

# **Pesquisa da atividade antifúngica com bactérias do ácido láctico**

Dissertação de Mestrado

Natanael Pereira Moreno

Mestrado em

**TECNOLOGIA E SEGURANÇA  
ALIMENTAR**



# Pesquisa de bactérias do ácido láctico com atividades antifúngica

Dissertação de Mestrado

Natanael Pereira Moreno

## Orientador

Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar



Dedico esta dissertação à toda a minha família, que sempre foram o meu pilar, o meu motivo de orgulho, e a razão para entrar nessa batalha acadêmica em busca de conhecimento e da possibilidade de melhorar a minha vida ...

## Resumo

Apesar dos avanços tecnológicos, a deterioração fúngica é ainda uma questão importante na indústria de laticínios. Um dos métodos de prevenção tradicionais inclui as tecnologias barreira, tais como conservantes químicos. Atualmente, existe uma procura por novas técnicas de conservação para atender à crescente procura dos consumidores por produtos lácteos menos processados e sem conservantes. Essas novas técnicas incluem a biopreservação usando culturas antifúngicas protetoras. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo pesquisar bactérias do ácido láctico (BAL) isoladas de queijo de S. Jorge com propriedades antifúngicas, e com potencialidade de aplicação em queijos curados. Foram avaliados 108 isolados pela sua capacidade de inibir o crescimento de duas espécies de fungos dos filos Ascomycota e Zygomycota, *Aspergillus caesiellus* (ATCC 42693) e *Mucor racemosus* (ATCC 42647). Para deteção da atividade antifúngica foi utilizado o método de difusão em agar. Observou-se uma inibição média/elevada do crescimento de *Mucor racemosus* por isolados pertencentes às espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus gilvus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. O fungo *A. caesiellus* foi mais sensível à atividade antimicrobiana das BAL em comparação com o *M. racemosus*. Foram selecionados 6 isolados que apresentaram maior inibição do crescimento do *M. racemosus* (com os códigos SJ22, SJ46, SJ53, SJ83, SJ87 e SJ88) para avaliação dos compostos produzidos por estas BAL em meio de cultura (extratos). Os extratos filtrados produzidos pelos isolados SJ53, SJ87 e SJ88, identificados como *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, apresentaram taxas de inibição superiores a 90%. Para os extratos neutralizados, destacou-se o isolado SJ88 (*Lactobacillus paracasei*), que apresentou uma taxa de inibição de 73%, significativamente superior ( $P < 0,05$ ) aos restantes isolados. O presente trabalho demonstrou assim o potencial de alguns isolados, pertencentes ao género *Lactobacillus*, para inibir o crescimento de fungos. Devido ao estatuto GRAS destas espécies, elas apresentam um forte potencial para serem utilizadas na proteção dos produtos lácteos contra o crescimento de fungos indesejáveis.

## Abstract

Despite technological advances, fungal spoilage is still a main issue in the dairy industry. Among the present methods in use, a large focus concerns the replacement of traditional hurdle technologies such as chemical preservatives by new techniques to meet the increasing consumer demand for less-heavily processed and preservative-free dairy products. These new techniques include biopreservation using antifungal bioprotective cultures. Thus, the present study aims to evaluate lactic acid bacteria (LAB) isolated from São Jorge cheese with antifungal properties, and with potential application in ripened cheeses. One hundred and seven isolates were evaluated by ability of inhibit the growth of two species of fungi in the phyla Ascomycota and Zygomycota, *Aspergillus caesiellus* (ATCC 42693) and *Mucor racemosus* (ATCC 42647). The antifungal activity was evaluated by the agar-diffusion assay. A medium/high inhibition of growth of *Mucor racemosus* was produced by isolates belonging to the species *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus gilvus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. The fungus *Aspergillus caesiellus* was more sensitive to antimicrobial activity of BAL compared to *Mucor racemosus*. The Six isolates that showed greater inhibition of *Mucor racemosus* growth were selected (codes SJ22, SJ46, SJ53, SJ83, SJ87 and SJ88) for evaluation of the compounds produced by these BAL in culture medium (cell-free supernatant). The pure supernatants produced by isolates SJ53, SJ87 and SJ88, identified as *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei*, showed inhibition rates over 90%. For supernatants neutralized, the isolate SJ88 (*Lactobacillus paracasei*), presented a 73% inhibition rate, significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the remaining isolates. The present study demonstrated the high potential of some isolates, belonging to the genus *Lactobacillus*, to inhibit the growth of fungi. Due to the GRAS status of these species, they offer great potential in the protection against mold growth in dairy products.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva, pela sua paciência, pelos seus ensinamentos, conselhos, opiniões, contribuições, e pela forma como transmitiu as suas orientações, durante a realização desta dissertação, e à Márcia Coelho, pelo seu apoio, amizade, e confiança durante a realização da parte prática desta dissertação.

