



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Departamento de Ciências Agrárias

FORMULAÇÃO DE UM BIOFILME PARA CONTROLO DA LISTÉRIA EM QUEIJOS

Sofia Patrícia Meneses da Silva

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva

Co-orientadora: Mestre Susana Isabel Chaves Ribeiro

Angra do Heroísmo, 2015





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Propriedades funcionais dos revestimentos e filmes edíveis.	16
Figura 2 - Processo de gelificação de polímeros: (A) Dispersão; (B) Hidratação e (C) Formação.	18
Figura 3 - Mecanismos de ação das bacteriocinas. (A) Formação de poros na membrana citoplasmática por bacteriocinas pertencentes à classe II; (B) Ligação ao lípido II, transportador das unidades de peptidoglicano do citoplasma para a parede célula, por bacteriocinas pertencentes à classe I (lantibióticos) (Adaptado de Cotter <i>et al.</i> , 2005).	29
Figura 4 – Polimerização das esferas de alginato uma solução de cloreto de cálcio (0,05 M).	36
Figura 5 - Imersão dos queijos frescos na solução de alginato (A) (B) e secagem dos queijos revestidos (C).	38
Figura 6 - Produção de bacteriocina (UA/mL) pela <i>Lc. lactis</i> L3A21M1 encapsulada (BAL Encap) e livre (BAL livre) durante 72h a 30°C.	42
Figura 7 - Evolução do pH no queijo sem revestimento (QSRev), com revestimento sem a incorporação de BAL (QCRév) e com revestimento com a incorporação da BAL <i>Lc. lactis</i> L3A21M1 (QCRév +BAL) ao longo do tempo de armazenagem a 4°C. Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão.	43
Figura 8 - Evolução da acidez titulável no queijo sem revestimento (QSRev), com revestimento sem a incorporação de BAL (QCRév) e com revestimento com a incorporação da BAL <i>Lc. lactis</i> L3A21M1 (QCRév +BAL), ao longo do tempo de armazenagem a 4°C. Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão.	44
Figura 9 - Evolução do teor de humidade no queijo sem revestimento (QSRev), com revestimento sem a incorporação de BAL (QCRév) e com revestimento com a incorporação da BAL <i>Lc. lactis</i> L3A21M1 (QCRév +BAL), ao longo do tempo de armazenagem a 4°C. Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão.	45



- Figura 10** - Perda de peso do queijo sem revestimento (QSRev), com revestimento sem a incorporação de BAL (QCRRev) e com revestimento com a incorporação da BAL *Lc. lactis* L3A21M1 (QCRRev +BAL), ao longo do tempo de armazenagem a 4°C. Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão. 47
- Figura 11** - Atividade da água do queijo sem revestimento (QSRev), com revestimento sem a incorporação de BAL (QCRRev) e com revestimento com a incorporação da BAL *Lc. lactis* L3A21M1 (QCRRev +BAL), ao longo do tempo de armazenagem a 4°C. Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão. 48
- Figura 12** - Contagens de mesófilos totais ao longo do tempo de armazenagem a 4°C, para os queijos sem revestimento (QSRev), com revestimento sem a incorporação de BAL (QCRRev) e com revestimento com a incorporação da BAL *Lc. lactis* L3A21M1 (QCRRev + BAL). Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão. 49
- Figura 13** - Contagens de mesófilos totais em PCA e BAL em meio M17 ao longo do tempo de armazenagem a 4°C, para os queijos com revestimento com a incorporação da BAL *Lc. lactis* L3A21M1. Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão. 50
- Figura 14** - Contagens de *Listeria innocua* nos queijos sem revestimento (QSRev), com revestimento sem a incorporação de BAL (QCRRev) e com revestimento com a incorporação da BAL *Lc. lactis* L3A21M1 (QCRRev + BAL), ao longo do tempo de armazenagem a 4°C. Cada valor representa a média de três réplicas e as barras de erro representam o respetivo erro padrão. 51



