

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Potencial de Biocontrole de *Staphylococcus
xylosus* na Produção de Linguiça Frescal e seu
Impacto na Segurança do Alimento**

Rebeca Rodrigues Rocha

**Trabalho apresentado à disciplina
0060029 Trabalho de Conclusão de Curso II, como
requisito parcial na graduação no Curso de
Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo.**


Orientador: Prof. Uelinton M. Pinto

**São Paulo
2022**

Potencial de Biocontrole por *Staphylococcus xylosus* na Produção de Linguiça Frescal seu Impacto na Segurança do Alimento

Rebeca Rodrigues Rocha

**Trabalho apresentado à disciplina
0060029 Trabalho de Conclusão de Curso II, como
requisito parcial na graduação no Curso de
Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo.**

Orientador: Prof. Uelinton M. Pinto

AGRADECIMENTOS

A toda a equipe do setor de cárneos da empresa *Globalfood Advanced Food Technology* (Cleber Costa, Juliane Schneider, Pedro Henrique, Ronildo Martins), pelo fornecimento e elaboração de insumos e materiais que foram fundamentais para a realização das pesquisas experimentais deste trabalho.

À Juliane Schneider e à Michele Anze, da empresa *Globalfood Advanced Food Technology*, e ao professor Uelinton Pinto, que contribuíram para a concepção da ideia norteadora deste projeto.

A todos da empresa *Globalfood Advanced Food Technology*, que compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização dos experimentos para este trabalho, e que contribuíram, ainda que indiretamente, para todo o andamento do projeto, enriquecendo meu aprendizado

Ao professor Uelinton Manoel Pinto, por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com paciência e dedicação.

Ao professor Eduardo Purgatto, por me aconselhar e direcionar durante toda a trajetória até a concepção do projeto.

A todos os técnicos, alunos e colaboradores do laboratório de Microbiologia de Alimentos, por todo auxílio na preparação dos materiais utilizados nos experimentos, que me permitiram apresentar um desempenho otimizado durante os mesmos.

Às pessoas com quem convivi ao longo desse período intenso de estágios e pesquisas que me apoiaram e que certamente tiveram forte impacto na minha formação acadêmica.

Rocha RR. Potencial de Biocontrole por *Staphylococcus xylosus* na Produção de Linguiça Frescal e seu Impacto na Segurança do Alimento. Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Nutrição. São Paulo; 2022.

RESUMO

Os microrganismos patogênicos são uma ameaça à produção de alimentos seguros, sendo também um tópico de alta prioridade para a Organização Mundial da Saúde. A contaminação dos alimentos por agentes patogênicos pode ocorrer nos diversos níveis da cadeia de produção, e ameaçam a segurança alimentar e a inocuidade dos alimentos. Os métodos adotados pela indústria para o controle microbiano utilizam tecnologias que podem causar alterações indesejadas nos produtos, a exemplo dos tratamentos térmicos. Os métodos alternativos para o controle microbiano emergem como uma solução sustentável a longo prazo, além de atenderem a demanda do consumidor por alimentos menos processados. As bactérias benéficas já utilizadas na indústria alimentícia revelam-se como uma alternativa promissora como agentes naturais para conservação dos alimentos. Mais especificamente, na indústria de carnes, bactérias do gênero estafilococos apresentam características bioprotetoras, como o *Staphylococcus xylosus*. Porém, ainda são escassos os estudos que se aprofundam no potencial de tais bactérias como biocontrole, cuja aplicação pode até mesmo ser amplamente utilizada em diversos outros processos e setores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de biocontrole do microrganismo *Staphylococcus xylosus*, utilizado na indústria de carnes, contra os patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*, tanto em ensaios in vitro quanto em ensaios utilizando linguças frescas, para investigar sua ação antagônica e seu potencial em ampliar a segurança dos alimentos. Os resultados obtidos no ensaio com a linguça frescal apontam para o potencial de biocontrole de *S. xylosus* sobre a *Listeria monocytogenes*, reduzindo a contagem do patógeno em quase 2 ciclos decimais (quase 100 vezes) no produto,

após 48 h de incubação a 25 °C. No entanto, nos ensaios *in vitro* que envolveram cultivo em caldo ou ágar BHI, a 37 °C, e naqueles cuja bactéria alvo era a *Salmonella* Typhimurium, não houve inibição nas condições avaliadas. Ressalta-se a necessidade de mais estudos investigando o potencial de biocompetição de *S. xylosus*, especialmente utilizando outras condições de cultivo, já que na literatura o *S. xylosus* se mostrou eficaz na redução de patógenos em ensaios *in vitro*. Deve-se, portanto, continuar explorando esse microrganismo como uma abordagem promissora de biocontrole em ensaios de validação futuros.

Palavras-chave: Biocontrole, indústria de alimentos, carnes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO/OBJETIVO	6
MÉTODOS	9
Testes preliminares	9
Preparo dos inóculos de patógenos	9
Ensaio <i>in vitro</i> I - Sensibilidade das bactérias patogênicas estudadas a <i>S. xylosus</i> em ágar	10
Ensaio <i>in vitro</i> II - Sensibilidade das bactérias patogênicas estudadas a <i>S. xylosus</i> em meio líquido	12
Ensaio <i>in situ</i> - Sensibilidade das bactérias patogênicas estudadas a <i>S. xylosus</i> na matriz alimentar	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
Ensaio <i>in vitro</i> I - Sensibilidade das bactérias patogênicas estudadas a <i>S. xylosus</i> em ágar	16
Ensaio <i>in vitro</i> II - Sensibilidade das bactérias patogênicas estudadas a <i>S. xylosus</i> em meio líquido	17
Ensaio <i>in situ</i> - Sensibilidade das bactérias patogênicas estudadas a <i>S. xylosus</i> na matriz alimentar	21
CONCLUSÕES	24
IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA DE ATUAÇÃO	25
REFERÊNCIAS	26

INTRODUÇÃO/OBJETIVO

Microrganismos patogênicos são uma ameaça à agricultura e às indústrias alimentícias, sendo também um tópico de alta prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022). Segundo a entidade, as enfermidades por alimentos contaminados totalizam cerca de 600 milhões de cidadãos por ano (OMS, 2022). Assim, para tratar desse e de outros desafios relacionados à alimentação, foi desenvolvido o conceito de Segurança do Alimento que, segundo a ISO 22000:2018(E), define-se pela “Garantia de que o alimento não causará efeitos adversos à saúde do consumidor quando for preparado e/ou consumido de acordo com o uso pretendido”. A importância desta norma reside justamente na garantia da qualidade do produto final conforme os produtores de alimentos se adequam a padrões internacionais de produção de alimentos, que por sua vez visam preservar a saúde dos consumidores. Considerando, ainda, segundo a Legislação brasileira, o Direito Humano à Alimentação Adequada (DHAA) como um dos direitos básicos de vida, e, incluindo-se nele a segurança microbiológica do alimento (Brasil, 2006; Guerra, 2019), destaca-se o papel fundamental que a qualidade microbiológica exerce neste aspecto, pois sua ausência representa potenciais riscos de morbidade e mortalidade.

A contaminação microbiológica dos alimentos por agentes patogênicos pode ocorrer nos diversos níveis da cadeia de produção. Dentre os patógenos alimentares mais prevalentes atualmente no mundo, destacam-se a *Salmonella spp.* e a *Listeria monocytogenes* (OMS, 2022). O patógeno *Salmonella* atinge a cadeia de alimentos com frequência a partir da prática da pecuária, por meio da alimentação animal contaminada (Tomičić et al., 2018), e também de práticas inadequadas de cultivo e processamento (Freitas et al., 2010; Doyle et al., 2019, p. 553). Esta bactéria é responsável por causar salmonelose, uma gastroenterite manifestada por náuseas, vômitos, cólicas abdominais, febre, diarreias intensas, sangue nas fezes e que, a depender da gravidade, pode levar à morte (Crump et al., 2015; Doyle et al., 2019, p.