Agradeço ao IITAA - Instituto de Investigação e Tecnologia Agrária e do Ambiente pelo apoio recebido para aquisição dos reagentes. Agradeço também ao Laboratório Regional de Veterinária pela cedência dos fungos *Aspergillus caesiellus* (ATCC 42693) e *Mucor racemosus* (ATCC 42647).

Agradeço imenso aos meus pais e ao resto da minha família pelo carinho, apoio, força, inspiração, e motivação que me deram sempre ao longo desse mestrado.

Por fim, agradeço também aos meus amigos, colegas, e professores, que contribuíram de algum modo, para o meu desenvolvimento a nível pessoal e profissional.

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>                             | <b>4</b>  |
| 2.1 Micotoxinas .....   | 4         |
| 2.2 Deterioração fúngica em alimentos .....                       | 7         |
| 2.3 Contaminação fúngica nos produtos lácteos.....                | 8         |
| 2.4 Fontes de contaminação fúngica.....                           | 9         |
| 2.5 Presença de fungos nos queijos .....                          | 10        |
| 2.6 Micotoxinas no queijo .....                                   | 12        |
| 2.8 Culturas Bioprotetoras .....                                  | 16        |
| 2.9 Bactérias do ácido láctico (BAL).....                         | 16        |
| 2.10 Atividade antifúngica das BAL .....                          | 17        |
| <b>3. Materiais &amp; Métodos .....</b>                           | <b>21</b> |
| 3.1 Microrganismos.....   | 21        |
| 3.2 Detecção da atividade antifúngica .....                       | 21        |
| 3.3 Atividade antifúngica dos extratos produzidos pelas BAL ..... | 23        |
| 3.4 Análise estatística .....                                     | 24        |
| <b>4. Resultados e Discussão.....</b>                             | <b>25</b> |
| <b>5. Conclusões e perspectivas futuras .....</b>                 | <b>34</b> |
| <b>6. Referências Bibliográficas .....</b>                        | <b>35</b> |

## 1. Introdução

Desde do início da produção e armazenamento de produtos alimentares, a deterioração e a perda de alimentos tornou-se uma das questões mais importantes para o homem. Atualmente, estima-se que cerca de um terço dos alimentos são estragados ou desperdiçados mesmo antes do seu consumo (FAO, 2017). Estas perdas estão associadas a um ou mais problemas que ocorrem na cadeia de fornecimento, desde a produção agrícola inicial até ao consumidor final. Relativamente à deterioração dos alimentos ela pode ser física, química e microbiológica, sendo que os parasitas, bactérias e fungos são os principais causadores de deterioração microbiana nos alimentos. Os fungos constituem uma parte importante na deterioração dos alimentos para consumo humano. Além disso, o potencial de produção de micotoxinas por certas espécies de fungos, constitui uma grande ameaça para a saúde humana (Shephard, 2008). Fungos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são conhecidos por sintetizar micotoxinas que são altamente tóxicas e desempenham um papel inegável na deterioração da qualidade higiénica e comercial dos alimentos. Existem seis classes de micotoxinas frequentemente encontradas nos diferentes sistemas alimentares: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, patulina, tricotecenos e zearalenona (Dalié *et al.*, 2009). Em relação à importância e diversidade dos seus efeitos tóxicos, podem ser cancerígenas, imunotóxicas, teratogénicas, neurotóxicas, nefrotóxicas e hépatotóxicas (Dalie *et al.*, 2009). Os bolores e leveduras são capazes de crescer numa grande diversidade de alimentos como cereais, legumes, frutas, carne, leite e produtos derivados do leite (Filtenborg *et al.*, 1996). Devido a esta grande variedade, a deterioração fúngica pode levar a perdas significativas para as indústrias alimentares, e estima-se que cerca de 5% a 10% da produção mundial de alimentos é perdida devido à contaminação fúngica (Pitt & Hocking, 2009).

Os produtos lácteos são menos suscetíveis à deterioração fúngica em comparação com outros produtos, tais como as frutas e legumes, uma vez que são mantidos a temperaturas de refrigeração e são muitas vezes tratados termicamente. Acresce ainda que alguns desses produtos lácteos são fermentados, pelo que podem possuir uma microbiota competitiva, um pH ácido e ácidos orgânicos. No entanto, existe um grande número de espécies de fungos capazes de sobreviver e crescer em produtos lácteos. Esta adaptação deve-se à capacidade dos fungos em utilizar vários substratos, incluindo glúcidos, ácidos orgânicos, proteínas e lípidos presentes no leite e seus derivados (Huis in't Veld, 1996). Além disso, estes fungos são ácido-tolerantes, xerotolerantes e psicrotolerantes, e até certo ponto podem tolerar os conservantes químicos que são

aplicados em certos produtos alimentares para aumentar a vida de prateleira dos produtos (Garnier *et al.*, 2017).

A presença de espécies indesejáveis de fungos nos produtos lácteos pode resultar em várias formas de deterioração. Estas incluem o crescimento visível do fungo na superfície do produto, a produção de metabolitos que geram odores e sabores desagradáveis, bem como alterações visíveis na cor e na textura (Ledenbach & Marshall, 2010).