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ABSTRACT	8
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Revestimentos e filmes edíveis.....	14
2.2. Materiais utilizados nos revestimentos e filmes edíveis	16
2.2.1. Polissacáridos.....	18
2.2.1.1. Alginato	19
2.2.1.2. Amido e derivados.....	20
2.2.2. Proteínas.....	20
2.2.3. Plasticizantes	21
2.3. Incorporação de compostos ativos nos revestimentos e filmes edíveis	21
2.3.1. Bactérias do ácido láctico.....	23
2.3.1.1. Bacteriocinas.....	25
2.3.1.2. Classificação das bacteriocinas	25
2.3.1.3. Mecanismos de ação das bacteriocinas.....	28
2.4. Aplicações dos revestimentos e filmes edíveis	29
2.4.1. Frutos e vegetais.....	29
2.4.2. Produtos cárneos.....	31
2.4.3. Pescado	32
2.4.4. Queijo.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Meios de cultura e condições de crescimento das estirpes.....	35
3.2. Preparação do revestimento edível com e sem a incorporação da BAL	35
3.3. Avaliação da produção de bacteriocina pela BAL em esferas de alginato	36
3.4. Aplicação do revestimento edível em queijo fresco	37
3.4.1. Produção do queijo fresco.....	37
3.4.2. Revestimento dos queijos frescos com alginato	37
3.5. Avaliação físico-química e microbiológica dos queijos frescos.....	38



3.5.1.	Determinação do pH.....	38
3.5.2.	Determinação da acidez titulável	38
3.5.3.	Determinação da perda de peso	39
3.5.4.	Determinação do teor de humidade.....	39
3.5.5.	Determinação da atividade da água	39
3.5.6.	Análises Microbiológicas	39
3.6.	Avaliação da atividade antimicrobiana do revestimento em queijo fresco	40
3.7.	Análise estatística	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1.	Avaliação da produção de bacteriocina em esferas de alginato	41
4.2.	Avaliação físico-química e microbiológica dos queijos frescos revestidos	42
4.2.1.	Determinação do pH.....	42
4.2.2.	Determinação da acidez titulável	43
4.2.3.	Determinação do teor de humidade.....	44
4.2.4.	Determinação da perda de peso	46
4.2.5.	Determinação da atividade da água	47
4.2.6.	Análises Microbiológicas	48
4.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana do revestimento em queijo fresco.....	50
5.	CONCLUSÃO	52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXOS.....	71



AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Doutora Célia Silva pela partilha do saber e as valiosas contribuições ao longo deste trabalho.

À Susana Ribeiro pela amizade, conhecimento e acima de tudo por me ter acompanhado durante todo este trabalho e por incentivar o meu interesse pelo conhecimento e pela ciência.

À Guida Pires, pelo companheirismo e pela colaboração ativa e inestimável contributo prestado no decorrer deste trabalho.

Ao Hélder Nunes, à Maria Mendonça, à Cristiana Maduro Dias, à Sandra Câmara, à Marleen Dinis e à Berta Borges pelos pertinentes comentários, sugestões e incentivos, e pelas oportunas manifestações de companheirismo e encorajamento.

À empresa Chegalvorada (Granja Universitária) pela cedência do leite usado no trabalho.

A toda a minha família, especialmente, aos meus Pais por todo amor, amizade e incentivo.

Ao Samuel Vaz, pelo amor, amizade e paciência! Por me ter acompanhado e ajudado a superar todas as minhas dificuldades ao longo destes anos, e por não deixar desvanecer em mim o espírito cientista.

A todos eles que contribuíram para a concretização deste trabalho, o meu profundo e sentido obrigado.



ABSTRACT

Consumer demands for safer and high quality food products have led to an increased interest in the use of edible coatings and films. The incorporation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in coatings and films, to increase shelf-life of products and to control pathogenic microorganisms is a promising tool for the food industry.

The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect against listeria of an edible biofilm containing a bacteriocin producing LAB strain. The bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* L3A21M1 (lacticin 481) was entrapped in a matrix of alginate, glycerol and maltodextrin and tested for functionality in MRS broth and in fresh cheese experimentally contaminated with *Listeria innocua*. Physical-chemical analyses as weight loss, pH, titratable acidity, moisture and water activity (a_w) of fresh cheese samples were also performed throughout the storage time.

Results indicate that strain *Lc. lactis* L3A21M1 entrapped in alginate beads is able to produce bacteriocin but in smaller amounts. The entrapment of BAL decreases significantly the counts of *L. innocua* during the storage time at 4°C. After 7 days the reduction of listeria population was of 3 \log_{10} (CFU g^{-1}).