553). Já a *Listeria monocytogenes* possui distribuição ubíqua, sendo encontrada no solo, na água, em produtos lácteos, cárneos, vegetais, e até mesmo em alimentos processados e prontos para consumo (Buchanan et al., 2017; Doyle et al., 2019, p. 917). Tal patógeno também tem a capacidade de tolerar e crescer em ambientes secos, frios e com alto teor de sal, além de crescer facilmente em alguns alimentos e ambientes refrigerados (Mahdavi et al., 2012). Quanto aos danos à saúde humana, a infecção por *Listeria monocytogenes* pode ocasionar desde injúrias leves até manifestações mais graves: em adultos saudáveis, a manifestação clínica mais comum é semelhante a um resfriado, incluindo diarreia, febre, náuseas e vômitos, porém, durante a gravidez, pode causar aborto, e em pacientes imunocomprometidos pode causar septicemia ou meningite, e até mesmo óbito (Saldivar et al., 2018; Doyle et al., 2019, p. 926).

Para evitar a contaminação da cadeia de alimentos por esses microrganismos, antibióticos são utilizados na produção primária como promotores de crescimento ou no tratamento de doenças, e também saneantes, sanitizantes e métodos físicos, como aquecimento térmico e irradiação, são utilizados como estratégias de controle microbiológico neste ramo (Hossain et al., 2017). Entretanto, devido às limitações desses métodos, como surgimento de resistência antimicrobiana, impacto na saúde do ser humano e no meio ambiente, muitos países vêm adotando leis e regulamentos que restringem o uso dos mesmos (Gosh et al., 2019; Aragrande & Canali, 2020; Parida et al., 2021). Para superar tais obstáculos, métodos alternativos de controle microbiano emergem como uma solução indispensável e sustentável a longo prazo (Gosh et al., 2019; Arsène et al., 2021; Murugaiyan et al., 2022). Neste sentido, a aplicação de microrganismos benéficos, que já são de uso industrial, na função de inibidores do crescimento de bactérias patogênicas em alimentos, vem demonstrando grande potencial como método alternativo de conservação microbiológica, contribuindo, assim, para o incremento da segurança do alimento (Abdelhamid & El-DougDoug, 2020; Fuochi et al., 2021).

Como validação da eficiência desse processo de antagonismo microbiológico, a fermentação se consolida como uma técnica de conservação secular que se vale dos princípios da biocompetição como método para conservar diversos gêneros

alimentícios. Dentre os gêneros alimentícios que mais se beneficiam desta técnica de conservação, destacam-se os produtos cárneos, cuja presença de microrganismos é decisiva e essencial principalmente para aspectos sensoriais, como também do ponto de vista microbiológico. As culturas utilizadas na elaboração desses produtos conferem, além de cor, sabor e aroma característicos, bioproteção, controle da microbiota do alimento e, ainda, redução do desenvolvimento de contaminação de superfície (Oliveira et al., 2018; Xu et al., 2021).

Sendo assim, a utilização de microrganismos em produtos cárneos com a finalidade de proteção contra patógenos já é amplamente estudada e endossada (Stiles & Holzapfel, 1997; Barcenilla et al., 2022) e revelam-se como uma alternativa promissora de conservação dos alimentos. Na indústria de cárneos, já está bem estabelecido que algumas bactérias do gênero *Staphylococcus* são bioprotetoras, como a *S. xylosus*, aplicada frequentemente em embutidos como salames, presuntos e salsichas fermentadas (Lauková et al., 2010; Cebrián et al., 2020; Xiao et al., 2020). Apesar desta estirpe estar entre os predominantes em produtos cárneos (Martín et al., 2006; Leroy et al., 2017) e de já revelar potencial de biocontrole em conjunto a outras culturas (Cebrián et al., 2020; Barcenilla et al., 2022), ainda são escassos os estudos que se aprofundam no potencial de tais bactérias como biocontrole, cuja aplicação pode até mesmo ser expandida a diversos outros alimentos. Linguiças frescas, por exemplo, apresentam, em diversas localidades do Brasil, altos níveis de contaminação microbiológica, inclusive por *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (Silva et al., 2004; Spricigo et al., 2008; Souza et al., 2014; Adami et al., 2015), preocupando tanto produtores quanto consumidores desses alimentos. Tal matriz alimentar ainda não foi explorada como candidata à aplicação da cultura de *S. xylosus*, porém, por se tratar de um produto cárneo fresco, que pode apresentar elevados níveis de contaminação, tende a se beneficiar sobremaneira com tal investigação.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de biocontrole do microrganismo *Staphylococcus xylosus*, utilizado na indústria alimentícia de carnes, como aplicação tecnológica contra os patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium em linguiças frescas, investigando sua ação antagônica e

seu potencial em ampliar a segurança dos alimentos beneficiados com uso dessa cultura.

MÉTODOS

TESTES PRELIMINARES

Testes preliminares foram desenvolvidos com o blend de cepas de *Staphylococcus xylosus* (Globalstart X100-1), fornecidos pela Lallemand®, por meio da *Globalfood Advanced Food Technology*, armazenadas de forma liofilizada em sachets, para definir as melhores condições de crescimento da bactéria e assim proceder com os testes propostos. Nesta etapa, evidenciou-se que o blend de *Staphylococcus xylosus* tem um crescimento ótimo em caldo e ágar BHI, e em ágar Baird-Parker. Portanto, tais meios de cultura foram os elencados para o cultivo da bactéria *Staphylococcus xylosus* no presente estudo.

PREPARO DOS INÓCULOS DE PATÓGENOS

Estirpes de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 do banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, mantidas em ultrafreezer a -80 °C, foram reativadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 18 h a 37 °C. A pureza das

culturas foi avaliada em ágar Oxford (*L. monocytogenes*) e XLD (*Salmonella*), respectivamente. As estirpes dos patógenos foram cultivadas em BHI por 18 h a 37 °C antes de cada experimento.

ENSAIO *IN VITRO* I - SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ESTUDADAS A *S. XYLOSUS* EM ÁGAR

A fim de verificar a capacidade de inibição do crescimento das bactérias patogênicas estudadas por *S. xylosus*, o blend de cepas da espécie (Globalstart X100-1), obtido da empresa Lallemand, foi avaliado quanto seu potencial de biocompetição, a partir de uma metodologia baseada na descrita por Linthorne et al. (2015).

Desta forma, *S. xylosus* liofilizada foi previamente cultivada em caldo BHI, por 18 h a 37 °C. Na sequência, o blend de culturas foi estriado de forma circular em ágar BHI. A seguir, em um experimento adaptado de Figueira (2022), uma estria de cada uma das bactérias patogênicas estudadas (*L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*) foi feita de forma a preencher parte da área interna delimitada pela estria previamente feita com o blend de *S. xylosus*, representado pelo círculo em azul nas Figuras 1 e 2. A Figura 1 representa, com a estria em amarelo, a cultura de *L. monocytogenes*, e, na Figura 2, em laranja, é representado o inóculo de *S. Typhimurium*.

