

ROBERTA DE ALBUQUERQUE BENTO

BIOATIVIDADE DE QUITOSANA PRODUZIDA POR
Mucor rouxii* NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes
EM PRODUTO CÁRNEO

Recife
2008

ROBERTA DE ALBUQUERQUE BENTO

**BIOATIVIDADE DE QUITOSANA PRODUZIDA POR
Mucor rouxii NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes*
EM PRODUTO CÁRNEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Nutrição

Orientador: Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Recife
2008

Bento, Roberta de Albuquerque

Bioatividade de quitosana produzida por *Mucor rouxii* no controle de *Listeria monocytogenes* em produto cárneo / Roberta de Albuquerque Bento . – Recife : O Autor, 2008.

109 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2008.

Inclui bibliografia e anexos

**1. Quitosana 2. Produto cárneo 3. Antilisterial.
I. Título.**

661 CDU (2.ed.) UFPE

641.61 CDD (22.ed.) CCS2008-022

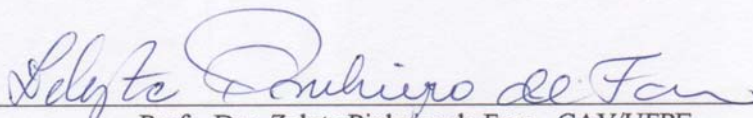
ROBERTA DE ALBUQUERQUE BENTO

**“BIOATIVIDADE DE QUITOSANA PRODUZIDA POR
Mucor rouxii NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes*
EM PRODUTO CÁRNEO”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco como
requisito para obtenção do título de Doutor em
Nutrição

Aprovada em 22 de Agosto de 2008

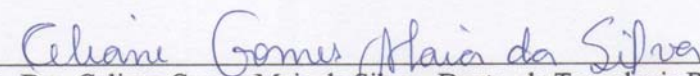
BANCA EXAMINADORA



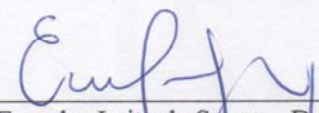
Profa. Dra. Zelyta Pinheiro de Faro - CAV/UFPE



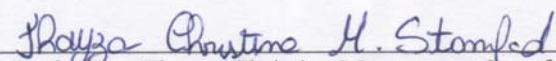
Profa. Dra. Janete Magali de Araújo – Depto. de Antibióticos/UFPE



Profa. Dra. Celiane Gomes Maia da Silva – Depto. de Tecnologia Rural/UFRPE



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – Depto. de Nutrição/UFPB



Profª. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford – Depto. de Microbiologia/UFPB

A Deus, meu Senhor e Salvador.

A Diogo e Maria Paula, meu marido e minha filha.

À Paulo e Ilma, meus pais.

Aos professores, Tânia e Evandro, meus orientadores.

À Cybelle e Vanessa, minhas amigas.

AGRADECIMENTOS

*A Deus, Digno de toda Honra e toda Glória, ele abençoou meus caminhos e derrubou todas as muralhas. “Deus de Aliança, Deus de Promessa, Deus que não é homem para mentir, tudo pode passar, tudo pode mudar, mas tua palavra vai se cumprir...”*¹

*À minha mãe, **Ilma Bento**, pela ajuda e apoio, pelos dias dedicados a minha filha, e pelas orações sem cessar, para que meu sonho fosse realizado.*

*Ao meu pai, **Paulo Bento**, que me ensinou a lutar em busca dos meus objetivos.*

*Ao meu marido, **Diogo da Fonte**, pelo apoio e incentivo, pelos muitos finais de semana que se dedicou a estar comigo no laboratório, além de ter compartilhado momentos de angústia e sofrimento. Essa conquista também é dele.*

*À minha filha, **Maria Paula**. “Você é assim, um sonho para mim, quero te encher de beijos. Eu penso em você, desde o amanhecer, até quando eu me deito. Eu gosto de você, e gosto de ficar com você. Meu riso é tão feliz contigo, o meu melhor amigo é teu amor... E a gente canta, e a gente dançar, e a gente não se cansa”*². *É difícil expressar meu sofrimento em ter estado em muitos momentos, tão perto, e ao mesmo tempo tão distante.*

*À minha orientadora, **Tânia Lúcia Montenegro Stamford**, por ter compartilhado comigo não somente de sua sabedoria científica, mais realmente fazendo seu papel de educadora, me ensinado o significado de comportamento, dignidade e compaixão. É uma pessoa que terei como exemplo a seguir. Se essa obra existe, é porque ela acreditou no meu potencial.*

*À **Thayza Christina Montenegro Stamford**, minha co-orientadora informal. Sua vontade em me ajudar, abraçando minha causa, foi algo tão bonito, que me fez a admirar não somente como profissional, mas também como pessoa. Ela é a prova que as árvores boas, geram bons frutos.*

*Ao meu co-orientador, **Evandro Leite de Souza**. Pela orientação dada, pelos ensinamentos, e colaboração fundamental na escrita desta tese. Evandro é digno de admiração, pois sua inteligência e competência como professor e pesquisador parece ser nato. Imensurável é a gratidão que tenho a ele e a Professora Thaíza.*

*À **Cybelle Rolim e Vanessa Leal**, minhas companheiras eternas, amigas para toda hora, irmãs que Deus me presenteou. Nem sei como agradecer todo apoio que me deram durante todos esses anos de amizade.*

¹ Da música: “Deus de Promessa”, Grupo: Toque no Altar

² Música de tribalista

À **Celiane Gomes**, minha mais nova amiga, e sei que posso dizer com total convicção. Deus foi muito bom comigo, quando colocou de forma tão inesperada, ela na minha vida.

Ao Grupo de pesquisa, Carlos Eduardo, Adriana Menezes, Elizabeth Fai, e Danielle. A **Ana Mélia Assis**, que me ajudou muito me passando sua experiência no assunto. Em especial, a minha maior companheira de laboratório, **Marilene Lima**, por ter me ajudado não somente no meu experimento, mas também por ter feito dos meus dias longo, um pouco mais feliz com seu jeitinho todo especial.

As professoras Nonete Barbosa Guerra, Silvana Salgado, Edleide Pires, Erilane Castro, Angélica Vascoselos, Samara Alvanchian, Alda Livera, Marizilda Ribeiro, pelas experiências repassadas. Em especial, agradeço imensamente a **Zelyta Pinheiro de Faro**, que não somente como professora, mas também como conselheira, sempre me ajudou e apoiou, me guiando para bons caminhos. Sou muito grata a ela por ter me apresentado com tanta sabedoria, a “Ciência dos Alimentos”.

A todos do Laboratório, **Moíses, Alexandre, Graciliane, Arthur, Camilo, Silvinha e Lourdes**. Em especial a **Laercio e Vivaldo**, anjos que Deus colocou no meu caminho, que com paciência e calma, me passaram toda base de como trabalhar no laboratório. Se não fosse o lado prestativo de Vivaldo e o lado humano e gentil de Laércio em me ajudar nos primeiros passos, talvez eu nem teria começado a lutar para que este sonho se concluísse tão rápido.

Aos Professores/Doutores da banca, por ter aceitado o convite, compartilhando comigo este sonho, além da atenção dispensada a leitura deste trabalho.

