

Utilização de bactérias isoladas de queijos açorianos na produção de manteiga com baixo teor em colesterol

Dissertação de Mestrado

Mariana Filipa Bettencourt Teixeira

Mestrado em

**TECNOLOGIA E SEGURANÇA
ALIMENTAR**



Utilização de bactérias isoladas de queijos açorianos na produção de manteiga com baixo teor em colesterol

Dissertação de Mestrado

Mariana Filipa Bettencourt Teixeira

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



Agradecimentos

A realização desta tese não teria sido possível sem a colaboração e apoio de algumas pessoas, assim agradeço em especial:

À minha orientadora Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva, por toda a paciência, dedicação, orientação e disponibilidade prestada, ao longo de todo o trabalho, quer a nível prático, quer teórico.

À Marina Lopes pela disponibilidade em orientar a parte prática.

Às técnicas de laboratório, D.^a Guida Pires, por toda a lavagem e preparação do material utilizado e à D.^a Gabriela Ribeiro pela preparação dos reagentes necessários para a execução dos procedimentos.

Ao Sr. ° Paulo Caetano que trouxe o leite da granja da Universidade dos Açores, para que a nata fosse extraída e posteriormente se produzisse a manteiga.

Ao IITAA - Instituto de Investigação e Tecnologia Agrária e do Ambiente pelo apoio recebido para aquisição dos reagentes e à Chegalvorada pelo fornecimento do leite.

À Sofia Silva pela ajuda disponibilizada para a produção da manteiga, em laboratório.

Agradeço de coração à minha colega Tanisha Sousa, não só pelo apoio, motivação e ajuda ao longo desta dissertação, mas também por todo o companheirismo e amizade que partilhamos ao longo da nossa vida académica.

Aos meus pais, Helena Bettencourt e Armando Teixeira, pela paciência, apoio, e por todos os esforços que fizeram ao longo da vida, dando-me toda a educação e formação que permitiu que hoje fosse possível, a conclusão de mais uma etapa importante da minha vida.

Ao meu namorado, Bruno Pimentel, que não só hoje, mas em todo o meu percurso académico, foi e é um grande apoio, dando-me motivação e encorajando-me a alcançar e a nunca desistir dos meus sonhos. Pelo amor, carinho, amizade e paciência dispensados, nestes últimos meses de trabalho.

À minha irmã, Beatriz Teixeira, que mesmo estando longe durante esta etapa, sempre me apoiou e incentivou, a alcançar mais este objetivo da minha vida.

À restante família e restantes amigos que contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho fosse possível, agradeço-vos todo o apoio, incentivo e amizade. Sou grata a todos sem exceção.

Resumo

Nos dias de hoje há uma crescente procura por um estilo de vida saudável, praticando atividade física e optando por uma alimentação mais regrada e adequada. Sabe-se que a falta destes cuidados gera graves problemas de saúde, sendo as doenças cardiovasculares a principal causa de morte nos países desenvolvidos. Uma das principais causas para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares é o nível elevado de colesterol no sangue. Por esta razão é importante consumir produtos com baixo teor de colesterol e com benefícios para a sua saúde. Os produtos lácteos podem funcionar como um veículo de culturas probióticas onde se incluem as bactérias do ácido láctico (BAL). Determinadas BAL, além de atuarem favoravelmente nos alimentos durante os processos de fermentação, ainda exercem efeitos benéficos na saúde do consumidor. Estes efeitos incluem, por exemplo, a redução do colesterol, e por essa razão algumas BAL podem ser utilizadas como probióticos.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de um conjunto de BAL isoladas do queijo do Pico artesanal, para assimilar e reduzir o colesterol. Após esta pesquisa inicial, foram selecionadas três estirpes de *Lactobacillus paracasei* (estirpes L2A21K5, L3B1M2 e L3B21R1) por reduzirem em maior quantidade o colesterol em meio de cultura. Estas estirpes foram aplicadas diretamente na fermentação de natas, ou imobilizadas em esferas de alginato, para a produção de uma manteiga com baixo teor em colesterol. A maior redução de colesterol (23 %) foi obtida com a imobilização das culturas de BAL em esferas de alginato. O processo de fermentação das natas com as BAL imobilizadas originou uma manteiga com 68 mg/100 g de colesterol (44% de redução). Esta manteiga foi testada numa prova sensorial por um painel de provadores não treinado, e comparada com uma manteiga comercial. Os provadores consideraram a manteiga com baixo teor de colesterol como tendo um bom aspeto, consistência, sabor e aroma (classificação de 4 numa escala 1-5). Desta forma, a manteiga produzida pelo método descrito no presente trabalho tem o potencial de ser considerada como um alimento funcional ao apresentar um teor em colesterol reduzido, além de ter a vantagem de ser um produto totalmente açoriano.