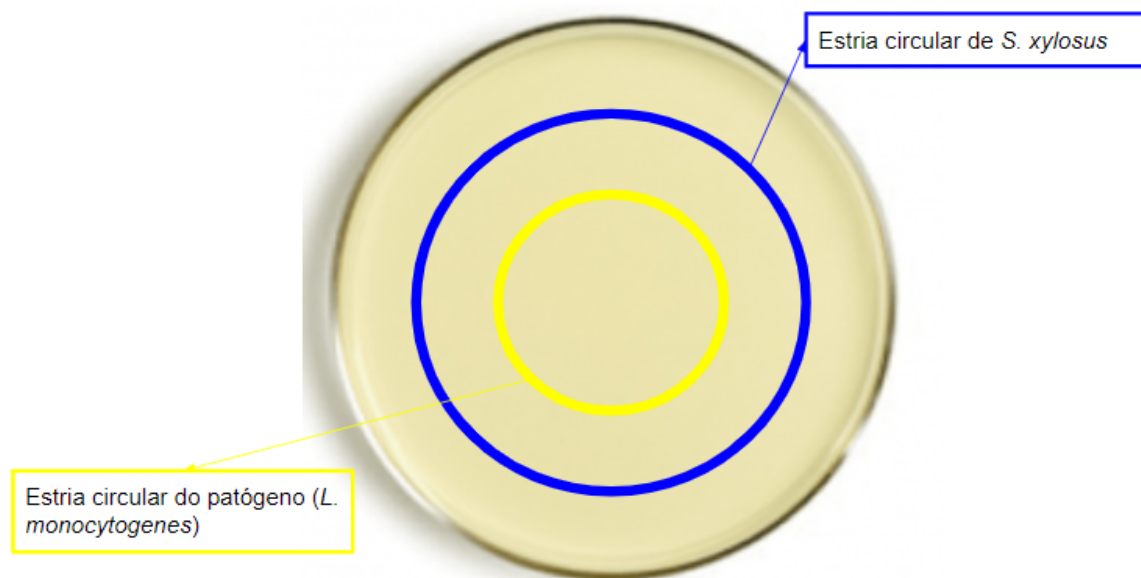


Figura 1. Esquema representativo de estriamento de *S. xylosus* e *L. monocytogenes*. Fonte: A autora.

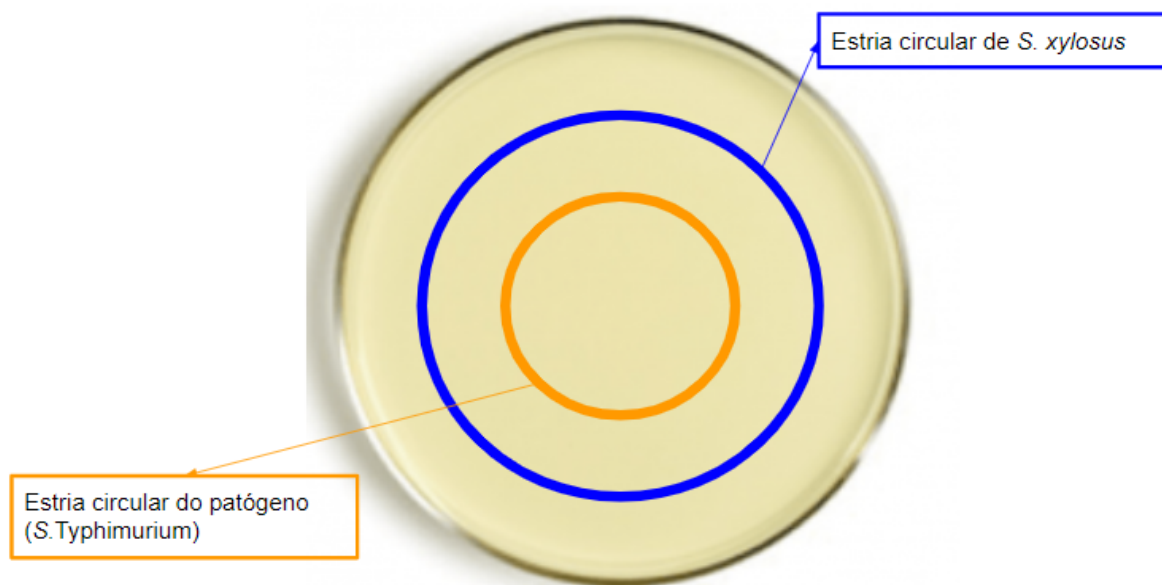


Figura 2. Esquema representativo de estriamento de *S. xylosus* e *S. Typhimurium*. Fonte: A autora

Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C, e foi verificado o comportamento do crescimento das bactérias *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* na presença de *S. xylosus*, após 24 h.

ENSAIO *IN VITRO* II - SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ESTUDADAS A *S. XYLOSUS* EM MEIO LÍQUIDO

Cinco frascos contendo 20 mL de caldo BHI foram inoculados conforme o esquema a seguir:

1. Cultura contendo 10^6 UFC/mL de *S. xylosus* (controle 1)
2. Cultura contendo 10^6 UFC/mL de *L. monocytogenes* (controle 2)
3. Cultura contendo 10^6 UFC/mL de *S. Typhimurium* (controle 3)
4. Solução contendo 10^6 UFC/mL de *S. xylosus* mais solução contendo 10^6 UFC/mL de *L. monocytogenes* (Tratamento 1)
5. Solução contendo 10^6 UFC/mL de *S. xylosus* mais solução contendo 10^6 UFC/mL de *S. Typhimurium* (Tratamento 2)

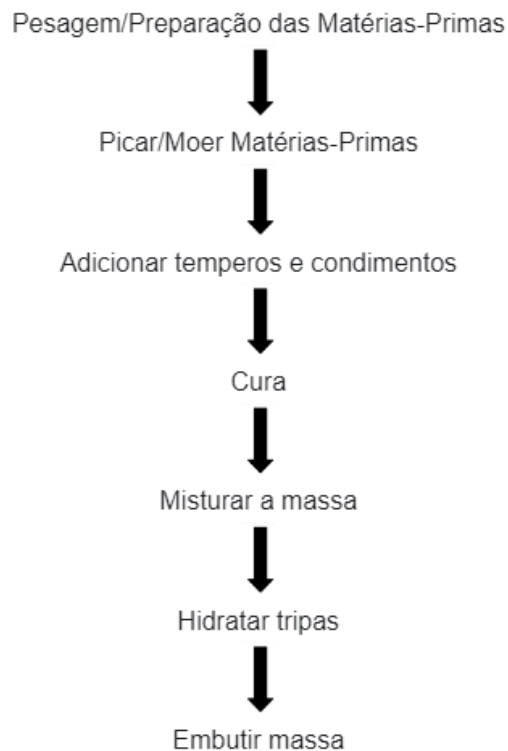
Para atingir a população de 10^6 UFC/mL de cada bactéria, uma alíquota de 440 μ L das culturas cultivadas por 18 h foi transferida para 10 mL de caldo BHI. Avaliou-se então, a turbidez desta diluição com o uso do espectrofotômetro, que alcançou valores de Densidade Óptica (DO600) a 600 nm de 0,1, onde estima-se que a população de bactérias é 10^8 UFC/mL. Em seguida, uma alíquota 200 μ L de cada inóculo na DO600 de 0.1 foi inoculada em 20 mL de caldo BHI, atingindo, então, a população final de 10^6 UFC/mL, como postulado.

Assim, as populações de *S. xylosus* e das bactérias patogênicas estudadas foram estimadas nos caldos imediatamente após sua inoculação e a cada 2 horas, por 8h seguidas de incubação a 37 °C e, após 24 h de cultivo. Para isso, alíquotas (microgotas de 10 μ l) de diluições seriadas foram semeadas em Ágar Oxford, para enumeração de *L. monocytogenes*, em placas de ágar XLD, para enumeração de *S. Typhimurium*, e em ágar Baird Parker, para enumeração de *S. xylosus*. As diluições seriadas foram semeadas em triplicatas, e as placas foram incubadas a 37 °C. Após 24 h, as colônias foram contadas e as populações estimadas.

