

AValiação DA ATIVIDADE BIOCONSERVANTE DE NANOVESÍCULAS CONTENDO PEDIOCINA EM QUEIJOS

SILVA, Gabrielle Peverada de Freitas¹; MELLO, Michele Brauner¹; BEHNCK, Priscila Costa da Silva²; JANTZEN, Márcia Monks²; MOTTA, Amanda de Souza¹.

¹Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, FVet, UFPel Pelotas/RS, Brasil,

²Química de Alimentos, FAT, UFPel, Pelotas/RS, Brasil.

gabriellepeverada@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A bioconservação é utilizada para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos por meio do emprego da microbiota protetora composta por bactérias lácticas. Estes microrganismos têm potencial na produção de uma diversidade de substâncias e também na produção de peptídeos antimicrobianos conhecidos como bacteriocinas. Sabe-se da sensibilidade destes compostos às enzimas proteolíticas presentes nos alimentos, o que compromete a manutenção da sua atividade antimicrobiana e a execução de seu efeito bioprotetor. A incorporação de bacteriocinas em nanovesículas lipossômicas vem sendo estudada como uma interessante alternativa para controlar a liberação e aumentar a estabilidade das bacteriocinas aplicadas em alimentos. O queijo é um produto bastante consumido, o que desperta o interesse para novas alternativas considerando a biopreservação de alimentos. Levando-se em conta o grande consumo do derivado lácteo, existe uma preocupação na qualidade higiênico-sanitária deste produto considerando os patógenos associados a este, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e bactérias do grupo coliforme. O queijo é considerado um alimento rico em proteínas, gordura e sais minerais e dependendo do tipo há variação dos seus componentes. O Queijo Minas Padrão foi escolhido para ser produzido, caracterizado e aplicado neste trabalho. Considerando que a nisina é a única bacteriocina aprovada para uso em alimentos, outras substâncias merecem estudo de modo a poder-se propor um novo bioconservante para alimentos. A pediocina, produzida por *Pediococcus acidilactici*, vem sendo extensivamente estudada e apresenta propriedades importantes devido ao seu efeito antimicrobiano sobre linhagens de *Listeria*. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de bioproteção da bacteriocina pediocina livre e encapsulada em lipossomas, em queijos de tipo Minas Padrão, inoculados artificialmente com *Listeria innocua*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos, meios de cultura e queijo

A pediocina utilizada nos experimentos foi obtida na forma liofilizada (Fabricante Kerry Marca ALTA 2341). O queijo empregado nos experimentos foi um queijo de média maturação, denominado Minas Padrão, produzido artesanalmente para o projeto. Uma cultura de *Listeria innocua*, foi empregada para os experimentos no queijo a qual foi mantida em agar TSB com extrato de levedura.

2.2 Avaliação do efeito da pediocina sobre o fermento mesofílico tipo O

Para avaliar se havia alguma interferência da pediocina 1% sobre as culturas *starters*, foi feito um experimento avaliando esta interação. O experimento procedeu-se da seguinte forma: o fermento foi incubado junto com as pediocinas,

em leite UHT desnatado. Foi feito o acompanhamento do pH (fita de pH e Acidez Dornic) e avaliada a recuperação das culturas *starters* em ágar MRS.

2.3 Preparo dos lipossomas e encapsulação da pediocina

A pediocina foi encapsulada em vesículas fosfolipídicas (nanovesículas) pelo Método da Hidratação do Filme Lipídico. Para a elaboração das nanovesículas foi utilizada a fosfatidilcolina. A avaliação da quantidade de atividade de pediocina foi feita pelo Método de Difusão em Agar com Discos (MOTTA e BRANDELLI, 2002). *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi usada como cultura indicadora.

2.4 Produção e padronização do Queijo Minas Padrão

Para elaboração do produto foi utilizado leite cru de vaca Jersey fornecido pela Embrapa (Pelotas-RS) e a tecnologia de fabricação do queijo seguiu a descrição de FURTADO (1994). Antes de proceder a enformagem dos queijos, foram adicionadas 10 mL de pediocina livre, 10 mL de pediocina encapsulada e 10 mL de tampão fosfato pH 7,0, relativo aos tratamentos a serem testados. O leite foi submetido à pasteurização lenta (63 a 65°C/ 30'). Testes das enzimas peroxidase e fosfatase foram realizados para controlar a pasteurização. Foi utilizado cultivo láctico iniciador mesófilo tipo O Choozit TM MA 11 LYO 25 DCU. Os queijos foram elaborados no laboratório de Processamento de Alimentos no Departamento de Ciência de Alimentos, onde permaneceram maturando em câmara à 12°C. No 5º e no 12º dia de maturação do queijo, foram coletadas amostras para as análises físico-químicas e microbiológicas de acordo com a legislação.

2.5 Efeito bioprotetor da pediocina livre e encapsulada em queijos, com aplicação de *Listeria innocua* artificialmente

A pediocina foi aplicada nos queijos, na forma livre e encapsulada. O experimento foi observado nos queijos na primeira e segunda semana de maturação, realizando análises microbiológicas e físico-químicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Avaliação da pediocina sobre o fermento mesófilico Tipo O

Para este teste foram preparados 3 grupos em duplicata: 2 tubos com leite UHT desnatado sem fermento e tampão (Grupo 1), 2 tubos com leite UHT desnatado com fermento e tampão (Grupo 2) e 2 tubos com leite UHT desnatado com fermento e pediocina 1% concentração final (Grupo 3).