Abstract

Nowadays, there is an increasing demand for a healthy lifestyle, practicing physical activity and opting for a more regular and adequate diet. It is known that the lack of such care generates serious health problems, with cardiovascular diseases being the leading cause of death in developed countries. One of the main causes for the development of cardiovascular diseases is the high level of cholesterol in the blood. For this reason, it is important to consume products with low cholesterol and with health benefits. Dairy products can function as a vehicle for probiotic cultures including lactic acid bacteria (LAB). Certain LAB, besides acting favorably in food fermentation processes, still exert beneficial effects on the health of the consumer. These effects include cholesterol lowering and, for this reason, some of the species may be used as probiotics.

This work aims to evaluate the ability of a set of LAB isolated from artisanal Pico cheese to assimilate and reduce cholesterol. After this initial research, three strains of *Lactobacillus paracasei* (strains L2A21K5, L3B1M2 and L3B21R1) were selected for reducing cholesterol in culture medium. These strains were applied directly to the fermentation of cream, or immobilized on alginate beads, for the production of a low cholesterol butter. The highest cholesterol reduction (23%) was obtained with the immobilization of LAB cultures on alginate beads. The fermentation process of the creams with immobilized LAB produced a butter with 68 mg/100 g of cholesterol (44% reduction). This butter was tested on a sensory test by an untrained panel of tasters, and compared to a commercial butter. The tasters considered the low-fat butter to have a good look, consistency, flavor and aroma (rating 4 on a 1-5 scale). The butter produced by this method has the potential to be included as a functional food, due to the reduced cholesterol content, and has the advantage of being a truly Azorean product.

Lista de abreviações

AVC- Acidente Vascular Cerebral

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

HDL- Lipoproteína de Alta Densidade

BAL- Bactérias do Acido Lático

DCV- Doenças Cardiovasculares

OMS – Organização Mundial de Saúde

INE- Instituto Nacional de Estatística

DGS – Direção Geral da Saúde

FAO- Food and Drug Administration

DO – Densidade Ótica

CO₂ – Dióxido de Carbono

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

NaCl – Cloreto de sódio

nm- Nanómetro

Palavras-Chave: Colesterol, Doenças Cardiovasculares, Manteiga, Bactérias do Ácido Lático, *Lactobacillus paracasei*

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Lista de abreviações.....	v
Índice	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de quadros	x
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1- Colesterol.....	3
2.1.1 Lipoproteínas do plasma	4
2.2. Doenças Cardiovasculares	7
2.2.2. Doenças cardiovasculares e a dieta	9
2.3. Manteiga	11
2.3.1. Origem da Manteiga.....	11
2.3.2. Definição.....	11
2.3.3. Fabrico da Manteiga.....	12
2.3.3.1. Desnatação	13
2.3.3.2. Pasteurização da nata	13
2.3.3.3. Maturação da nata	13
2.3.3.4. Batedura da nata.....	13
2.3.3.5. Lavagem da manteiga	14
2.3.3.6. Malaxagem da manteiga.....	14
2.3.3.7. Salga da manteiga	15
2.3.3.8. Embalagem da manteiga	15
2.3.3.9. Armazenamento da manteiga.....	15
2.3.6. Consumo de Manteiga	16
2.3.7. Composição nutricional da manteiga.....	18
2.4. Bactérias do ácido láctico	20
2.4.1. Caracterização das BAL.....	21
2.4.2. Género <i>Lactobacillus</i>	22
2.4.3. Aplicações industriais das BAL probióticas	23
3. Material e métodos.....	26
3.1. Avaliação das bactérias do ácido láctico (BAL) na redução do colesterol	26

3.2. Doseamento do colesterol	27
3.3. Fermentação das natas	28
3.4. Produção da manteiga	33
3.5. Medição do pH.....	35
3.6. Análise sensorial	35
3.7. Análise estatística.....	38
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Avaliação das bactérias do ácido láctico (BAL) na redução do colesterol	39
4.2. Aplicação das BAL na redução do colesterol em natas fermentadas.....	42
4.3. Produção de manteiga com teor reduzido em colesterol.....	44
4.4. Avaliação sensorial da manteiga com teor reduzido em colesterol	45
5. Conclusão.....	48
6. Referências bibliográficas.....	49
7. Anexos	56
Anexo I – Quadro com as respostas da análise sensorial relativamente ao aspeto da manteiga.....	57
Anexo II – Quadro com as respostas da análise sensorial relativamente à consistência da manteiga	58
Anexo III – Quadro com as respostas da análise sensorial relativamente ao sabor e aroma da manteiga.....	59
Anexo IV – Análise estatística.....	60
Anexo V – Análise estatística do pH colesterol.....	63