ENSAIO *IN SITU* - SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ESTUDADAS A *S. XYLOSUS* NA MATRIZ ALIMENTAR

O processamento das amostras de linguiça foi realizado na Planta Piloto de Carnes, pertencente à empresa *Globalfood Advanced Food Technology*, localizada na Vila Santa Catarina, São Paulo.

A formulação da linguiça foi feita conforme os ingredientes e procedimentos usualmente adotados na indústria de alimentos, a saber: carne suína (pernil), toucinho, água, salsa, pimenta, ervas, corante carmim, sal, sal de cura (10% de nitrito) e lactato de sódio; sendo tais ingredientes incorporados inicialmente em uma bateadeira até se obter uma massa homogênea de linguiça. Posteriormente, essa massa passou por um processo de cura *overnight* na geladeira e foi embutida em tripas hidratadas (Fluxograma 1).



Fluxograma 1 - Esquematização da preparação da linguiça utilizada no ensaio III. Fonte: A autora.

Para verificar o potencial de *S. xylosus* em inibir o crescimento de bactérias patogênicas na matriz alimentar, a saber, linguiça frescal com tripa, foi empregado o seguinte procedimento:

1. Um lote de linguiça foi elaborado sem a adição da cultura Globalstart X100-1, seguindo apenas a formulação e os procedimentos usualmente adotados na indústria (Controle);
2. Um lote de linguiça foi elaborado com a adição de 6×10^{11} UFC/g de cultura Globalstart X100-1 na massa durante o preparo da linguiça. A formulação da massa foi feita de acordo com as quantidades e procedimentos rotineiramente empregados na indústria (Tratamento).

O preparo da cultura para utilização na linguiça experimental foi feito diluindo o sachê inteiro fornecido (cuja concentração da bactéria é indicada para trabalhar com 100 kg de carne) em 6 L de água. Desta diluição, foram retirados 30 mL para o preparo de 500 g de carne.

Os controles assim trabalhados na Planta Piloto de carnes foram, então, imediatamente transferidos sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e manipulados seguindo os seguintes procedimentos:

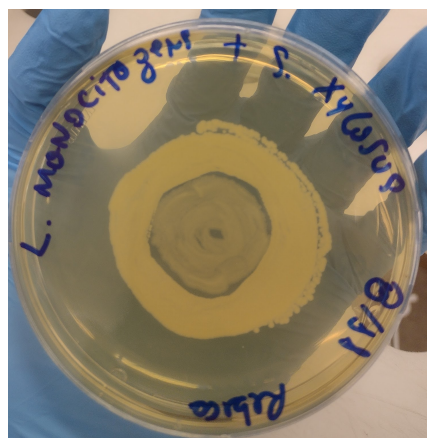
1. Controle 1: linguiça preparada sem a adição da cultura Globalstart X100-1 foi fatiada em rodela de 10 g e foi externamente inoculada com uma solução de *L. monocytogenes* (10^6 UFC/g de linguiça);
2. Tratamento 1: linguiça preparada com a adição da cultura Globalstart X100-1 foi fatiada em rodela de 10 g e foi externamente inoculada com uma solução de *L. monocytogenes* (10^6 UFC/g de linguiça);
3. Controle 2: linguiça preparada sem a adição da cultura Globalstart X100-1 foi fatiada em rodela de 10 g e foi externamente inoculada com uma solução de *S. Typhimurium* (10^6 UFC/g de linguiça);
4. Tratamento 2: linguiça preparada com a adição da cultura Globalstart X100-1 foi fatiada em rodela de 10 g e foi externamente inoculada com uma solução de *S. Typhimurium* (10^6 UFC/g de linguiça).

As rodela de 10 g, assim manipuladas, foram feitas em triplicata e transferidas para uma placa de petri estéril e armazenadas a 25 °C, simulando uma situação inadequada de estocagem do produto, durante 2 dias. Foi, então, analisado o desenvolvimento das populações de bactérias após 48 h de incubação, verificando o comportamento das bactérias patogênicas na presença de *S. xylosus*. Para a estimativa do crescimento das bactérias patogênicas, as rodela foram homogeneizadas em 90 mL de água peptonada, no equipamento *Stomacher*, e alíquotas (microgotas de 10 µl) de diluições seriadas foram plaqueadas em triplicata em meios de cultura seletivos para os patógenos. Vale ressaltar que o ensaio conduzido nessa matriz alimentar foi feito com base nas recomendações protocoladas da Organização Internacional para Padronização (ISO 6887-2, 2017).

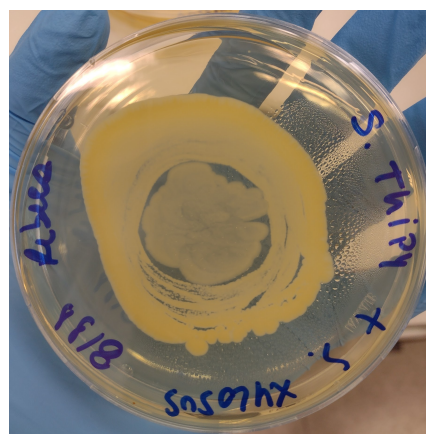
RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO *IN VITRO* I - SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ESTUDADAS A *S. XYLOSUS* EM ÁGAR

O primeiro ensaio *in vitro* conduzido não revelou indícios de inibição por parte do blend de *S. xylosus* sobre os patógenos *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*. A Figura 1 exibe o padrão de crescimento de *L. monocytogenes* quando estriada concomitantemente à *S. xylosus*, e a Figura 2 exibe o padrão de crescimento de *S. Typhimurium* na presença de *S. xylosus*, também quando estriada concomitantemente. Nas estrias avaliadas em duplicata, a *S. xylosus* não demonstrou efeito no crescimento e também não demonstrou sinais de interação com as patogênicas, nas condições do estudo.



(1)



(2)

Figura 1: Imagem ilustrativa do plaqueamento em estrias circulares em ágar de *L. monocytogenes* e *S. xylosus*, no ensaio I. Estrias feitas concomitantemente; Figura 2: Imagem ilustrativa do plaqueamento em estrias circulares de *S. Typhimurium* e *S. xylosus*, no ensaio I. Estrias feitas concomitantemente. Fonte: A autora.

ENSAIO *IN VITRO* II - SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ESTUDADAS A *S. XYLOSUS* EM MEIO LÍQUIDO

O efeito de *Staphylococcus xylosus* nas taxas de crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium* foi estudado também em um meio líquido não seletivo (BHI), sob condições previamente testadas e comprovadas para o ótimo crescimento das espécies. Conforme revela a Figura 3 (representando *S. Typhimurium*) e a Figura 4 (representando *L. monocytogenes*), ao comparar o desenvolvimento das populações bacterianas patogênicas inoculadas de forma individual (controle), com aquelas que foram inoculadas juntamente com *S. xylosus* (tratamento), observou-se que não houve impacto significativo desta última no desenvolvimento dos patógenos.

