesquisas, os métodos mais utilizados são os que envolvem o uso de compostos químicos, como agentes quelantes, de tratamentos térmicos, como o uso de calor e de baixas temperaturas, e de tratamentos físicos, como campo elétrico pulsado e ultrassom, entre outros (Chalón *et al.* 2012; Prudêncio *et al.* 2016). Dessa forma, o sinergismo alcançado é, por vezes, devido ao efeito dos métodos físicos que resultam em alterações na fisiologia e no metabolismo de células microbianas (Berdejo *et al.* 2019).

Assim, as alterações provocadas pelos métodos físicos facilitam o acesso dos antimicrobianos para o interior das células que naturalmente seriam resistentes ao efeito destes agentes (Berdejo *et al.* 2018). Este comportamento é exemplificado pelos resultados de Lee e Kaletunç (2010) que avaliaram a atividade de nisina associada a Alta Pressão Hidrostática (APH) contra *Salmonella* Enteritidis, e demonstraram que a permeabilização da membrana externa, causada pela APH, permitiu o acesso de nisina às células, com consequente morte celular (Lee e Kaletunç 2010). Além disso, respostas

adaptativas a fatores ambientais como temperatura de crescimento e pH do meio são capazes de induzir modificações na composição e fisiologia das células bacterianas, as quais podem comprometer sua resposta ao estresse, incluindo a susceptibilidade à antimicrobianos (Wang e Quinn 2010). Neste sentido, nossos resultados demonstram que a baixa temperatura sensibiliza células de *Salmonella* Typhimurium à ação de nisina, em diferentes condições de pH.

A utilização de baixas temperaturas no armazenamento e conservação de alimentos é uma das estratégias mais eficaz e utilizada para o controle microbiológico e extensão da vida útil (Aste e Del Pero 2017). Sua aplicação reduz a velocidade das reações metabólicas, o que minimiza o crescimento microbiano, e, conseqüentemente, favorece a conservação dos alimentos (Nerín *et al.* 2016). Além disso, temperaturas de refrigeração podem provocar alterações estruturais na membrana externa de células Gram-negativas, como *Salmonella* Typhimurium e, com isso, favorecer a ação de antimicrobianos (Eliasson e Tatini 1999).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas apresenta como constituinte principal a molécula de lipopolissacarídeo (LPS) que possui estrutura composta por um polissacarídeo hidrofílico e um componente hidrofóbico referido como lipídeo A (Wang e Quinn 2010). A camada aniônica de LPS confere característica de hidrofiliicidade à membrana externa e, como resultado, se torna uma barreira contra a passagem de moléculas hidrofóbicas, como a nisina, para o seu interior (Khan *et al.* 2015). Por isso, mudanças nas condições ambientais podem acarretar alterações nas interações entre as moléculas de LPS, o que favorece a exposição do lipídeo A e fosfolípídeos em sua superfície, e, conseqüentemente, a formação de canais hidrofóbicos que permitem a difusão da nisina na célula (Boziaris e Adams 2001; Khan *et al.* 2015). Essas modificações nas cargas e na estrutura da camada de LPS a tornam mais sensível e afetam

a permeabilidade da membrana externa, o que favorece a atividade de nisina (Wang e Quinn 2010). Ademais, moléculas presentes na membrana externa podem atuar como sítios de ligação e atrair a nisina de forma a favorecer a formação de complexos moleculares entre si e, assim, facilitar a ruptura da membrana induzida pela bacteriocina (Lanne *et al.* 2018).

Nossos dados indicam que o aumento da concentração de nisina foi associado a maior redução na viabilidade do patógeno. A influência da concentração da bacteriocina sobre o comportamento observado do micro-organismo já foi previamente demonstrada por Bordignon-Junior *et al.* (2012) ao observarem que quando utilizadas concentrações de 493 AU/mL de nisina, obteve-se um efeito bactericida contra as células de *Salmonella* Typhimurium, e já quando utilizadas concentrações menores (até 278 AU/mL), o efeito foi apenas bacteriostático (Bordignon-Junior *et al.* 2012). Resultados similares também foram obtidos por Khan *et al.* (2015) que verificaram que a redução de viabilidade das células de *Salmonella* Typhimurium era diretamente proporcional à concentração de nisina (Khan *et al.* 2015).

A maior eficiência bactericida de nisina foi observada em condições de baixo pH, a qual pode estar relacionada a maior estabilidade e solubilidade do peptídeo em condições ácidas (Delves-Broughton *et al.* 1996). Estes resultados também podem estar associados às modificações na membrana externa do patógeno que podem ocorrer mesmo em condições de estresse ácido subletal, e assim contribuir para a atividade de antimicrobianos (Rowbury 2003). Resultados similares também foram obtidos por Prudêncio *et al.* (2015).