Tabela 1: Avaliação dos Grupos 1, 2 e 3, em relação ao pH, Acidez Dornic e Contagem das Unidades Formadoras de Colônias por mililitros.

	pH	Acidez Dornic	UFC/mL
GRUPO 1	7,0	18ºD	0
GRUPO 2	4,0	92ºD	1,2x10 ¹⁰
GRUPO 3	4,0	93ºD	1,2x10 ⁹

Na avaliação do pH e da acidez Dornic foi possível observar a produção de ácido láctico, visto que no Grupo 2 e 3 o pH baixou e a acidez esteve elevada em consideração ao Grupo 1.

Avaliando o fermento láctico frente a pediocina, pode ser observado que não houve inibição da cultura láctica, uma vez que, comparando o Grupo 2 com o Grupo 3 foi mostrado que houve pouca diferença entre os resultados de acidez e nenhuma diferença no pH.

Para pesquisar a presença de bactéria láctica foi feita contagens em ágar MRS dos grupos. No Grupo 1 não houve contagem de Unidade Formadora de Colônias, pelo fato do leite ser do tipo UHT e sem adição de cultura *starter*, no Grupo 2 a contagem de bactérias lácticas foi de $1,2 \times 10^{10}$ UFC/mL e no Grupo 3 foi de $1,2 \times 10^9$. Apesar da diferença de um log, não houve inibição do fermento láctico, não sendo afetada a produção do queijo minas padrão. Nascimento, Moreno e Kuaye (2009), ao estudarem duas diferentes marcas comerciais de fermento mesofílico tipo O quanto à compatibilidade às bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198. *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, verificaram que houve zona de inibição de 6mm em ambas as marcas de fermento láctico, indicando inibição do desenvolvimento do fermento pelas bacteriocinas produzidas pelas linhagens estudadas *in vitro*.

3.2 Características do leite utilizado na elaboração do queijo

O leite utilizado no processamento do queijo demonstrou acidez de 18^oD, gordura de 5,5%, peroxidase positiva, fosfatase negativa. Os resultados das análises microbiológicas do leite preconizadas pela legislação estão de acordo para leite pasteurizado. Foi analisada a acidez do soro do queijo, que é importante para a elaboração do derivado, onde o mesmo deve apresentar acidez igual a 2/3 da acidez do leite, ou seja, 13^oD, o valor encontrado estava dentro do esperado.

3.3 Análises físico-químicas e microbiológicas do Queijo Minas Padrão com adição de pediocina

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003). E as análises físico-químicas de acordo com Instrução Normativa nº 68 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006).

Nas análises físico-químicas dos queijos pode-se observar que a umidade do queijo Minas Padrão encontrada foi acima do esperado que é entre 46 a 49% após o término da maturação de 30 dias, visto que a análise desse queijo foi feita no 5^o dia após a fabricação. Na análise de acidez titulável e na determinação de pH não houve variação significativa entre o queijo controle e os queijos com pediocina. O teor de lipídios esperado para esse tipo de queijo é de 23 a 25%, sendo que o leite usado no experimento é um leite de vacas da raça Jersey, onde o teor de gordura é 5,5%, em razão disso apresentou-se em maior valor a gordura do queijo do experimento de 27,2% a 28,7%. Na análise de cloretos, o queijo controle com relação ao valor esperado para esse tipo de queijo houve uma pequena diferença, que se deve ao fato de que os queijos do experimento eram de tamanho menor do que os queijos que são comercializados do tipo Minas, onde os mesmos eram mergulhados em salmoura a 20%. Uma observação importante é o fato de o queijo ter sido produzido em condições artesanais e não se ter condições de padronizar o teor de gordura para 3,5%, exigido para a produção do produto.

Nas análises microbiológicas dos queijos pode-se observar que a técnica de Número Mais Provável de Coliformes Totais e Termotolerantes houve uma diminuição na contagem de NMP/g em comparação do queijo controle dos queijos com pediocina. Na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, nos queijos

com a bacteriocina não foram encontradas colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva. Na Pesquisa de *Salmonella* e de *Listeria monocytogenes*, estes não foram encontrados em 25 gramas de amostra. Os resultados dos queijos com pediocina livre e encapsuladas estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que: na avaliação da pediocina sobre o fermento mesofílico, a pediocina não inibiu o fermento láctico *in vitro* e nas análises microbiológicas, a pediocina inibe os microrganismos patogênicos no queijo. Resultados com a adição de *L. innocua* ainda estão sendo processados.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à empresa DANISCO, à Embrapa pelo fornecimento do leite, ao Curso de Química de Alimentos onde foi realizado o processamento do queijo e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/UFPel

6 REFERÊNCIAS

- BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Diário Oficial da União, 18 set 2003.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários.** Diário Oficial da União, 14 dez 2006.
- BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal.** Diário Oficial da União, 11 mar 1996.
- FURTADO, M.M., NETO, J.P.M.L.: **Tecnologia de queijos. Manual técnico para a produção industrial de queijos.** São Paulo: Dipemar, 118p., 1994.
- MOTTA, A.S., BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, Inglaterra, v. 92, p.63-71, 2002.
- NASCIMENTO, M.S; MORENO, I; KUAYE, A.Y. Determinação da compatibilidade de desenvolvimento de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2009.
- ROCHA, A. M. P. **Controle de fungos durante a maturação de queijo Minas Padrão.** 2004. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, 06 de jul de 2004.