Controle versus Tratamento - *Salmonella Typhimurium*

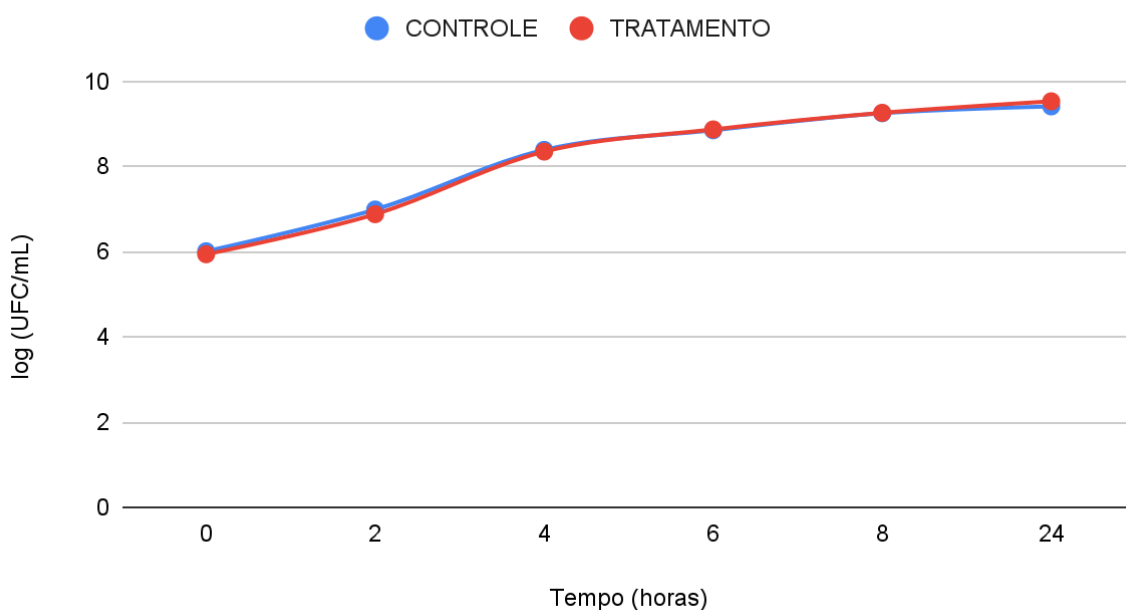


Figura 3 - Comparação da população de *Salmonella Typhimurium* no controle e no tratamento (na presença de *S. xylosus*) em caldo BHI, a 37 °C, conforme a variável tempo.

Controle versus Tratamento - *Listeria monocytogenes*

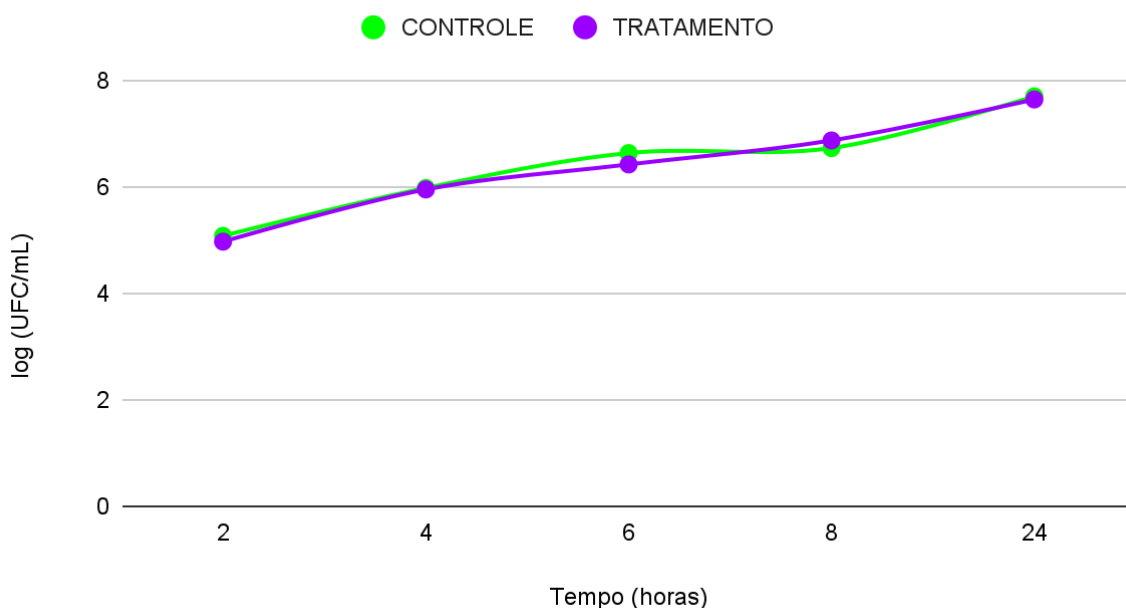


Figura 4 - Comparação da população de *Listeria monocytogenes* no controle e no tratamento (na presença de *S. xylosus*) em caldo BHI, a 37 °C, conforme a variável tempo.

Além dos patógenos, as populações de *S. xylosus* também foram estimadas em cada tratamento, para avaliar o comportamento desta estirpe na presença das bactérias patogênicas. Nesta análise, conforme se observa na Figura 6, a população de *Staphylococcus xylosus* na presença da *Listeria monocytogenes*, foi maior do que aquela obtida no seu controle (solução com *S. xylosus*, apenas). Por outro lado, quando se avalia o crescimento da mesma em conjunto com *Salmonella* Typhimurium, observa-se que este foi ligeiramente menor em comparação a seu controle (Figura 5). Os tempos zero (0h) e dois (2h) do experimento foram excluídos desta análise, pois, devido a falhas na detecção do microrganismo, não foi possível obter uma contagem precisa de colônias de *S. xylosus*.

Os dados da Figura 6 revelam que seria necessário realizar o experimento novamente para que as contagens de *S. xylosus* fossem a mesma no tratamento e no controle, no experimento com *Listeria monocytogenes*, uma vez que há uma nítida diferença entre a população do controle e do tratamento desde o início. Ainda assim, uma alta população de *S. xylosus*, em teoria, deveria ter inibido o patógeno, o que não aconteceu (Figura 4). Já o experimento realizado com *S. Typhimurium* revelou

que o *S. xylosus* manteve sua população constante na presença do patógeno (efeito bacteriostático), enquanto que no controle (apenas *S. xylosus*), houve um ligeiro aumento na sua população.

Staphylococcus xylosus na presença de S. Typhimurium

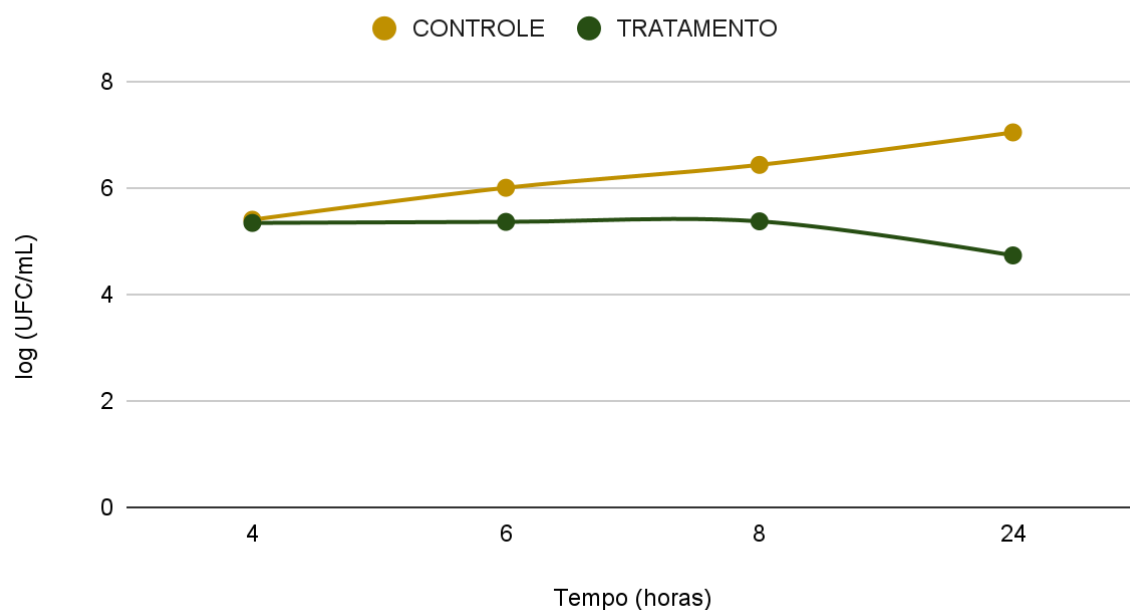


Figura 5 - Comparação da população de *S. xylosus* no controle e na presença de *S. Typhimurium*, em caldo BHI, a 37 °C, conforme a variável tempo.