Physical-chemical analyses of pH, titratable acidity and water activity of the cheese samples revealed no significant differences ($p > 0.05$) between the cheese samples during time of storage. Cheese samples with LAB coating registered the highest losses in moisture content ($78,41 \pm 2,50$ %) during the first days of storage compared with the cheese samples with and without coatings ($73,72 \pm 1,79\%$ e $72,10 \pm 1,05\%$, respectively). Sample coating contributed significantly ($P < 0,05$) to an increase in moisture content of cheese.

Cheese samples with coating presented the lowest weight loss percentage during the 3 days of storage at 4°C ($P < 0,05$), compared with samples without coating. Nevertheless, the incorporation of *Lc. lactis* L3A21M1 strain resulted in a more accentuated weight loss during the first days of storage. This strain also had a



significantly effect ($P < 0,05$) on the reduction of total mesophilic counts in cheese samples.

These results suggest that the incorporation of strain *Lc. lactis* L3A21M1 in edible coatings acts as an additional barrier to the growth of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh cheese, thus improving cheese safety and extending its shelf life.

KEYWORDS: *Lactococcus lactis*, bacteriocin, fresh cheese, *Listeria innocua*, edible coating



RESUMO

A procura do consumidor por uma melhor qualidade e segurança nos produtos alimentares levou ao desenvolvimento e implementação de revestimentos e filmes edíveis. A incorporação de bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico (BAL) constitui uma ferramenta promissora para aumentar o tempo de prateleira e garantir o controlo de microrganismos patogénicos.

O presente trabalho teve como objetivo formular um biofilme edível que incorporasse uma bactéria produtora de uma bacteriocina, para proteger o queijo fresco contra a contaminação com listéria. Desta forma, um dos principais objectivos deste trabalho consistiu em avaliar o efeito antimicrobiano da incorporação da BAL *Lactococcus lactis* L3A21M1, produtora de uma bacteriocina (lacticina 481), numa matriz de alginato, glicerol e maltodextrina, sobre o crescimento da *Listeria innocua*. Este efeito antimicrobiano foi avaliado através da encapsulação de *Lc. Lactis* L3A21M1 nesta matriz e da aplicação direta deste biofilme sobre o queijo fresco. Foram também avaliados vários parâmetros físico-químicos como a perda de peso, o pH, a acidez titulável, o conteúdo em água e a atividade da água (a_w) ao longo do tempo.

Os resultados obtidos demonstraram que a estirpe *Lc. lactis* L3A21M1 encapsulada em esferas de alginato é capaz de produzir a bacteriocina, embora a produção de bacteriocina seja um pouco inferior neste caso. A incorporação de BAL no revestimento diminuiu significativamente ($P < 0,05$) as contagens de *L. innocua* desde o primeiro dia de armazenagem a 4°C. Esta redução foi mais acentuada ao fim de 7 dias, com um decréscimo de 3 \log_{10} (UFC g^{-1}). As análises físico-químicas efetuadas não demonstram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os diferentes queijos analisados para os parâmetros de pH, acidez titulável e atividade da água. O teor em humidade dos queijos revestidos com a incorporação de BAL apresentou-se mais elevado no início da armazenagem ($78,41 \pm 2,50$ %), em comparação com os queijos com e sem revestimento ($73,72 \pm 1,79$ % e $72,10 \pm 1,05$ %, respetivamente). Observou-se ainda que a presença do revestimento com ou sem BAL contribui significativamente ($P < 0,05$) para um aumento do teor de humidade nos queijos. Os queijos com revestimento, sem



a incorporação de BAL (QCRev), apresentaram uma menor perda de peso durante os primeiros 3 dias de armazenamento a 4°C ($P < 0,05$), em comparação com o queijo sem revestimento. No entanto, a incorporação da estirpe *Lc. lactis* L3A21M1 no revestimento resultou numa perda de peso mais acentuada no início, que se reduziu com o aumento do tempo de armazenagem. A incorporação desta estirpe no revestimento teve ainda um efeito significativo ($P < 0,05$) nas reduções das contagens de mesófilos totais nos queijos. Desta forma, a aplicação do revestimento edível com a *Lc. lactis* L3A21M1 fornece uma barreira adicional ao crescimento de microrganismos patogénicos e contaminantes no queijo fresco, contribuindo para a sua proteção e extensão do tempo de prateleira.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactococcus lactis*, bacteriocina, queijo fresco, *Listeria innocua*, revestimento edível