A **Neci**, que mesmo do jeitinho dela, sempre me ajudou nos momentos em que precisei.

À **Viviane Salazar, Maria Gentila Guedes, Vanessa Lins, Luiz Doria e Carlos Wavrik**. Agradeço a vocês por ter sempre reconhecido o meu trabalho profissional e por ter me apoiado para que eu conseguisse finalizar essa obra.

À **Mariane, Kelvina, Ana Paula, Luciana, Denise Faro, Leila, Vaninha, Elaine, Helena** e muitas outras amigas, que me ajudaram ou pelo menos entenderam a minha ausência como amiga.

A Willa, Micha e Bruno pelo apoio e nova amizade construída.

A todos os meus familiares e amigos que, por algum momento, entenderam que todo esforço teve como resultado a realização de um sonho.

A todos, o meu: MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A busca de compostos alternativos para um emprego racional de conservantes naturais em produtos cárneos tem a finalidade de atender as perspectivas do consumidor e prolongar a vida de prateleira com segurança tanto no aspecto biológico como químico. O uso da quitosana, um polímero natural obtido da biomassa de fungos, tem se destacado devido as suas propriedades: biodegradável, extremamente abundante e atóxico, e poder antibacteriano, podendo ser utilizado em sistemas naturais de conservação de produtos cárneos. Dentre os diversos microrganismos que se destacam como contaminante de produtos cárneos, *Listeria monocytogenes* figura como uma ameaça à saúde do consumidor, sendo tal agravante relacionado à sua elevada resistência fisiológica e capacidade de sobrevivência e multiplicação em alimentos armazenados sob refrigeração. Este estudo objetivou verificar a bioatividade de quitosana de *Mucor rouxii* (UCP064) na inibição de *Listeria monocytogenes* em produto cárneo. Para produção da quitosana foi utilizado como substrato para crescimento do *Mucor rouxii* UCP 064 o meio Jacatupé (*Pachyrhizus erosus*), incubado a 28°C a 150 rpm por 96 horas. Para avaliar o crescimento do *M. rouxii*, foram verificados o pH, consumo de glicose e a proteína em diferentes tempos. A biomassa produzida foi liofilizada, sendo a quitosana extraída por tratamento álcali-ácido. A caracterização da quitosana foi determinada por espectroscopia de raio infravermelho para obtenção do grau de desacetilação (DD) e viscosidade para o peso molecular. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada através do teste de macrodiluição. O rendimento máximo da biomassa de *Mucor rouxii* ocorreu com 48 horas, com valor de 16,9 g.L⁻¹, com produção de 62 mg.g.L⁻¹ de quitosana, tendo durante o crescimento, o pH variado de 5 a 4. A quitosana obtida apresentou grau de deacetilação de 85% DD e peso molecular de 2,60 x 10⁴ g.mol⁻¹. A CIM e a CBM foram determinadas como sendo as concentrações de 2,5 mg.ml⁻¹ e 5,0 mg.ml⁻¹, respectivamente. Para aplicação em produto cárneo, a CBM foi adicionada em patê de carne, onde foi comprovada a eficácia antibacterina da quitosana contra a *Listeria monocytogenes*. Conclui-se, que a quitosana de *Mucor rouxii* pode ser utilizado como potencial fonte antilisterial para uso na conservação de produtos cárneos, reduzindo assim os aditivos artificiais que são considerados prejudiciais à saúde.

Palavra Chave: quitosana, produtos cárneo, antilisterial

ABSTRACT

In last years consumers has demanded for safe foods, especially regarding their microbiological contamination, being still worrying with the damages posed by microbial foodborne diseases, as well as the side effects related to the use abusive use of synthetic additives added to foods, particularly to meat products. In this perspective, the study of new natural and non toxic food additives looking for the replacement of synthetic preservatives has received special attention for researchers all over the world. Chitosan, a natural polymer, biodegradable, highly abundant and non toxic, has been highlighted as potential antimicrobial for use in natural food conservation systems for researches all over the world. Among many meat products-contaminating microorganisms, the high physiological resistance of *Listeria monocytogenes* and capability of surviving and multiplying in foods stored under refrigeration makes it a threat for the health of consumers and a worrying for the industry of meat products, mainly in ready-to-eat ones. The objective of this study was to evaluate the growth profile and chitosan production by *Mucor rouxii* UCP 064 grown in yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) medium, as well to assess the anti-*L. monocytogenes* efficacy of the obtained chitosan in order to a possible application in foods. The production of chitosan was carried out by submerge of *M. rouxii* in yam bean media at 28 °C, in an orbital shaker at 150 rpm, for 96 hours. During the cultivation aliquots werw collected every 24 hours for biomass, chitosan production, pH, glucose and total nitrogen determination. The polysaccharide was extracted by alkali-acid treatment and chitosan characterized by infrared spectroscopy and viscosity. Higher value of biomass of *M. rouxii* (16.9g.L⁻¹) and best yield the chitosan (62 mg.g⁻¹) was found after 48 hours of cultivation. Residual glucose and nitrogen in the growth media were 4.1 and 0.02 g.L⁻¹, respectively, after 96 h. Obtained chitosan presented 85% of degree of deacetylation and 2.60 × 10⁴ g.mol⁻¹ of molecular weight. MIC and MBC values of chitosan against *L. monocytogenes* ATCC 7664 were, respectively, 2.5 and 5.0 µg.mL⁻¹. The addition of 5 mg.g⁻¹ of chitosan from *M. rouxii* significantly reduced counts *L. monocytogenes*. These results show the biotechnological potential of yam bean medium for chitosan from fungi as natural antimicrobial to control *L. monocytogenes* in foods.

Key-words: chitosan, meat products, antilisterial.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS.....	14
HIPÓTESES.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
Revisão da literatura - Artigo de Revisão	17
Perspectiva e Potencial aplicação de quitosana como agente inibidor de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos.....	18
Resumo.....	19
Abstract	20
Introdução	20
Segurança Alimentar: Novas tendências de mercado	21
Produtos cárneos	23
Listeriose	25
Quitosana na conservação de alimentos.....	28
Considerações Finais.....	36
Referências	37
3 MÉTODOS	45
3.1 Microrganismos.....	46
3.2 Padronização dos inóculos microbianos.....	46
3.3 Meio de cultivo para produção de quitosana.....	47
3.4 Produção de quitosana.....	47
3.5 Parâmetros bioquímicos do crescimento de <i>M. rouxii</i>	48
3.6 Extração de quitosana.....	48
3.7 Caracterização da quitosana de <i>M. rouxii</i> :	49
3.7.1 Determinação do grau de deacetilação (DD%)	49
3.7.2 Determinação do Peso Molecular	49
3.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	50
3.9 Efeito da quitosana sobre a viabilidade bacteriana	51
3.10 Produção de patê de Carne Bovina.....	52
3.11 Tratamento de patê com quitosana	55
3.12 Influência dos ingredientes do patê sobre o efeito antibacteriano da quitosana.....	56
3.13 Análise estatística.....	57
4 RESULTADOS.....	58
Resultados - Artigos originais.....	59
4.1 Potential of chitosan from <i>Mucor rouxii</i> UCP 064 as alternative natural compound to inhibit <i>Listeria monocytogenes</i> in foods.....	60
4.2 Inhibition of <i>Listeria monocytogenes</i> in pâté by chitosan from <i>Mucor rouxii</i> UCP064	76
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
6 REFERÊNCIAS	98
7 ANEXOS.....	102
Anexo A- Documentação de encaminhamento dos artigos ao periódico.....	103
Anexo B- Resumo expandido enviado para o Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA).....	105
Anexo C- Matéria publicada em Jornal.....	108

INTRODUÇÃO

1 Introdução

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) estão provavelmente entre os maiores problema de saúde pública no mundo contemporâneo, fato que preocupa cada vez mais os órgãos governamentais. Com o aumento dos surtos de toxinfecção alimentar, tanto as indústrias de alimentos como os consumidores vêm valorizando os cuidados na produção e comercialização de alimentos. No entanto, no momento da compra, nem todos os atributos podem ser avaliados pelos consumidores, fazendo com que a indústria muitas vezes utilize da situação para adicionar uma quantidade de aditivos artificiais acima do permitido por lei, podendo com isso ocasionar problemas a saúde (MELO, 2004).