Staphylococcus xylosus na presença de *L. monocytogenes*

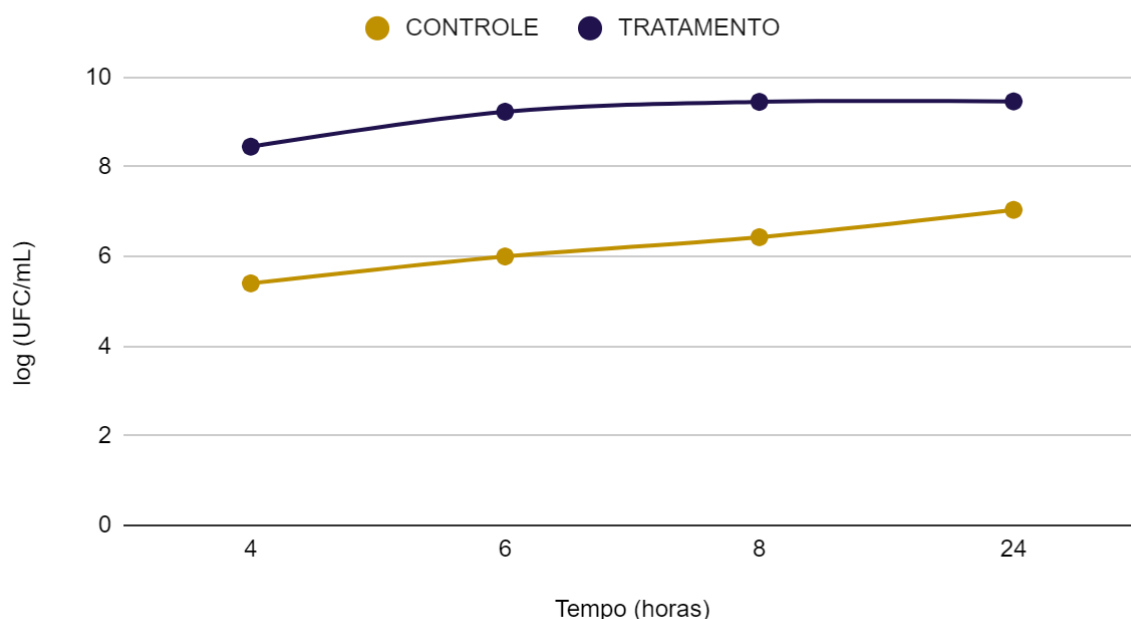


Figura 6 - Comparação da população de *S. xylosus* no controle e na presença de *Listeria monocytogenes*, em caldo BHI, a 37 °C, conforme a variável tempo.

A análise dos dois ensaios conduzidos *in vitro* para investigar o potencial de *S. xylosus* como agente de biocontrole revelou que os resultados não apresentaram evidências a favor da hipótese inicialmente proposta (favorável ao potencial de biocontrole de *S. xylosus* sobre ambas bactérias patogênicas propostas). Uma das possíveis explicações para o resultado obtido pode estar nas condições nas quais os experimentos foram conduzidos, que supostamente modularam a expressão dos fenótipos da estirpe estudada. Tendo em vista que os meios nutritivos e as condições de cultura *in vitro* são diferentes daquelas encontradas na matriz alimentar e em condições reais de processamento, o blend de *S. xylosus* investigado pode ter se comportado de maneira distinta da observada em literatura (Matikeviciene et al., 2017; Zalewska et al, 2018; Newstead et al, 2020).

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos do cultivo bacteriano podem ter interferido na expressão do fenótipo de inibição dos patógenos avaliados no experimento, como por exemplo o meio de cultivo *in vitro*, seu pH, a temperatura de incubação, e a ausência de nutrientes essenciais para o correto desenvolvimento da

cultura. Neste sentido, salienta-se aqui que Zalewska et al. (2018) avaliaram a eficiência de produção de bacteriocinas de *S. xyloso* em cinco diferentes meios de cultura disponíveis comercialmente, e demonstraram que, justamente no meio de cultura BHI, utilizado no presente projeto, nenhuma produção de bacteriocina por *S. xyloso* foi detectada. Ademais, destaca-se que os resultados obtidos *in vitro* são preliminares e esses experimentos merecem ser repetidos, desta vez em condições ajustadas, para conclusões mais assertivas.

ENSAIO *IN SITU* - SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ESTUDADAS A *S. XYLOSUS* NA MATRIZ ALIMENTAR

A sensibilidade de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium a *S. xyloso* também foi testada na própria matriz alimentar carne (linguiça frescal), onde esta última já exerce suas funções sensoriais (sabor e coloração típicos desse alimento).

Conforme a Figura 7, quando o nível de inóculo de 10^6 UFC/g de *Salmonella* Typhimurium foi inoculado em fatias de linguiça tratadas (adicionadas de *S. xyloso*), observou-se um crescimento equivalente aos lotes de controle não tratados (linguiça sem *S. xyloso*), sendo que as mesmas chegaram a uma população de aproximadamente $8,4 \log_{10}$ UFC/g. Tal resultado sugere que *S. xyloso*, nas condições avaliadas, não apresenta efeito inibitório sobre *S. Typhimurium*.

Controle versus Tratamento - Salmonella Typhimurium



Figura 7 - Comparação da população de *S. Typhimurium* controle versus na presença de *S. xylosus*, na matriz alimentar carne. Gráfico elaborado com o valor das médias das repetições. Desvio padrão representado por um traço acima das colunas.

Estes resultados contrastam com os encontrados na literatura, que relata uma possível atividade antagonista dos metabólitos de *S. xylosus* (Mangrolia & Osborne, 2020; Najjari et al., 2020). No entanto, é válido destacar que a literatura sobre os potenciais de *S. xylosus* contra *Salmonella Typhimurium* ainda é escassa e, além disso, as condições dos experimentos conduzidos neste projeto diferem em comparação com os da literatura, uma vez que Mangrolia & Osborne (2020), isolaram os metabólitos de *S. xylosus* para seus ensaios, e Najjari et al., (2020), avaliaram o potencial desta cultura na presença de bactérias lácticas no próprio alimento.

Além disso, supõe-se que o reduzido tempo de incubação das linguças (48 h) pode ter limitado o fenótipo de antagonismo bacteriano, tendo em vista que a espécie avaliada se estabelece e modifica o microambiente alimentar conforme o tempo de fermentação, fator determinante para a expressão de seu fenótipo de biocontrole (Fiorentini et al., 2009; Semedo Lemsaddek et al., 2016). Assim, a capacidade de biocontrole de *S. xylosus* sobre esse patógeno não deve ser descartada, tendo em vista que já foi demonstrado na literatura científica que tal microrganismo, juntamente

com outras cepas utilizadas no processamento de produtos cárneos, exerce uma atividade importante de bioproteção em alimentos (Mangrolia & Osborne, 2020; Najjari et al. 2020).

Ao avaliar o crescimento da população de *L. monocytogenes* na presença de *S. xylosus* na matriz alimentar, observa-se que, quando o nível de inóculo de 10^6 UFC/g de *L. monocytogenes* foi inoculado em fatias de linguiça tratadas (adicionadas de *S. xylosus*), houve uma recuperação menor a 37 °C, com aproximadamente 5,90 log10 UFC/g da bactéria patogênica, enquanto em lotes de controle não tratados (sem a presença de *S. xylosus*), o patógeno chegou a população de 7,60 log10 UFC/g, diferindo, portanto, em quase 2 ciclos logarítmicos, como demonstrado na Figura 8.