Índice de figuras

Figura 1. Principais causas de morte no mundo (WHO, 2011)	7
Figura 2. Fluxograma do fabrico da manteiga	16
Figura 3. Evolução do consumo de leite e produtos lácteos (INE, 2015).	17
Figura 4. Curva de calibração do colesterol. As concentrações foram expressas em mg/mL. O coeficiente de determinação (R ²) obtido foi de 0,9999.	28
Figura 5. Estufa com agitação (80 rpm), utilizada para fermentação das natas.....	29
Figura 6. Frascos com as BAL e as natas para fermentação. Os frascos foram colocados na estufa a 30°C, com agitação (80 rpm), durante 15h.	29
Figura 7. Preparação das esferas de alginato com as BAL incorporadas.....	30
Figura 8. Colocação das natas sob as esferas de alginato com incorporação das BAL	31
Figura 9. Filtração das natas em vácuo para remoção das esferas de alginato. Na imagem em baixo são visíveis as esferas de alginato no coador e a separação das esferas de alginato (no copo com a colher) das natas (à direita em baixo).....	32
Figura 10. Batedura das natas para obtenção de manteiga.	33
Figura 11. Retirada do leiteinho da manteiga.	33
Figura 12. Processo de malaxagem.....	34
Figura 13. Colocação da manteiga nos recipientes.....	34
Figura 14. Folha de questionário para análise sensorial (Adaptado do Regulamento N° 273/2008, anexo IV).....	36
Figura 15. Percentagem de redução de colesterol nas natas fermentadas pelas BAL 16, 21 e 22 imobilizadas nas esferas de alginato (BAL em esferas) ou aplicadas diretamente nas natas (BAL). Os valores apresentados resultam da média de dois ensaios (analisados em duplicado) e as barras de erro correspondem ao erro padrão da média.	42
Figura 16. Valores pH nas natas fermentadas pelas BAL 16, 21 e 22 imobilizadas nas esferas de alginato (BAL em esferas) ou aplicadas diretamente nas natas (BAL). Os valores apresentados resultam da média de dois ensaios (analisados em triplicado) e as barras de erro correspondem ao erro padrão da média.....	43
Figura 17. Doseamento do colesterol (mg/100 g) na manteiga obtida por fermentação das natas com a 16 (<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> L2A21K5) imobilizada em esferas de alginato, e numa manteiga açoriana adquirida no mercado. Os valores apresentados resultam da média de duas amostras) e as barras de erro correspondem ao erro padrão da média.	44
Figura 18. Diagrama de extremos e quartis da avaliação do aspeto de duas manteigas, manteiga comercial e manteiga com baixo teor em colesterol	45

Figura 19. Diagrama de extremos e quartis da avaliação da consistência de duas manteigas, manteiga comercial e manteiga com baixo teor em colesterol. 46

Figura 20. Diagrama de extremos e quartis da avaliação do sabor e aroma de duas manteigas, manteiga comercial e manteiga com baixo teor em colesterol. 47

Índice de quadros

Quadro 1. Características e limites da manteiga para fins alimentares (Portaria n.º 110/88)..	12
Quadro 2. Valores de produção de manteiga por continente, no ano de 2011 (FAOSTAT, 2014)	17
Quadro 3. Valores de produção de manteiga por país da UE, no ano de 2011 (FAOSTAT, 2014)	18
Quadro 4. Composição nutricional da manteiga (INSDRJ, 2017).....	19
Quadro 5. Defeitos da manteiga - Aspeto (Adaptado do Regulamento N° 273/2008, anexo IV)	37
Quadro 6. Defeitos da manteiga - Consistência (Adaptado do Regulamento N° 273/2008, anexo IV).....	37
Quadro 7. Defeitos da manteiga - Sabor e Aroma (Adaptado do Regulamento N° 273/2008, anexo IV)	38
Quadro 8. Avaliação das diferentes BAL em MRS suplementado com colesterol (0,5 mg/mL), após 24 h e 48h em incubação a 30°C. Os valores apresentados correspondem à média de dois ensaios erro padrão da média.	40
Quadro 9. Redução do colesterol pelas BAL em meio de cultura (MRS suplementado com colesterol), após 24 h e 48h. Estão assinaladas as estirpes selecionadas por apresentarem maior redução de colesterol após 48 h.	41

1. Introdução

O colesterol é essencial ao organismo humano, sendo uma parte produzida pelo próprio organismo, em particular no fígado, e a outra obtida através da alimentação, devido à ingestão de produtos animais, como a carne, os ovos e os produtos lácteos (Mannarino *et al.*, 2014).