1. INTRODUÇÃO

A *Listeria monocytogenes* é um microrganismo patogénico de origem alimentar com maior impacto na indústria alimentar nomeadamente em produtos cárneos, produtos vegetais prontos a consumir, pescado e produtos lácteos. É responsável pela listeriose, uma doença severa em humanos e uma das mais importantes doenças de origem alimentar em países industrializados (Schlech,2000). As manifestações clínicas incluem meningoencefalite e septicémia (Roberts & Greenwood, 2003). A listeriose atinge principalmente certos grupos de risco, nomeadamente grávidas, recém-nascidos, idosos e indivíduos imunodeprimidos (EFSA, 2014).

A *Listeria monocytogenes* é ubiquitária, podendo estar presente em alimentos crus ou alimentos processados que tenham sido contaminados antes, durante e/ ou após o processamento (EFSA,2013), ou em ambientes de processamento alimentar, formando biofilmes e colonizando superfícies, utensílios, salmouras entre outros. Esta colonização deve-se a contaminações cruzadas por produtos finais em algumas linhas de processamento (McLauchlin *et al*, 2004; Gameiro, Ferreira-Dias, Ferreira & Brito, 2006; Chambel *et al*, 2007).

A capacidade da listéria de crescer e sobreviver a temperaturas de refrigeração e a pH relativamente baixos, e de tolerar elevadas concentrações de sais, torna o seu controlo difícil (Ye *et al.*, 2008). Na indústria de lacticínios, a contaminação por *L. monocytogenes* está associada não só à utilização de leite cru no fabrico de queijos artesanais, mas também à produção de queijos com leite pasteurizado devido à contaminação posterior pelo ambiente de processamento. Desta forma, é essencial o controlo deste patógeno no fabrico de queijo.

O desenvolvimento e implementação de revestimentos e filmes edíveis têm vindo a responder à procura do consumidor por uma melhor qualidade e segurança nos produtos alimentares. A incorporação de compostos antimicrobianos nos revestimentos edíveis, como as bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico (BAL), apresenta-se como uma alternativa interessante para aumentar o tempo de prateleira e garantir o controlo da *L. monocytogenes* em queijo frescos. As bactérias do



ácido láctico fazem parte da microbiota típica de produtos lácteos tradicionais e enchidos curados, quer pela presença natural ou pela sua adição como culturas de arranque. Estas BAL produtoras de bacteriocinas poderão ser igualmente incorporadas em revestimentos edíveis, de modo a prevenir a contaminação por patógenos.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano da incorporação da BAL *Lactococcus lactis* L3A21M1, produtora de uma bacteriocina (lacticina 481), numa matriz de alginato. Este efeito antimicrobiano será avaliado através da encapsulação de *Lc. Lactis* L3A21M1 em esferas de alginato e da aplicação direta numa matriz sobre o queijo fresco. Serão também avaliados os vários parâmetros físico-químicos como a perda de peso, o pH, a acidez titulável, o conteúdo em água e a atividade da água (a_w) ao longo do tempo. Neste trabalho, foi utilizado a *L. innocua* por segurança, dado que esta espécie tem um comportamento equivalente à *L. monocytogenes*, sendo utilizada por vários autores (Mills *et al.*, 2011).

A estrutura global da tese divide-se em 5 capítulos: No primeiro capítulo, Introdução, é feito um enquadramento do estudo, são apresentados os objetivos e é explicada a estrutura da tese; no segundo capítulo, Revisão Bibliográfica, apresenta-se uma revisão da literatura sobre os revestimentos e filmes edíveis, desenvolvendo os materiais utilizados e a incorporação de compostos ativos; no terceiro capítulo, Materiais e Métodos, apresentam-se as metodologias aplicadas no trabalho experimental, nomeadamente na avaliação da atividade anti-listéria da BAL aplicada em esferas de alginato e no revestimento do queijo fresco e do efeito do revestimento em vários parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos queijos; no quarto capítulo, Resultados e Discussão, são apresentados os resultados obtidos na aplicação das metodologias, fazendo-se a análise e discussão para cada um dos parâmetros estudados comparando-os com outros estudos publicados; no quinto capítulo, Conclusão, são expostas as conclusões do estudo, bem como sugestões para futuras investigações.