Similarmente ao observado nos ensaios *in vitro*, quando avaliada no suco de laranja refrigerado, nisina demonstrou evidente atividade contra *Salmonella* Typhimurium. Nestas condições, a baixa acidez associada a baixa temperatura

possivelmente contribuíram com a sensibilização do micro-organismo à bacteriocina. Além disso, sugere-se que o baixo pH possa ocasionar a ruptura da membrana externa (Thongbai *et al.* 2006). Paralelamente, a alta acidez do suco de laranja também pode ter contribuído para melhor eficiência de nisina, devido à sua maior solubilidade nestas condições (Moreno *et al.* 2000).

Por outro lado, a exposição das células à temperatura de refrigeração também pode afetar seus processos metabólicos e resultar em diversas alterações fisiológicas de forma a alterar a permeabilidade da sua membrana externa e, assim, tornar a célula suscetível a injúria e lesões (Ricke *et al.* 2018). Essa susceptibilidade, provocada pela baixa temperatura, pode ter gerado um efeito sinérgico quando associada à nisina. Tal sinergismo foi demonstrado por Alpas e Bozoglu (2000) ao observarem que a associação de bacteriocina à APH e calor térmico em suco de laranja elevou a redução da viabilidade de *Salmonella* Typhimurium em mais de 8 ciclos logarítmicos quando comparada ao efeito de cada tratamento isoladamente. Resultado similar também foi observado por Liang *et al.* (2002) ao constatarem um aumento de 0,04 para 2,75 ciclos logarítmicos na perda da viabilidade das células de *Salmonella* Typhimurium quando associaram nisina ao uso de Campo Elétrico Pulsado. Do mesmo modo, Boziaris e Adams (2001) constatarem em seu estudo que a adição de nisina durante o tratamento térmico com baixas temperaturas aumenta a letalidade do processo contra *Salmonella* Typhimurium e outros micro-organismos Gram-negativos.

Assim, nossos resultados sugerem que fatores ambientais como baixo pH e baixa temperatura tornam as células de *Salmonella* Typhimurium susceptíveis à ação bactericida de nisina e, com isso, podem atuar sinergicamente no controle deste patógeno em alimentos refrigerados.

5. Conclusão

Neste estudo, demonstramos que a exposição à temperatura de refrigeração e ao baixo pH sensibiliza células de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 à ação de nisina *in vitro* e em suco de laranja. O efeito sinérgico observado sugere o uso desse bioconservante como um método alternativo de conservação, eficaz no controle de *Salmonella* em alimentos que passam pelo processo de refrigeração e que podem ser fontes de contaminação deste importante patógeno. Ademais, apontam para relevância desse estudo, uma vez que a utilização de técnicas alternativas de conservação, como o uso de bioconservantes, pode impactar positivamente na saúde da população já que sua aplicação implica na redução do uso de aditivos químicos e da utilização de técnicas intensas de conservação que comprometem a disponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos.

No entanto, a escassez de estudos que avaliam a influência das condições ambientais na sensibilização de micro-organismos Gram-negativos à ação de nisina reforça a necessidade de mais pesquisas para se entender melhor o comportamento deste e de outros micro-organismos Gram-negativos quando expostos a condições de baixa temperatura e baixo pH. Além disso, o uso de nisina na produção de sucos carece de pesquisas que meçam sua viabilidade através de testes que avaliem a dose e modo de uso mais adequados.

6. Conflito de interesses

Nenhum conflito de interesse declarado.