O controlo da deterioração fúngica é uma grande preocupação para as indústrias alimentares pelo que existe uma grande procura por soluções mais eficientes a fim de evitar e/ou limitar o crescimento ou desenvolvimento de fungos em produtos lácteos. Existem diferentes métodos tradicionais, também chamadas tecnologias de barreiras, que são implementados para controlar tais contaminações, incluindo o tratamento do ar, limpeza e desinfecção, tratamento pelo calor, redução da atividade da água por salga, refrigeração, embalagem em atmosfera modificada, assim como a utilização de conservantes químicos considerados como aditivos alimentares (Ross *et al.*, 2002). Apesar de todos esses métodos de controlo, a deterioração fúngica continua a ser um grande problema para os fabricantes de alguns produtos lácteos, devido ao aumento da resistência fúngica aos tratamentos térmicos e conservantes químicos (Stratford, *et al.*, 2014; Brul & Coote, 1999). Acresce ainda a preferência dos consumidores por produtos naturais que, em conjunto com a evolução da legislação, têm levado os produtores a procurar abordagens de controlo complementares. Esta situação levou ao desenvolvimento de novas (bio) tecnologias de conservação, tais como o uso de culturas bioprotetoras ou bioconservantes (Delavenne *et al.*, 2015).

As culturas bioprotetoras em alimentos podem ser definidas como estirpes de grau alimentar bacterianas ou fúngicas, selecionadas pelas suas propriedades antimicrobianas. Eles diferem dos fermentos que são utilizados principalmente para as suas funções tecnológicas (produção de ácido, aromas, textura, cor, etc.). Entre os microrganismos que possuem propriedades antimicrobianas, as bactérias do ácido láctico (BAL) constituem um grupo muito promissor pois produzem uma grande variedade de substâncias antimicrobianas, incluindo os ácidos orgânicos, tais como ácido láctico e acético, ácidos gordos, péptidos, reuterina, antifúngicos e bacteriocinas (Magnusson & Schnürer, 2001; Lassois *et al.*, 2008).

Nos últimos anos têm surgido vários estudos sobre a incorporação de bacteriocinas em queijos, isoladas ou em combinação com outros compostos, para promover o controlo de microrganismos e o seu desenvolvimento na superfície destes (Chen & Hoover, 2003; Patrovský *et al.*, 2016). A maioria destes estudos sobre a atividade antimicrobiana de BAL centraram-se em efeitos antibacterianos, havendo vários relatos sobre os efeitos

antifúngicos. No entanto, alguns estudos em cereais revelaram que algumas estirpes de BAL produzem péptidos com atividades antifúngicas (Magnusson & Schnurer, 2001; Garofalo *et al.*, 2012; Gupta & Srivastava, 2014).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica em bactérias do ácido láctico (BAL) isolado do queijo de S. Jorge. Será realizada uma primeira avaliação (*screening*) dos isolados que inibem diretamente em placa, as espécies *Aspergillus caesiellus* (ATCC 42693) e *Mucor racemosus* (ATCC 42647). Os isolados que apresentarem maior potencial para inibirem o crescimento do fungo mais resistente (*Mucor racemosus*) serão posteriormente testados num bioensaio. Este bioensaio tem como objetivo avaliar se o efeito inibitório observado se deve à produção de ácido ou de outros compostos produzidos pelas BAL. A identificação destas BAL, bem como a caracterização da atividade antifúngica será essencial para uma potencial aplicação em queijos curados no controlo do crescimento de bolores durante a produção e armazenamento.

A estrutura da presente dissertação divide-se em 5 capítulos. No primeiro capítulo - Introdução, é feito um enquadramento do trabalho, apresentação dos objetivos e explicação da estrutura da tese. O segundo capítulo é constituído pela Revisão Bibliográfica, onde é feita uma revisão da literatura mais atual sobre o tema do presente trabalho. É realizada uma revisão sobre os fungos e produção de micotoxinas, bem como a deterioração fúngica em alimentos e as fontes de contaminação. Dá-se destaque à presença dos fungos nos produtos lácteos e em particular, nos queijos. Por fim, faz-se uma revisão da literatura sobre a prevenção e controlo da contaminação por fungos, com especial relevo para as bactérias do ácido láctico (BAL) e a respetiva produção de metabolitos com atividade antifúngica.

O terceiro capítulo é constituído pelos Materiais e Métodos, onde são descritas as metodologias aplicadas ao longo do trabalho experimental, nomeadamente para a pesquisa das BAL com atividade antifúngica. Os Resultados e Discussão são apresentados no quarto capítulo. Aqui são apresentados os resultados obtidos, fazendo-se a sua análise e discussão. No quinto capítulo - Conclusão, são expostas as conclusões gerais do trabalho e apresentadas sugestões para futuros estudos.