Controle versus Tratamento - *Listeria monocytogenes*

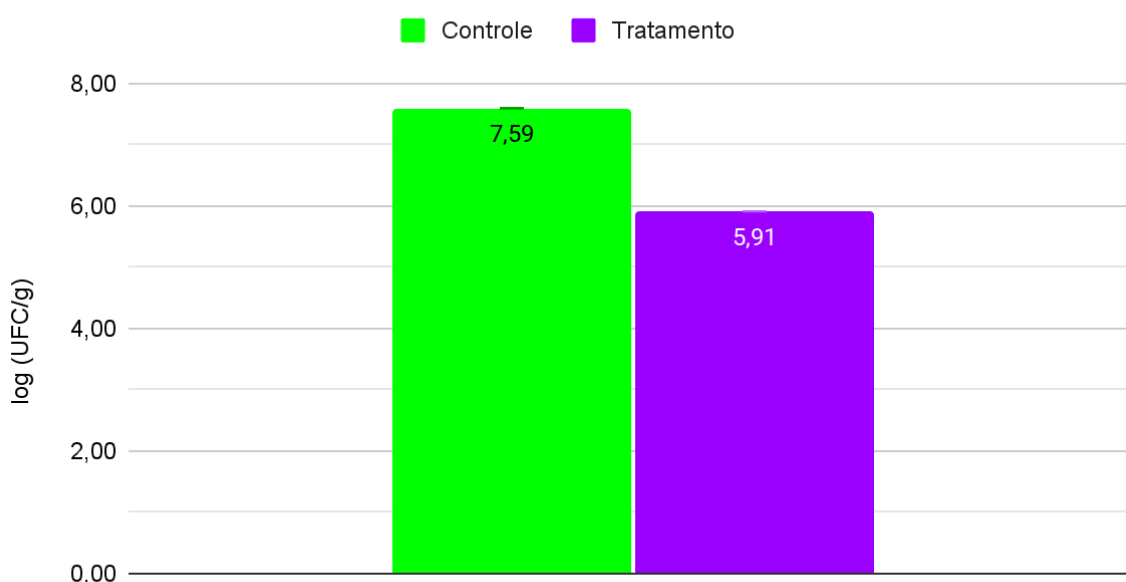


Figura 8 - Comparação da população de *L. monocytogenes* controle e na presença de *S. xylosus*, na matriz alimentar cárnea. Gráfico elaborado com o valor das médias das repetições. Desvio padrão representado por um traço acima das colunas.

Assim, fica evidente que houve uma diferença no crescimento do patógeno *L. monocytogenes* na presença de *S. xylosus*, em comparação com seu controle, o que é corroborado pelos estudos de Villani et al., (1994) e Pedonese et al., (2020) e Lauková et al., (2010). O mecanismo de ação do efeito antagonista de *S. xylosus* sobre este patógeno ainda não foi totalmente elucidado, no entanto, estudos sugerem

que esta atividade se deve principalmente à acidificação da matriz alimentar, tornando o micro ambiente inóspito aos patogênicos (Leroy et al., 2006; Fiorentini et al., 2009; Lorenzo et al., 2016; Barcenilla et al., 2022) como também pela própria síntese de compostos de natureza proteica (bacteriocinas) e lipídica com ação antimicrobiana (Villani et al., 1994; Fiorentini et al., 2009).

CONCLUSÕES

Os experimentos conduzidos neste projeto foram delineados para constituírem resultados preliminares que possam ser utilizados no rol de pesquisas científicas sobre a utilização deste possível agente de biocontrole. Assim, destaca-se que os resultados obtidos no ensaio *in situ*, avaliando o crescimento de *L. monocytogenes* na presença de *S. xylosus*, apontam para mais uma evidência a respeito de seu potencial de biocontrole, apesar de serem necessárias repetições do ensaio para validar tal constatação. Embora o real efeito da ação antimicrobiana de cada cultura ser influenciado por características singulares de cada produto, como ingredientes, temperatura de processamento e armazenamento, aditivos, e até mesmo pela microbiota intrínseca do alimento, a cultura testada demonstrou uma atividade não negligenciável sobre o patógeno, nas condições testadas.

Por fim, ainda que não tenha sido possível obter evidências a favor da hipótese inicialmente proposta nos ensaios *in vitro* e naqueles cuja bactéria alvo era a *Salmonella* Typhimurium, ressalta-se a necessidade de mais estudos investigando o potencial de biocompetição de *S. xylosus*, que já é adaptado aos nichos ecológicos de alimentos, e comprovadamente seguro micro e toxicologicamente (Leroy et al., 2006; Lorenzo et al., 2016; dos Santos et al., 2017; Cebrián et al., 2020). Deve-se, portanto, continuar explorando esse microrganismo como uma abordagem promissora de bioproteção e biocontrole em ensaios de validação futuros.

IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA DE ATUAÇÃO

Segundo a Resolução 600, de 2018, do Conselho Federal de Nutricionistas, o nutricionista tem como um dos ramos de atuação a pesquisa e o desenvolvimento dentro da indústria, sendo que estudos e trabalhos experimentais em alimentação e nutrição se enquadram nesta competência. Desta forma, o projeto apresentado representa uma iniciativa de se conquistar esse espaço dentro de uma indústria de alimentos, uma vez que tanto o desenvolvimento teórico do projeto quanto a própria cultura bacteriana e a matriz alimentar utilizadas foram obtidas por meio da colaboração da equipe de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), do setor de produtos cárneos, da *Globalfood Advanced food technology*, que incentivou e apoiou todo o desenvolvimento do projeto.

Ademais, a concepção da própria pergunta norteadora do projeto foi advinda da aspiração de soluções inovadoras que sejam validadas como alternativas para o uso dos conservantes atualmente aplicados na indústria, em produtos processados da categoria. Desta forma, toda a experiência na elaboração deste projeto foi fundamental e extremamente válida para corroborar a presença do nutricionista em ações de equipes multiprofissionais (engenheiros de alimentos, químicos, gestores de produção, gerentes de P&D), como também para reafirmar a importância deste profissional em se responsabilizar pelo desenvolvimento de produtos seguros e de qualidade nutricional e microbiológica destinados ao consumo humano.

REFERÊNCIAS

- Abdelhamid AG, El-Dougdoug NK. Controlling foodborne pathogens with natural antimicrobials by biological control and antivirulence strategies. *Heliyon*. 6. e05020. 2020.
- Adami FS, Giovanaz LS, Altenhofen G, Dal Bosco SM, Oliveira AM, Oliveira EC. Análise microbiológica e de nitrito e nitrato em linguiça. *Scientia Plena*. 2015;11(05):1-7.
- Aragrande M, Canali M. Integrating epidemiological and economic models to identify the cost of foodborne diseases. *Experimental Parasitology*. 2020;210:107832.
- Arsène MMJ, Davares AKL, Andreevna SL, Vladimirovich EA, Carime BZ, Marouf R, et al. The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary World*. 2021;14(2):319–28.
- Barcenilla C, Ducic M, López M, Prieto M, Álvarez-Ordóñez A. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*, 183, 108661. 2022.
- Brasil. Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional - SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. *Diário Oficial da União*: Brasília, DF, 2006.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, v.75, p. 1-13. 2017.
- Cebrián E, Núñez F, Gálvez FJ, Delgado J, Bermúdez E, Rodríguez M. Selection and Evaluation of *Staphylococcus xylosus* as a Biocontrol Agent against Toxigenic Moulds in a Dry-Cured Ham Model System. *Microorganisms*. 2020;8(6):793.
- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.
- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clinical Microbiology*

Reviews, 28(4):901-37, 2015.

Doyle MP, Diez-Gonzalez F, Hill C. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.

5th Edition. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA, 2019. *Listeria monocytogenes*; p. 917-926.