Neste panorama, impulsionam-se a realização de pesquisas em todo o mundo, enfatizando a busca de compostos alternativos para um emprego racional de conservantes naturais na produção de alimentos, com a finalidade de atender as perspectivas de uma nova demanda dos consumidores (FELLOWS, 2006; LI et al., 2007; SOUZA, 2006).

O mercado de produtos cárneos tem experimentado um crescimento contínuo nos últimos anos, sendo dentre seus derivados bastante consumidos, o patê. Entretanto, tais produtos, devido à constituição rica em nutrientes provenientes da carne, estão sujeitos a vários fatores que influenciam a sua estabilidade, como crescimento microbiano e reações químicas (SILVA, 2003).

Produtos prontos para consumo, como o patê, devido estocagem à temperatura de refrigeração e vida de prateleira longa, são considerados de grande risco, devido à probabilidade de estarem contaminados por *L. monocytogenes*. A incidência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos cozidos vem aumentando gradativamente, somada ainda

ao fato que estudos apontam que este microrganismo resiste ao processo de pasteurização (KASNOWSKI, 2004).

A causa da grande incidência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos, dentre inúmeros patógenos, é decorrente das suas características psicrotrófica, resistência a agentes antimicrobianos como substâncias ácidas e álcalis, capacidade de sobrevivência em temperatura de refrigeração, além da capacidade na formação de biofilmes, principalmente em equipamentos (fatiadores; moedores) e no ambiente de processamento, conferindo assim proteção contra a ação de sanitizantes (BERESFORD et al., 2001).

Sendo assim, estratégias preventivas são obrigatórias para redução dos focos ou eliminação de *L. monocytogenes*, principalmente em alimentos prontos para consumo que não receberam tratamento definitivo, como no caso dos patês submetidos à cocção e pasteurização, que posteriormente são conservados sob temperatura de refrigeração. Diante desse contexto, surge a quitosana, polímero abundante, natural, e largamente distribuído na estrutura de animais invertebrados e na parede celular de fungos, tendo como exemplo a quitosana proveniente da massa micelial de *Mucor rouxii*, pertencente à Ordem Mucorales (SYNOWIECKI; AL-KHATTEB, 1997).

O amplo espectro de aplicações em alimentos deste polímero, como suplementos nutricionais, emulsificantes, fibras em biscoitos dietéticos e clarificantes de bebidas já é comprovada (BORDERÍAS, 2005; COSTA, 2006; BORGOGNI, 2006), no entanto, há necessidade de um número de evidências científicas face aos resultados contraditórios com relação ao microrganismo testado, bem como pelos poucos resultados obtidos até o momento relacionado ao uso como agente conservante em produtos cárneos.

Para auferir os benefícios supracitados da quitosana, depreende-se do exposto a importância de averiguar a aplicação de quitosana na inibição da *L. monocytogenes*,

contribuindo deste modo não somente para o consumidor, em adquirir alimentos saudáveis e seguros, mas também à indústria de alimentos, por assegurar um produto isento deste contaminante e com maior vida de prateleira.

Descreve-se a seguir a fundamentação teórica e metodologia sobre o assunto em pauta, e os resultados obtidos, que originaram dois trabalhos inéditos.

Objetivos

Geral:

Verificar a bioatividade de quitosana de *Mucor rouxii* (UCP064) na inibição de *Listeria monocytogenes* em produto cárneo.

Específicos:

- Produzir e extrair a quitosana de *Mucor rouxii* (UCP064) cultivada em meio jacatupé;
- Determinar a Concentração Inibitória (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana fúngica proveniente do *Mucor rouxii* (UCP064) sobre *L. monocytogenes*;
- Analisar e quantificar o efeito da quitosana fúngica sobre a viabilidade de *L. monocytogenes*;
- Avaliar a interferência da quitosana fúngica sobre a sobrevivência de *L. monocytogenes* em matriz alimentar (patê de carne);
- Avaliar o efeito da aplicação da quitosana fúngica sobre a viabilidade celular de *L. monocytogenes* em um modelo de alimento cárneo pronto para o consumo (patê de carne);
- Avaliar a influência dos ingredientes do patê na eficácia da quitosana sobre a viabilidade de *L. monocytogenes*.

Hipóteses

O *Mucor rouxii* UCP064 é uma alternativa viável para obtenção de quitosana fúngica.

A quitosana de *Mucor rouxii* UCP064 é efetiva na inibição e eliminação de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana de *Mucor rouxii* UCP064, são semelhantes à produzida por fungos da mesma Ordem Mucorales.

A quitosana de *Mucor rouxii* possui bioatividade na inibição e eliminação de *Listeria monocytogenes* em produto cárneo.

A intensidade da atividade da quitosana de *Mucor rouxii* sofre interferência dos componentes da matriz alimentar.

_____REVISÃO DA LITERATURA

Revisão da literatura – ARTIGO DE REVISÃO

A revisão da literatura, na forma de artigo de revisão, foi submetida à Revista “Polímeros: Ciência e Tecnologia”, sendo intitulada **“PERSPECTIVAS E POTENCIAL APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO AGENTE INIBIDOR DE *Listeria monocytogenes* EM PRODUTOS CÁRNEOS”**. A revista é classificada como qualis nacional A pela CAPES. (ANEXO A)

**PERSPECTIVAS E POTENCIAL APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO AGENTE
INIBIDOR DE *Listeria monocytogenes* EM PRODUTOS CÁRNEOS**

**Roberta de Albuquerque Bento ^{1*}, Evandro Leite de Souza ², Tânia Lúcia
Montenegro Stamford ¹, Thayza Christina Montenegro Stamford ³**

¹ Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de
Pernambuco.

² Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da
Paraíba, João Pessoa, Brasil

³ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal
da Paraíba, João Pessoa, Brasil

*** Autor para correspondência:** Roberta de Albuquerque Bento. Av. Bernardo Vieira de
Melo, n ° 4236, Candeias, Cx. Postal 6121, CEP: 54400-010, Jaboatão dos Guararapes,
Pernambuco, Brasil. robertabentonutricionista@hotmail.com

RESUMO

Nos últimos anos, o consumidor tem aumentado a exigência por alimentos seguros, especialmente no âmbito da contaminação microbiológica, preocupados com os danos relacionados a doenças transmitidas por alimentos de origem microbiana, bem como os efeitos colaterais relacionados ao uso de aditivos artificiais em alimentos, particularmente aos produtos cárneos. Neste contexto, o estudo de novos aditivos naturais e não tóxicos tem recebido ênfase em diversos estudos com vistas à substituição dos aditivos artificiais em pesquisas em todo o mundo. Quitosana, um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, tem se destacado como potencial antimicrobiano para uso em sistemas naturais de conservação de alimentos. Dentre os diversos microrganismos que se destacam como contaminantes de produtos cárneos, *Listeria monocytogenes* figura como uma ameaça à saúde do consumidor e como preocupação para a indústria de produtos cárneos prontos para o consumo, sendo tal fato relacionado à sua elevada resistência fisiológica e capacidade de sobrevivência e multiplicação em alimentos armazenados sob refrigeração. Esta revisão objetiva mostrar o potencial de aplicação de quitosana como antimicrobiano natural em produtos cárneos, com base na abordagem de diversos estudos que mostram a atividade inibitória deste composto, em meios sintéticos e em matrizes alimentares, sobre vários microrganismos de interesse em alimentos, com especial enfoque a *L. monocytogenes*. Relata-se ainda alguns achados científicos relacionados a algumas propriedades biológicas adicionais de quitosana de interesse na conservação de alimentos.

Palavras-chave: quitosana; efeito antibacteriano; produtos cárneos; conservação de alimentos.

ABSTRACT

In last years consumers has demanded for safe foods, especially regarding their microbiological contamination, being still worrying with the damages posed by microbial foodborne diseases, as well as the side effects related to the use abusive use of synthetic additives added to foods, particularly to meat products. In this perspective, the study of new natural and non toxic food additives looking for the replacement of synthetic preservatives has received special attention for researchers all over the world. Chitosan, a natural polymer, biodegradable, highly abundant and non toxic, has been highlighted as potential antimicrobial for use in natural food conservation systems for researches all over the world. Among many meat products-contaminating microorganisms, the high physiological resistance of *Listeria monocytogenes* and capability of surviving and multiplying in foods stored under refrigeration makes it a threat for the health of consumers and a worrying for the industry of meat products, mainly in ready-to-eat ones. This review show the potential of application of chitosan as a natural antimicrobial in meat products taking base on the reports of many studies that noted an antimicrobial activity of this compound, in synthetic media and food matrices, on several food-related microorganisms with a special attention to *L. monocytogenes*. It is also reported some scientific findings related to additional biological properties of chitosan of interest in food conservation.

Key-words: chitosan; antibacterial effect; meat products; food conservation.

INTRODUÇÃO

Atualmente é crescente o número de consumidores que tem exigido da indústria de alimentos a adoção de uma política decrescente de uso de aditivos químicos para obtenção dos seus objetivos voltados para a segurança alimentar, bem como para o retardo das ações

microbianas de caráter deteriorante, as quais conduzem o alimento a um estado impróprio para o consumo. Sendo assim, a indústria alimentícia procura atender regras gerais que se baseiam em prolongar o período de armazenamento dos alimentos, fazendo com que estes permaneçam adequados para o consumo e gerem lucros para os fabricantes [1].

Neste panorama, impulsiona-se a realização de pesquisas em todo o mundo enfatizando a busca de compostos alternativos para um emprego racional como conservantes naturais em alimentos, com a finalidade de atender as perspectivas de um emergente perfil de consumo [2]. A potencialidade antimicrobiana de produtos naturais como a quitosana têm sido investigada como alternativa a substituição de compostos antimicrobianos artificiais, que devido ao abuso de uso por longos anos, deu origem ao fenômeno de resistência microbiana [3].

Frente à reconhecida importância em se viabilizar a produção de sistemas de conservação de alimentos com menor quantidade de aditivos artificiais, este ensaio teórico tem como objetivo realizar uma análise dos trabalhos até o momento publicados sobre a potencialidade antimicrobiana da quitosana, particularmente a quitosana de origem fúngica, bem como sugerir estudos com aplicações em produtos cárneos em substituição aos aditivos químicos.

SEGURANÇA ALIMENTAR: NOVAS TENDÊNCIAS DE MERCADO

A garantia do direito de todos ao acesso ao alimento de boa qualidade, tem sido amplamente discutida pelos setores públicos e privados, especialmente no aspecto nutricional e em relação à inocuidade dos alimentos. Quando o maior enfoque na aquisição de alimentos pelo consumidor está relacionado à ausência de contaminantes, sejam de natureza química, física ou biológica, utiliza-se o termo alimento seguro, do inglês “food safety”. Enquanto, os

perigos físicos são os mais comumente identificados (pêlos, fragmentos de metal, osso, etc) pelos consumidores, os perigos químicos e microbiológicos, por sua vez, impõem o maior risco, do ponto de vista da saúde pública [4].

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) constituirão provavelmente o maior problema de saúde no mundo contemporâneo [5]. As DTA desempenham importante papel socioeconômico, pois ocasionam custos à saúde pública e barreiras na exportação de produtos ao mercado internacional, além de perda da credibilidade da unidade produtora [6].

Redmond e Griffith [7], relataram que 1 a cada 3 europeus são afetados anualmente por doenças microbianas transmitidas por alimentos, o que representa em média 130 milhões de pessoas. O *Center for Disease Control and Prevention* e o *Food and Drug Administration* (FDA), em 2001, forneceram dados relatando cerca de 9000 mortes por ano nos Estados Unidos em decorrência do consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos [8]. No Brasil, foram registrados entre os anos de 1999 e 2000, cerca de 1.939 surtos de doenças microbianas de origem alimentar, com 32.516 pessoas atingidas e 14 óbitos, apesar de toda a fragilidade do sistema de vigilância epidemiológica, que apura e registra oficialmente apenas 1 em cada 50 casos de DTA [9].

Com os fatos relacionados à falta de segurança dos alimentos ocorridos nas últimas décadas, o atributo "segurança do alimento" tornou-se ainda mais valorizado, especialmente para carnes. No entanto, nem todos os atributos podem ser avaliados pelos consumidores no momento da compra. O nível de contaminação por microrganismos e/ou resíduos químicos, por exemplo, só poderão ser determinados por meio de testes laboratoriais mais sofisticados [10].

Nesse contexto, o consumidor procura se informar sobre os produtos consumidos, e em contrapartida as indústrias alimentícias cada vez mais se preocupa em informar a respeito das condições que um determinado alimento foi produzido. Em decorrência disso, a identificação dos fatores determinantes da qualidade sanitária de qualquer produto requer a aplicação e investigação de métodos que favoreçam o reconhecimento das medidas de controle que eliminem os fatores de risco em questão relacionados principalmente aos processos tecnológicos. A presença e detecção de cepas de microrganismos patogênicos resistentes a antimicrobianos artificiais têm despertado grande preocupação no setor de saúde pública e no campo da Ciência e Tecnologia de Alimentos [11].

Sendo assim, como alternativa para a aplicação de métodos de conservação cada vez mais seguros, com baixos níveis de aditivos, bem como possuindo aceitável qualidade sensorial, surge o uso dos conservantes naturais, que podem ter nos produtos cárneos um emprego de grande interesse tanto para a indústria, como também para os consumidores.