7. Referências

- Agcam, E, Akyildiz, A e Akdemir, GE (2016) Comparative assessment of long-term storage stability and quality attributes of orange juice in response to pulsed electric fields and heat treatments. *Food and Bioprocess* **99**, 90–98.
- Ahmad, V, Khan, MS, Jamal, QM, Alzohairy, M, Al Karaawi, MA e Siddiqui, MU (2017) Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int J Antimicrob Agents* **49**, 1-11.
- Alpas, H. e Bozoglu, F. (2000) The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice. *World J Microbiol Biotechnol* **16**, 387-392.
- Aneja, KR, Dhiman, R., Aggarwal, NK, Kumar, V. e Kaur, M. (2014) Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *Internat Jour Food Scien* **21**, 121-142.
- Aste, N, Del Pero, C, Leonforte, F (2017) Active refrigeration technologies for food preservation in humanitarian context – A review. *Sust Energ Tec and Assess* **35**, 254-263.
- Barbosa, JC. e Maldonato JÚNIOR, W. (2010) AgroEstat: System for statistical analysis of agronomic trials. Version 1.0.
- Berdejo, D, Pagán, E, Garcia-Gonzalo, D e Pagán, R (2019) Exploiting the synergism among physical and chemical processes for improving food safety. *Curr Opin in Food Scie* **30**, 14–20.
- Berger, CN, Sodha, SV, Shaw, RK, Giffin, PM, Pink, D, Hand, P e Frankel, G (2010) Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmen Microbiol* **12**, 2385–2397.
- Bordignon-Junior, SE (2012) Inhibiting the growth of Gram-negative bacteria. *J of Biotec and Biodiv* **3**, 127-135.
- Bozariis, IS, e Adams, MR (2001) Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *J of App Micro* **91**, 715-724.
- Brasil (1996) Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento.
- Brugos, AFO, Gut, JAW e Tadini, CC (2018) Inactivation kinetics of pectin methyl esterase in the microwave-assisted. *LWT-Food Scie and Technol* **97**, 603-609.
- Callejón, RM Rodríguez-Naranjo, MI, Ubeda, C, Hornedo-Ortega, R, Garcia-Parrilla, MC e Troncoso, AM (2015) Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the

United States and European Union: Trends and causes. *Foodbo Pathog and Dise* **12**, 32–38.

Carocho, M., Morales, P. e Ferreira, ICFR (2015) Natural food additives: Quo vadis? *Tren in Food Scie and Technol* **45**, 284–295.

Chalón, MC, Acuña, L, Morero, RD, Minahk, CJ e Bellomio, A (2012) Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods. Are they the definite hurdle?. *Food Res Internatio* **45**, 735–744.

Chikindas, ML, Weeks, R, Drider, D, Chistyakov, VA e Dicks, LM (2017) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin in Biotechnol* **49**, 23–28.

Cleveland, J, Montville, TJ, Nes, IF e Chikindas, ML (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J of Food Microbiol* **71**, 1-20.

Cui, H, Ma, C, Li, C e Lin, L (2016) Enhancing the antibacterial activity of thyme oil against *Salmonella* on eggshell by plasma-assisted process. *Food Control* **70**, 183–190.

de Oliveira Junior, AA, Couto, HGSA, Barbosa, AAT, Carnelossi, MAG. e Moura, TR (2015) Stability, antimicrobial activity, and effect of nisin on the physico-chemical properties of fruit juices. *Int J of Food Microbiol* **211**, 38-43.

Delves-Broughton, J, Blackburn, P, Evans, RJ e Hugenholtz, J (2010) Applications of the bacteriocin, nisin. *Ant Van Leeu* **69**, 193–202.

Elliason, DJ e Tatini, SR (1997) Enhanced inactivation of *Salmonella* Typhimurium and acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Int J of Food Microb* **60**, 153-160.

Ferrario, M, Alzamora, SM, e Guerrero, S (2015) Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiol* **46**, 635-642.

Fiolet, T, Srour, B, Sellem, L, Kesse-Guyot, E, Allès, B, Méjean, C, Deschasaux, M, Fassier, P, Latino-Martel, P, Beslay, M, Hercberg, S, Lavalette, C, Monteiro, CA, Julia, C e Touvier, M (2018) Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: Results from NutriNet-Santé prospective cohort. *Brazil Microbiol Jour* **360**, 23-40.

Fitriyanti, M, e Narsimhan, G (2018) Synergistic effect of low power ultrasonication on antimicrobial activity of cecropin P1 against *E. coli* in food systems. *LWT - Food Scien and Tech* **96**, 175–181.

Guo, X, van Iersel, MW, Chen, J, Brackett, RE e Beuchat, LR (2002) Evidence of association of *Salmonella* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Appl and Environ Microbiol* **68**, 3639–3643.

Harris, LJ, Fleming, HP, Klaenhamme, TA (1992) Developments in nisin research. *Food Research International* **25**, 57-66.

Kawasaki, K. (2012) Complexity of lipopolysaccharide modifications in *Salmonella enterica*: Its effects on endotoxin activity, membrane permeability, and resistance to antimicrobial peptides. *Food Res Int* **45**, 493–501

Khan, A, Vu, KD, Riedl, B e Lacroix, M (2015) Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *LWT - Food Scien and Tech* **61**, 124–129

Lanne, ABM, Goode, A, Prattley, C, Kumari, D, Drasbek, MR, Williams, P, Conde-Álvarez, R, Moriyón, I e Bonev, BB (2018) Molecular recognition of lipopolysaccharide by the lantibiotic nisin. *Biochim et Biophys Acta – Biomembra*, **91**, 189-205.