O organismo humano precisa de colesterol para conseguir produzir as membranas celulares, hormonas, vitamina D e ácidos biliares, que ajudam a digerir as gorduras dos alimentos. No entanto, o organismo necessita apenas de uma quantidade reduzida de colesterol para satisfazer as suas necessidades, pois quando o colesterol está em excesso agrega-se nas paredes arteriais, constituindo placas de aterosclerose que, no limite, poderão obstruir as artérias e provocar um acidente vascular cerebral (AVC) ou enfarte. Quando o sangue oxigenado não chega em quantidade suficiente ao músculo cardíaco pode ocorrer uma dor no peito designada por angina. Se a obstrução da artéria coronária for completa pode desencadear-se um enfarte do miocárdio (Mannarino *et al.*, 2014). As doenças cardiovasculares continuam a ser a maior causa de morte no mundo, pois o aumento de colesterol no sangue aumenta o risco destas doenças, assim como o aumento de ocorrência de AVC (Mannarino *et al.*, 2014).

O colesterol circula no sangue ligado a lípidos e proteínas, e a este conjunto de lípidos e proteínas dá-se o nome de lipoproteína. As lipoproteínas são classificadas em função da respetiva proporção de proteína e lípidos, o que determina a sua densidade, em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de elevada densidade (HDL). As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são vulgarmente conhecidas como o “mau” colesterol, por serem estas as responsáveis pelo depósito de colesterol na parede das artérias, provocando aterosclerose. Quanto mais altas forem as LDL no sangue, maior é o risco de doença cardiovascular (Johnston *et al.*, 2017). Relativamente às lipoproteínas de alta densidade (HDL), estas são conhecidas por colesterol “bom”, que tem como função a limpeza das artérias, pelo que, quanto mais altas forem menor será a probabilidade de surgir uma doença cardiovascular (Fekry e Eckel-Mahan, 2017).

Uma das principais formas de prevenir o aumento do colesterol é sem dúvida a alimentação. Adotar uma alimentação correta, equilibrada e saudável implica que haja uma consciencialização e uma adoção de uma dieta que obedeça a certos requisitos. Assim, a alimentação mais favorável à prevenção de níveis de colesterol elevados no sangue, implica

que haja um nível baixo na relação de gorduras saturadas/insaturadas e de colesterol na dieta (Schonfeld *et al.*, 1982).

Nos dias que decorrem, há um interesse crescente para diminuir as opções farmacológicas na redução do colesterol. Algumas estirpes de bactérias do ácido láctico (BAL) conseguem hidrolisar os sais biliares (Bosch *et al.*, 2014). Desta forma, estas estirpes são capazes de metabolizar os sais biliares excretados durante a digestão, evitando a sua reabsorção. Além disso, tem sido relatado que algumas bactérias têm a capacidade de captar e incorporar colesterol nas suas membranas (Bosch *et al.*, 2014). Alguns estudos apontam para que algumas estirpes de lactobacilos possam assimilar o colesterol durante o seu crescimento e esta assimilação pode reduzir a quantidade de colesterol disponível para absorção do intestino (Bosch *et al.*, 2014). No entanto são raros os estudos de utilização das BAL para reduzir a quantidade de colesterol nos alimentos.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de um conjunto de BAL isoladas do queijo do Pico artesanal, para assimilar e reduzir o colesterol. Após seleção da estirpe com maior capacidade para reduzir o colesterol, a mesma foi adicionada às natas para fermentação e avaliada na sua capacidade para reduzir o colesterol no produto final. As natas fermentadas foram usadas para se produzir uma manteiga com baixo teor em colesterol. A manteiga produzida foi testada numa prova organolética por um painel de provadores não treinados com o objetivo de comparar a manteiga produzida com uma manteiga comercial.

Esta dissertação divide-se em 6 capítulos, iniciando-se com esta introdução. No capítulo 2 é realizada uma revisão bibliográfica, onde é feita uma abordagem de todos os parâmetros que envolvem a temática estudada. Depois apresenta-se o material e métodos, onde é descrita toda a metodologia da parte prática realizada em laboratório, assim como todo o material necessário à sua realização. No capítulo dos resultados e discussão, serão apresentados todos os resultados obtidos ao longo de todo o processo, e os mesmos serão discutidos, de forma a esclarecer e a comparar os resultados deste trabalho com outros que possam já ter sido realizados no mesmo sentido. Por último será apresentada uma conclusão do trabalho e perspectivas futuras.