PRODUTOS CÁRNEOS

Os produtos cárneos processados ou preparados são aqueles cujas características originais da carne fresca foram alteradas através de tratamentos físicos e/ou químicos. O processamento da carne fresca visa à elaboração de novos produtos e, por inibir a ação de enzimas microbianas de caráter degradativo, prolonga a vida de prateleira, além de apresentar inúmeras vantagens, como não alterar de forma significativa as características nutricionais, e influenciar de forma positiva as características organolépticas do produto conferindo cor e sabor próprios de cada processo [12].

O mercado de produtos cárneos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade. O Brasil é um dos mais importantes produtores de carne bovina do mundo,

(6,3 milhões de toneladas/ano), e tem consumo "per capita" situado em 36,6 kg/ano [13]. Além da utilização da própria carne no preparo de alimentos, o consumo de vários subprodutos da carne tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores em todo o mundo. Entretanto, o consumo de tais produtos tem sido altamente discutido em virtude do uso abusivo de aditivos alimentares que podem apresentar potencial prejuízo a saúde dos consumidores [14].

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamenta o uso de aditivos de acordo com as diretrizes preconizadas pela Portaria nº 540 [15], na qual considera aditivo alimentar qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, entretanto com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenamento, transporte ou manipulação de um alimento.

Sais de cura, como nitrato e nitrito de sódio e de potássio, são largamente utilizados como aditivos na conservação de produtos cárneos. Os sais de nitrito, além de inibirem a deterioração microbiana, são fixadores de cor e agentes de cura [16]. A polêmica em torno do uso destes conservantes em alimentos ocorre em virtude da possibilidade de originarem compostos tóxicos de ação carcinogênica, além de produzir vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa em geral, enrubescimento da face e extremidades, desconforto gastrointestinal, dor de cabeça, cianose, náusea, vômitos, dores abdominais e colapso; devido a possível interação de tais substâncias com componentes dos alimentos, no processamento ou no metabolismo, que promovem, por sinergismo, a formação de componentes de maior toxicidade, ou, por antagonismo, substâncias que podem reduzir sua toxicidade [14]. Dessa forma, é imprescindível estabelecer medidas preventivas substanciais para efetivar o controle

de qualidade e a vigilância sanitária objetivando minimizar os efeitos tóxicos causados pela adição de aditivos.

Ao analisar a dose necessária de um aditivo como nitrito a ser adicionada a um alimento, verifica-se que sua concentração dependerá da finalidade, sendo que seu emprego em produtos cárneos varia entre 30 e 50 ppm para o desenvolvimento de cor, entre 20 e 40 ppm para desenvolvimento de aroma, entre 80 e 150 ppm para o efeito conservante, e entre níveis de 20 e 50 ppm para o efeito antioxidante [17]. É válido salientar, que o alto nível desse aditivo tem como foco principal a conservação do alimento, uma vez que para a reestruturação da cor e aroma, são necessários no máximo 50 ppm.

Pesquisa realizada [14] aponta que produtos derivados de carne fabricados no Brasil apresentam, na maioria das vezes, níveis de nitrito e nitrato acima do permitido pela legislação, de modo que tal achado tem sido atribuído a uma possível tentativa de prevenção da proliferação de microrganismo nestes produtos, visto que as altas temperaturas nos países de clima tropical somado a alta umidade, favorecem o crescimento microbiano. Além disso, etapas do processamento tecnológico como pesagem, trituração, mistura e armazenamento, envolvem operações que podem levar a contaminação microbiana, dentre as quais, destaca-se a contaminação em produtos cárneos por *Listeria* sp.

LISTERIOSE

O primeiro surto listeriose causado por ingestão de produtos cárneos contaminados, envolveu um tipo de patê importado pelo Reino Unido tendo como consequência 366 doentes e 63 mortes [18], enquanto o primeiro relato de listeriose nos Estados Unidos foi de um caso esporádico relacionado ao consumo de embutido de carne de peru, por uma paciente com câncer [19].

L. monocytogenes pode ser isolada do solo, água, silagem, plantas e outras fontes. Essa bactéria, mesmo não sendo esporulada, apresenta destacável resistência e suporta os efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e calor, além de poder se desenvolver em ambientes com baixas tensões de oxigênio, devido à sua característica microaerófila [20]. Sua ampla distribuição ambiental é favorecida não somente pela capacidade de se desenvolver entre 0 e 44 °C, embora sua faixa ótima seja entre 30 e 37 °C, mas também por tolerar valores extremos de pH (5 – 9), além de baixa atividade de água e concentrações de NaCl de superiores a 10 % [21].

Uma variedade de problemas clínicos em decorrência da ação de *Listeria monocytogenes* tem sido relatada, porém a maior parte das complicações clínicas em humanos tem sido septicemia, meningite neonatal, septicemia e meningite em imunodeprimidos, além de septicemia e doença gripal inespecífica em mulheres sadias durante a gestação, as quais podem infectar o feto [22]. Durante os surtos, a mortalidade pode atingir 40 % dos acometidos pela infecção, de modo que nos casos de meningite, essa taxa pode atingir 70 % e nas septicemias 50 % [23].

A adoção de padrões microbiológicos com exigência de ausência de *L. monocytogenes* em alimentos por parte de diversos países visa assegurar um produto isento de risco para o consumidor, pois embora uma única célula deste microrganismo, provavelmente, não seja suficiente para causar listeriose, sua capacidade de multiplicação durante a estocagem de alimentos, mesmo sob refrigeração, faz com que sua presença no alimento coloque em risco a saúde dos consumidores mais susceptíveis (gestantes, crianças, imunodeprimidos) [21].

Nos Estados Unidos a Food and Drug Administration (FDA) [24] estabeleceu a norma de “tolerância zero” para presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, sendo seguida pelo *United States Department of Agriculture* (USDA). No Brasil,

apesar de não existir surtos de listeriose documentados, tendo como causa ingestão de alimentos, recentemente, pesquisas já demonstraram o isolamento de *L. monocytogenes* em carne e produtos cárneos no território brasileiro [25, 26]. Entretanto, é necessário se colocar que os dados reais podem estar sendo subestimado, uma vez que a legislação brasileira [27] não prevê limites de tolerância para presença do microrganismo em carnes e produtos cárneos.

Várias são as causas apontadas para a destacável ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos. Uma das hipóteses é que a incidência poderia estar relacionada à presença do microrganismo no ambiente intestinal dos animais, sem que ocorra a manifestação de sintomatologia clínica, facilitando, desta forma, que toda a carcaça possa ser contaminada durante as operações envolvidas no abate e evisceração do animal [28].

Kasnowski [26] cita a contaminação por pessoas envolvidas no trabalho em abatedouros, sendo constatado que 10 a 30 % eram portadores assintomáticos de *L. monocytogenes*, e também que veterinários de campo apresentavam listeriose cutânea adquirida pela manipulação de produtos de aborto infectados.