Lee, J e Kaletunç, G (2010) Inactivation of *Salmonella* Enteritidis strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin. *Int J of Food Microbiol* **140**, 49–56,.

Lee, SY, Sagong, HG, Ryu, S, e Kang, DH (2012) Effect of continuous ohmic heating to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice and tomato juice. *J Appl Microbiol* **112**, 723-731.

Lerner, A., Matthias, T. (2015) Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*

Liang, Z, Mittal, GS, e Griffiths, MW (2002) Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *J Food Prot* **65**, 1081-1087.

Mansor, A, Shamsudin, R, Adzahan, NM, e Hamidon, MN (2014) Efficacy of ultraviolet radiation as nonthermal treatment for the inactivation of *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 in pineapple fruit juice. *Agric Sci Proc* **2**, 173-180.

Moreno, I. Lerayer, ALS, Baldini, VLS e Leitão, MFF (2000) Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *J of Microbiol* **31**, 184-92.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, RM, e Martín-Belloso, O. (2008) Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. *Food Microbiol* **25**, 479-491.

Munõz, A., Caminiti, IM, Palgan, I., Pataro, G., e Noci, F. (2012) Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Res Int* **45**, 299-305.

Nerín, C., Aznar, M., e Carrizo, D. (2016) Food contamination during food process. *Trends in Food Science &* **48**, 63-68.

Oluk, CA e Karaca, OB (2018) The Current Approaches and Challenges of Biopreservation. *Food Saf and Preservat* **18**, 564-596.

Parish, ME, Narciso JA e Friedrich LM (1997) Survival of *Salmonellae* in orange juice. *J Food Saf* **17**, 273–281.

Prudêncio, CV, Mantovani, CQ, Cecon, PR, Prieto, M, e Vanetti, MCD (2016) Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to nisin combined with EDTA. *Food Control* **61**, 248–253.

Prudêncio, CV, Vanetti, MCD e Prieto, M. (2015) Tolerance of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium to nisin combined with EDTA is accompanied by changes in cellular composition. *Food Res Int* **69**, 281–288.

Ricke, SC, Dawoud, TM, Kim, AS, Park, SH e Kwon, YM (2018) *Salmonella* Cold Stress Response: Mechanisms and Occurrence in Foods. *Adva in Appl Microbiol* **67**, 20-58.

Rowbury, RJ (2003) Physiology and molecular basis of stress adaptation, with particular reference to the subversion of stress adaptation and to the involvement of extracellular components in adaptation. In: Yousef, A. E., Juneja, V. K. (Eds.), *Microbial stress adaptation and food safety* Washington, DC: CRC Press, 247–302.

Silva, N., da Junqueira, VCA e Silveira, NFA (2001) Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela.

Sivapalasingam, S., Friedman, CR, Cohen L. e , Tauxe RV (2004) Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J of food protec* **67**, 2342–53.

Shahbaz, HM, Yoo, S., Seo, B., Ghafoor, K., Kim, JU, e Lee, DU (2016) Combination of TiO₂-UV photocatalysis and high hydrostatic pressure to inactivate bacterial pathogens and yeast in commercial apple juice. *Food Bioprocess Technol* **9**, 182-190.

Sung, HJ, Song, WJ, Kim, KP, Ryu, S., e Kang, DH (2014) Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *Int J Food Microbiol* **171**, 147-153.

Terebiznik, MR, Jagus RJ, Cerrutti P., de Huergo MS. e Pilosof AM (2016) Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the Inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* **63**, 741–746.

Thongbai, B., Gasaluck, P. e Waites, WM (2006) Morphological changes of temperature- and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. *LWT - Food Scie and Tech* **10**, 1180-1188.

Utkun, S., e Kunduhoglu, B. (2012) Combined effect of ultrasound and selected essential oil constituents on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* reduction in orange juice. *Afr J Microbiol Res* **6**, 6642-6652.

Wang, X., e Quinn, PJ (2010) Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog in Lipid Res* **49**, 97–107.

World Health Organization (2015) Estimates of the global burden of foodborne diseases 2007-2015. **WHO**, 09–265.

World Health Organization (2019) *Salmonella* (non-typhoidal). **WHO**; Disponível em: <<http://www.who.int> >. Acesso em 15 de Mai. de 2019.

Yusuf, M (2018) Natural Antimicrobial Agents for Food Biopreservation. In Handbook of food Bioengineering ed. Grumezescu, AM e Holban, AM. pp. 419-437. Londres: Academic Press.