Doyle MP, Diez-Gonzalez F, Hill C. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.

5th Edition. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA, 2019. *Salmonella*; p. 553.

dos Santos Cruxen CE, Funck GD, da Silva Dannenberg G, Haubert L, de Lima Marques J, Kroning IS, Chaves FC, da Silva WP, Fiorentini ÂM. Characterization of *Staphylococcus xylosus* LQ3 and its application in dried cured sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 2017 Dec 1;86:538-43.

Figueira, Augusto Tiberio. Interações populacionais mediadas por quorum sensing na microbiota do soro-fermento utilizado na produção do queijo Canastra [dissertation]. São Paulo: University of São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2022.

Florentini ÂM, Sawitzki MC, Bertol TM, Brod FC, Pelisser MR, Arisi AC, Sant'Anna ES. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: technological potential for use in fermented sausage. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2009;52:737-46.

Freitas NO, de Penha FR., Barrow P, & Berchieri JA. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 12(1), 01–11. 2010.

Fuochi V, Emma R, Furneri PM. Bacteriocins, A Natural Weapon Against Bacterial Contamination for Greater Safety and Preservation of Food: A Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 22(2):216–31.

Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology*. 2019;27(4):323–38.

Guerra LD da S, Cervato-Mancuso AM, Bezerra ACD. Alimentação: um direito humano em disputa - focos temáticos para compreensão e atuação em segurança alimentar e nutricional. *Ciência Coletiva*. 2019;24:3369–94.

Hossain MDL, Sadekuzzaman M, Ha SD. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International*. 2017;100:63–73.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Food safety

management systems — Requirements for any organization in the food chain. (ISO 22000-:2018(E)). Geneva: ISO, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products. (ISO 6887-2:2017(E)). Switzerland: ISO, 2017.

Lauková A, Simonová M, Strompfová V. *Staphylococcus xylosus* S03/1M/1/2, bacteriocin-producing meat starter culture or additive. Food Control. 2010 Jul 1;21(7):970-3.

Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology. 2006 Feb 15;106(3):270-85.

Leroy S, Vermassen A, Ras G, Talon R. Insight into the Genome of *Staphylococcus xylosus*, a Ubiquitous Species Well Adapted to Meat Products. Microorganisms. 2017 Aug 29;5(3):52.

Linthorne JS, Chang BJ, Flematti GR, Ghisalberti EL, Sutton DC. A Direct Pre-screen for Marine Bacteria Producing Compounds Inhibiting Quorum Sensing Reveals Diverse Planktonic Bacteria that are Bioactive. Marine Biotechnology. 2015; v. 17, n. 1, p. 33–42.

Lorenzo JM, Gómez M, Purriños L, Fonseca S. Effect of commercial starter cultures on volatile compound profile and sensory characteristics of dry-cured foal sausage. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2016 Mar 15;96(4):1194-201.

Mahdavi, M; Jalali, M; Safaei, HG and Shamloo, E. Microbial quality and prevalence of *Salmonella* and *Listeria* in eggs. International Journal of Environmental Health Engineering. 1: 48. 2012.

Mangrolia U, Osborne WJ. *Staphylococcus xylosus* VITURAJ10: Pyrrolo [1,2 α] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) (PPDHMP) producing, potential probiotic strain with antibacterial and anticancer activity. Microbial Pathogenesis. 2020.

Martín B, Garriga M, Hugas M, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Aymerich T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. The International Journal of Food Microbiology. 2006 Mar 15;107(2):148-58.

Matikeviciene V, Grikiškis S, Lubyte E, Dienys G. Partial purification and characterization of bacteriocin-like peptide produced by *Staphylococcus xylosus*. In

ENVIRONMENT. TECHNOLOGIES. RESOURCES. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference 2017 Jun 15 (Vol. 3, pp. 213-216).

Murugaiyan J, Kumar PA, Rao GS, Iskandar K, Hawser S, Hays JP, et al. Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics*. 2022;11(2):200.

Najjari A, Boumaiza M, Jaballah S, Boudabous A, Ouzari HI. Application of isolated *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* strains as a probiotic starter culture during the industrial manufacture of Tunisian dry-fermented sausages. *Food Science & Nutrition*. 2020 Aug;8(8):4172-84.

Newstead LL, Varjonen K, Nuttall T, Paterson GK. Staphylococcal-Produced Bacteriocins and Antimicrobial Peptides: Their Potential as Alternative Treatments for *Staphylococcus aureus* Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Jan 21;9(2):40.

Oliveira M, Ferreira V, Magalhães R, Teixeira P. Biocontrol strategies for Mediterranean-style fermented sausages. *Food research international* 2018;103:438–49.

Parida VK, Saidulu D, Majumder A, Srivastava A, Gupta B, Gupta AK. Emerging contaminants in wastewater: A critical review on occurrence, existing legislations, risk assessment, and sustainable treatment alternatives. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2021;9(5):105966.

Pedonese F, Torracca B, Mancini S, Pisano S, Turchi B, Cerri D, Nuvoloni R. Effect of a *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* protective culture on *Listeria monocytogenes* growth and quality traits of Italian fresh sausage (salsiccia) stored at abusive temperature. *Italian Journal of Animal Science*. 2020 Dec 14;19(1):1363-74.

Saldivar JC, Davis ML, Johnson MG, Ricke SC. *Listeria monocytogenes* adaptation and growth at low temperatures: mechanisms and implications for foodborne disease. In *Food and feed safety systems and analysis* (pp. 227-248). Academic Press. Jan 1 2018.

Semedo-Lemsaddek T, Carvalho L, Tempera C, Fernandes MH, Fernandes MJ, Elias M, Barreto AS, Fraqueza MJ. Characterization and technological features of autochthonous coagulase-negative staphylococci as potential starters for portuguese dry fermented sausages. *Journal of Food Science*. 2016 May;81(5):M1197-202.

Shamloo E, Hosseini H, Moghadam ZA, Larsen MH, Haslberger A, Alebouyeh M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2019;20(4):241.

Silva WP, Lima AS, Gandra EÁ, Araújo MR, Macedo MR, Duval EH. *Listeria* spp. no

processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 2004;34:911-6.

Souza MD, Pinto FG, Bona EA, Moura AC. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguiças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2014 Apr;81:107-12.

Spricigo DA, Matsumoto SR, Espíndola ML, Ferraz SM. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. *Food Science and Technology*. 2008;28:779-85.

Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *The International Journal of Food Microbiology* 1997 Apr 29;36(1):1-29.

Tomičić Z, Čabarkapa I, Čolović R, Đuragić O, Tomičić R. *Salmonella* in the feed industry: Problems and potential solutions. *Journal of Agronomy*. 2018.

Villani F, Pepe O, Mauriello G, Salzano G, Moschetti G, Coppola S. Antimicrobial activity of *Staphylococcus xylosus* from Italian sausages against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 159-161. 1994.

Winkelströter LK, Teixeira FB, Silva EP, Alves VF, De Martinis ECP. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. *Microbial Ecology*, 68(1), 35–46. 2013.

World Health Organization. Report: Foodborne diseases [Internet]. [citado 27 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases>

Xiao Y, Liu Y, Chen C, Xie T, Li P. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on flavour development and bacterial communities in Chinese dry fermented sausages. *Food Research International*. 2020;135:109247.

Xu MM, Kaur M, Pillidge CJ, Torley PJ. Evaluation of the potential of protective cultures to extend the microbial shelf-life of chilled lamb meat. *Meat Science*. 2021;181:108613.

Zalewska M, Churey JJ, Worobo RW, Milewski S, Szweda P. Isolation of Bacteriocin-producing spp. Strains from Human Skin Wounds, Soft Tissue Infections and Bovine Mastitis. *Polish Journal of Microbiology*. 2018 Jun 30;67(2):163-70.