Atualmente, autores [29, 30] relatam que a facilidade do gênero *Listeria* em multiplicar-se nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos e sob baixas temperaturas o torna uma ameaça à indústria de alimentos. O fator apontado que auxilia a proliferação de *Listeria* na planta de processamento, é o crescimento de biofilmes, que podem conferir uma proteção contra a ação de desinfetantes com conseqüente manutenção do microrganismo no ambiente e em equipamentos como fatiadores, moedores e embutideiras que são considerados de difícil higienização [31]. Além disso, estudos apontam que a situação pode ser agravada, pois a microbiota autóctone da carne não interfere no crescimento de *Listeria* sp., uma vez que esse gênero foi detectado mesmo nas amostras de carne e produtos cárneos, e em amostras

ambientais e de superfície de equipamentos que apresentaram altos níveis de contaminação por aeróbios mesófilos e coliformes [32]

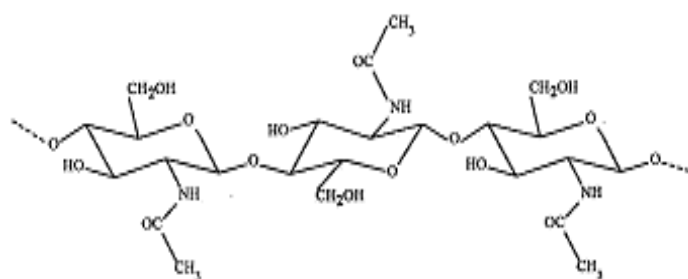
Recentemente Mead et al. [33] abordaram a ocorrência de um surto com produtos cárneos processados, envolvendo 108 pessoas contaminadas e 14 mortes, onde foi confirmada a presença de *L. monocytogenes* como agente contaminante.

Contudo, tendo em vista os riscos impostos por *L. monocytogenes* em produtos cárneos, associados ao emprego indiscriminado dos aditivos artificiais, e a necessidade de alternativas naturais em combinação a outros métodos de conservação agindo como obstáculo (“Hurdle Technology”), surge à possibilidade do uso da quitosana como composto antimicrobiano natural e de baixa toxicidade, o qual pode proporcionar segurança microbiológica e química para os consumidores de produtos cárneos.

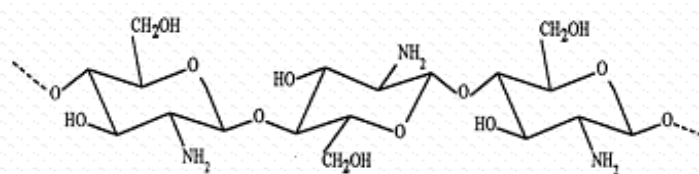
QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

As aplicações e a produção industrial da quitosana foram iniciadas a partir de 1970. No Japão, a produção de quitosana cresceu 37 % ao ano entre 1978 e 1983 [34], onde pesquisas atuais apontam para uma grande variedade de aplicações da quitina e da quitosana devido à sua versatilidade biológica [35].

A quitosana é um dos vários derivados provenientes da N-deacetilação da quitina, sendo um polímero linear, natural, insolúvel, que apresenta β -1,4 N- acetilglucosamina como unidade monomérica e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, servindo como elemento estrutural encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos [36].



Quitina



Quitosana

Conhecida por apresentarem polimorfismo, podendo assumir as conformações α , β e γ . As cadeias da quitosana ligam-se através do hidrogênio em três diferentes estruturas automórficas (α , β e γ) de acordo com a polaridade adquirida pelas cadeias de açúcar [37]. A forma α é encontrada na parede celular de fungos, carapaça de crustáceos e na cutícula de alguns insetos. A forma β é rara e difícil de ser obtida, e pode ser encontrada em associação com proteínas em tubos sintetizados [38]. Alguns autores citam que a forma β está presente nos fungos enquanto a α nos crustáceos [39]. Na α conformação, cadeias individuais apresentam arranjo antiparalelo de forma que as cadeias adjacentes são orientadas em direção oposta. A conformação β corresponde a uma unidade com polímeros de cadeias arranjadas de forma paralela. A terceira forma, γ , caracteriza-se por três unidades de cadeias, nas quais duas cadeias “up” são seguidas por uma cadeia “down”.

Acredita-se, que as três estruturas polimórficas estejam relacionadas às diferentes funções no organismo. A quitosana α forma ligação de hidrogênio intermolecular forte, enquanto a quitosana β é caracterizada por efeitos intermoleculares mais fracos [40]. A cristalinidade da quitosana, conforme avaliado por estudos de raios-X, depende do grau de acetilação e do processo pelo qual o polissacarídeo foi obtido. Já a estrutura espacial está relacionada à forma na qual a quitosana se encontra no estado sólido, ou seja, depende de a quitosana estar na forma hidratada, anidra, como complexos ou sais de quitosana [41].

Atualmente, a fonte comercial principal de quitosana tem sido a carapaça de moluscos, de camarão, de caranguejos e lagostas. A produção industrial da quitosana se faz por meio de reações de desacetilação, utilizando substâncias ácidas como reagente. As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia polimérica. Para tanto, é exigido um rígido controle das condições reacionais, as quais são essenciais para o processo em escala industrial, considerando a necessidade de obtenção de polímeros de cadeia longa com grau de desacetilação na faixa desejada [42]. Além disso, outro fator limitante trata-se dos custos elevados da produção, e do isolamento industrial limitado pelos problemas sazonais, bem como pela poluição ambiental causada pelo descarte de grandes quantidades de resíduos provenientes do processamento industrial [34,36].

Entretanto, nos últimos anos, outras formas de desacetilação têm sido utilizadas, principalmente, a desacetilação microbiológica, proporcionando excelentes rendimentos de quitosana [42,43]. O uso de massa micelial de fungos da Ordem Mucorales, incluindo *Rhizopus oligosporus* [44], *R. arrhizus* [45], *Cunninghamella elegans* [46] e *Mucor roxii* [47], já vem sendo relatados pela literatura como alternativa para a produção significativa de quitosana.

A síntese de quitina e quitosana em fungos é bastante complexa. A quitosana e quitina são constituintes da parede celular dos Zygomycetes, cuja função é a de manutenção da rigidez e da integridade estrutural das células nesses microrganismos [36, 48,49]. No início da produção, a enzima quitina sintetase ocorre na forma de zimógeno, sendo distribuída em regiões específicas da superfície celular, em vesículas especializadas chamadas quitossomas [50]. A montagem macromolecular inicia-se fora do citoplasma, onde a enzima protease atua na superfície celular ativando o zimogêneo. Desta forma a UDP-N-acetilglicosamina é produzida a partir da glicose, e a quitina sintetase catalisa a transferência do N-acetilglicosamina para polimerização da cadeia formando quitina. A quitosana presente na parede celular de alguns fungos (Mucorales) é formada a partir da deacetilação (quitina deacetilase) da cadeia de quitina nascente, durante a biossíntese de quitina. As regulações das sínteses de quitina e de quitosana são determinadas pela organização espacial da síntese de quitina na superfície celular [51].

Estudos utilizando biomassa de *Mucor rouxii* e *M. javanicus* como fonte de polissacarídeos obtiveram rendimento de quitosana em torno de 8 % [52, 53]. Em recentes estudos, tem se estabelecido métodos de otimização para processos de obtenção de maior quantidade de quitosana a partir de massa micelial de fungos [36, 54, 55].

Vantagens no uso da biomassa de fungos são: extração simultânea dos biopolímeros, independência de fatores sazonais, produção em larga escala, processo simples e econômico resultado na diminuição do tempo e dos custos requeridos para extração além da ausência de contaminação por proteínas, que podem induzir às reações alérgicas em indivíduos com predisposição alérgica a crustáceos [36, 49, 55, 56, 57].

Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos,

principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina. As indicações mais comuns são seu emprego como meio complexante de íons metálicos, para a formação de coberturas com ação antifúngica e bactericida, como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de drogas, embora ainda que controverso, como um agente ativo no emagrecimento humano por sua interação com gorduras e estruturas afins (*fatter trapper*) [34, 36, 58, 59].

A quitosana é uma fibra natural solúvel em meio ácido, cuja característica permite que este polímero possa ser utilizado na indústria alimentícia, uma vez que as enzimas envolvidas nos processos de hidrólise deste polissacarídeo (lisozima, quitina deacetilase, quitinase e quitosanase) estão presentes nos organismos animais e vegetais [60, 61]. Sendo assim, entende-se que a quitosana pode ser considerada uma opção promissora como um conservante natural, haja vista a atual tendência adotada pela indústria de alimentos de uma política decrescente do uso de aditivos químicos, impulsionados, como reflexo da debilidade e incerteza de ambos os estudos negativos e positivos relacionados à toxicidade de muitas dessas substâncias químicas.

As propriedades singulares da quitosana fazem com que esta seja bastante versátil quanto à sua aplicabilidade na área de alimentos oferecendo um amplo espectro de possíveis aplicações, podendo ser encontrada como base na fabricação de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoitos dietéticos, estabilizantes de alimentos em conservas e clarificantes de bebidas [59, 62, 63, 64, 65, 66]. No entanto, apesar da vasta gama de possíveis aplicações da quitosana em produtos alimentícios, destaca-se aqui seu uso como agente conservante no sentido de impossibilitar ou atrasar a deterioração microbiana ou enzimática dos alimentos considerando-se suas propriedades físico-químicas e seu reconhecido potencial antimicrobiano e antioxidante.

Estudos têm demonstrado que esses polímeros são capazes de provocar a inibição do crescimento de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [65, 67], *Salmonella typhimurium*, *S. faecalis* [68], *S. enterica*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* [69], *Listeria monocytogenes* [70], *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* [63], *Sacharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp. [71, 72].

O mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos não está completamente elucidado, mas várias propostas são sugeridas. Alguns pesquisadores correlacionam a atividade antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos uma vez que seus grupos amínicos protonados provavelmente se ligam seletivamente à superfície carregada negativamente desses microrganismos, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e conseqüente inibição microbiana [73, 74, 69].

Estudos mais recentes revelam, ainda, que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas das soluções, concentração utilizada e tempo de exposição, além das características inerentes à membrana do microrganismo em questão [63].

Neste sentido, pesquisas demonstram que a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molecular, maior o potencial antimicrobiano. Desprende-se assim a sugestão de que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: nas Gram-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes,

enquanto a de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, ligando-se ao DNA e impedindo assim que o RNA e, conseqüentemente, as proteínas, sejam sintetizados causando distúrbios no metabolismo celular [67, 75, 76]. Em adição, sabe-se que a quitosana também apresenta a função de agente quelante de íons metálicos, e dessa forma é sugerido ainda que molécula poderia interferir na produção de toxinas e crescimento microbiano [57].

Lee et al. [77] & Barreteau et al. [78], sugerem que oligossacarídeos de quitosana e a própria quitosana de baixa massa molecular exerceriam um efeito benéfico seletivo sobre o crescimento e atividade biológica de bactérias probióticas tais como *Bifidobacteria* e *Lactobacillus*.

Tsai e Hwang [74] examinando a atividade antibacteriana *in vitro* frente a algumas bactérias patogênicas e probióticas relataram que para a quitosana com grau de deacetilação entre 70 e 95 %, a concentração mínima letal para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemoliticus*, *Listeria monocytogenes* e *Shigella dysenteriae* foi de 50 a 200 ppm, enquanto para *Clostridium perfringens* e bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* oscilou entre 250 e 1000 ppm. Fica evidente que a resistência destas espécies probióticas testadas é pronunciadamente mais elevada, quando comparada às bactérias patogênicas relacionadas a alimentos, o que leva a crer que a superfície celular destas células é diferenciada, fazendo-se necessário a realização de mais estudos acerca das mesmas para se alcançar uma explicação conclusiva. Outra constatação interessante destes mesmos autores refere-se à baixa eficiência antibacteriana da quitosana frente a *C. perfringens* testada *in vivo* após a ingestão na forma de pó em animais de laboratório, atribuindo-se este fato fundamentalmente às diferenças de pH (nas condições do intestino o pH é maior que 7,0, estando acima do pKa da quitosana), havendo portanto menos grupos amínicos protonados, desfavorecendo a interação com a superfície celular.

Estudos recentes já apontam à aplicação da quitosana em alimentos. O tratamento de frutos com quitosana, tem se mostrado promissor no controle de doenças em pós-colheita de frutos [79, 80], por apresentar atividade contra vários patógenos [80, 81, 82, 83, 84]. Outra utilidade para a quitosana é o uso como um revestimento antimicrobiano constituído de amido de mandioca adicionado de quitosana, apresentando assim resultado satisfatório no controle da microbiota presente no alho minimamente processado, visto que o crescimento de bactérias psicrotróficas, fungos filamentosos e leveduras apresentou uma redução considerável durante 20 dias de estocagem [85]

Altieri et al. [86] estudando a eficiência antibacteriana da quitosana em queijo mozzarella mantido sob temperatura de refrigeração, constataram que a quitosana inibiu o crescimento de microrganismos do grupo coliforme e de *Pseudomonas* sp. Inferiram ainda, que a presença deste polissacarídeo não afetou a viabilidade e crescimento das bactérias ácidoláticas, ao contrário, observou-se um sutil estímulo com relação à sua multiplicação, de forma a não comprometer a funcionalidade tecnológica que esta classe de microrganismos exerce sobre este produto, demonstrando assim, que o uso de quitosana seria uma opção vantajosa para estender a vida de prateleira deste alimento em termos tecnológicos e econômicos.

Chi et al. [87] relataram efeito sinérgico sobre a propriedade antibacteriana de filmes de quitosana enriquecidos com extrato puro de óleo de orégano, incorporadas em fatias de mortadela armazenada a 10°C por 5 dias, observando-se uma redução do número de células viáveis de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos, comparada com 1 a 3 ciclos logarítmicos quando aplicado somente o filme de quitosana, constatando ainda que o processo de aplicação combinada torna-se mais aceito em termos sensoriais.

Por razões de saúde pública, os processos de preservação de alimentos são determinados

primeiramente pelo controle do desenvolvimento microbiano. Contudo, outros fatores devem ser controlados tais como a ocorrência de reações químicas e enzimáticas que comprometem a qualidade sensorial do produto. Diversos estudos têm reportado a habilidade antioxidante da quitosana, tendo sido avaliado seu uso em carnes e derivados e frutos do mar que contém quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, particularmente susceptíveis à oxidação lipídica durante seu processamento e armazenamento [88].

Shahidi et al. [89] e Darmadji & Izumimoto [90] verificaram que a adição de quitosana mostrou-se eficiente como agente de controle da oxidação lipídica em bacalhau (*Gadus morhua*). Kanatt et al. [88], por sua vez, estudaram o efeito da adição de quitosana em carne de cordeiro submetida a processo de irradiação, constatando que este polissacarídeo minimizou os efeitos deste processo sobre a peroxidação lipídica, uma vez que esta reação é justamente o fator limitante ao uso da irradiação em carnes. O mecanismo de ação antioxidante da quitosana nestes produtos é atribuído à sua capacidade de atuar como quelante de íons metálicos, tais como o ferro, ligado às moléculas de hemoglobina e mioglobina, o qual age como catalisador desta reação [91, 78].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise das informações científicas correntemente disponíveis, observa-se que o uso de compostos naturais poderia figurar como uma alternativa para a redução da quantidade de aditivos artificiais utilizados em alimentos, particularmente em produtos cárneos, reduzindo os potenciais riscos à saúde do consumidor. Dentre as fontes naturais, a quitosana vem se destacando devido as suas propriedades de biodegradabilidade, incapacidade em provocar efeitos tóxicos, e propriedade conservante em alimentos, uma vez que inibi e elimina um amplo espectro de bactérias, incluindo bactérias de grande interesse em produtos cárneos,

como no caso de *L. monocytogenes*. Outra vantagem que faz do uso da quitosana de grande interesse para a aplicação em alimentos, se deve ao fato deste potencial aditivo alimentar, não exercer modificação nas características organolépticas, podendo ser aplicado pela indústria com fonte segura na conquista de novos consumidores.

REFERÊNCIAS

- [1] Fellows, P. J. “Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas”, 2ª edição, Artmed, Porto Alegre (2006).
- [2] Chao, S. C. & Young, D. G. - Journal of Essential Oils Research, 12, p.630 (2000).
- [3] Andremont, A. - American Journal of Infect Control, 29, p.256 (2001).
- [4] Almeida, A. A. P. & Silva, P. H. F. - Qualidade em dia, 5, p.5 (1998).
- [5] Akutsu, R. C. et al. - Revista de Nutrição, 18(3), p.419 (2005).
- [6] Rodríguez, M. M., Bertin, B. M. A. & Assis, L. - Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, 24(1), p.88 (2004).
- [7] Redmond, E. C. & Griffith, C. J. - Journal of Food Protection, 66(1), p.130 (2003).
- [8] Tauxe, R. V. - Food Control, 13(6), p.363 (2002).
- [9] Carmo, G. M. I. et al. – “Doenças transmitidas por alimentos: Análise Descritiva dos Dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica, Brasil, 1999-2002”. In: Anais do 13º Encontro Nacional dos Analistas de Alimentos. Rio de Janeiro - RJ (2003).
- [10] Talamini, E., Pedrozo, E. A. & Silva, A. L. - Gestão & Produção, 12(1), (2005).
- [11] Teuber, M. - Cellular And Molecular Life Science, 56, p.755 (1999).

- [12] Romanelli, P. F., Caseri, R. & Lopes Filho, J. F.- Revista Ciência e Tecnologia Alimentos, 22(1), p.70 (2002).
- [13] Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. - Meat Science, 59, p. 5 (2001).
- [14] Melo Filho, A. B., Biscontini, T. M. B. & Andrade, S. A. C. - Revista Ciência e Tecnologia Alimentos, 24(3), p.390 (2004).
- [15] BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria, nº. 540, de 27 de outubro de 1997. Brasília (1997).
- [16] Hirschbruch, M. D., Torres, E. A. F. S., Roviolo, A. & Rabay, A. - Revista Higiene Alimentar, 13(62), p.28, (1999).
- [17] Lücke, F. K. - Fleischwirtschaft International, 4, p.38 (2000).
- [18] McLauchlin, J. - Food Control, 7(4/5), p.187 (1996).
- [19] MMWR/CDC-MORBIDITY MORTALITY WEEKLY REPORTS. “Listeriosis associated with consumption of turkey franks”. MMWR, 38, p.267-268 (1989).
- [20] Sakate, R. I., Aragon, L. C., Raghianti, F., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M. & Destro, M. T. - Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 53(2), (2003).
- [21] Catão, R. M. R. & Ceballos, B. S. O. & Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21(3), p.281-287 (2001).
- [22] Dediol, C. et al. - Higiene Alimentar, 16(102/103), p.13 (2002).
- [23] Germano, M. I. S. & Germano, P. M. L.- “Higiene e Vigilância Sanitária dos Alimentos”, Varela, São Paulo (2001).
- [24] FDA. “CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION; USDA/ FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION”. Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne

- Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponível em: <http://www.foodsafety.gov> e <http://www.cfsan.fda.gov>, consulta em 21 de janeiro de 2005.
- [25] Barbalho, T. C. F., Almeida, P. F., Almeida, R. C. C. & Hofer, E. - Food Control, 16, p.211 (2005).
- [26] Kasnowski, M. C. “*Listeria* ssp., *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída”, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Brasil (2004).
- [27] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N.12, de 2 de Janeiro de 2001. Diário Oficial da união, Brasília, 10/01/2001.
- [28] Quinn, P. J. – “Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas”, ARTMED, Porto Alegre (2005).
- [29] Benkerroum, N., Daoudi, A., Hamraoui, T., Gralfi, H., Thiry, C., Duroy, M., Eyrart, P. & Roblain, D. - Journal of Applied Microbiology, 98, p.56 (2005).
- [30] Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Hugas, M. & Aymerich, T. - Journal of Applied Microbiology, 39(3), p.290 (2004).
- [31] Beresford, M. R., Andrew, P. W., Shama, G. Journal of Applied Microbiology, 90, p.1000 (2001).
- [32] Barros, M. A. F., Nero, L. A., Manoel, A. V. B., Ovídio, L., Silva, L. C., Franco, B. D. G. M. & Beloti, V. - Brazilian Journal of Microbiology, 38(4), (2007).
- [33] Mead, P. S., Dunne, E. F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Saleri, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B. D., Hayes, P., Dewitt, W.,

- Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L. & Swaminathan, B., *Epidemiology and Infection*, 134, p.744 (2006).
- [34] Craveiro, A. A., Craveiro, A. C. & Queiroz, D. C. – “Quitosana: A fibra do futuro”, PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, Fortaleza (1999).
- [35] Campos-Takaki, G. M. “The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production”, in: *Chitin and chitosan opportunities and challenges*, Dutta, P. K. (ed.), SSM: International Publications, Índia (2005).
- [36] Franco, L. O., Stamford, T. C. M., Stamford, N. P. & Campos-Takaki, G. M. - *Analytica*, 14, p.40 (2005).
- [37] Winterowd, J. G. & Sandford, P. A. - “Chitin and Chitosan”, in: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Stephen, A. M. (ed.), Marcel Dekker, New York (1995).
- [38] Rinaldo, M. - *Progress in Polymer Science*, 31, p.603 (2006).
- [39] Arora, D. & Kaur, J. - *International Journal of Antimicrobial Agents*. 12, p.257 (1999).
- [40] Lima, I. S. – “Quitosanas e quitosanas químicas e morfologicamente modificadas com anidrido succinico: propriedades, adsorção e termoquímica”, Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2005).
- [41] Signini, R. – “Estudo das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana”, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil (2002).
- [42] Dallan, P. R. M. – “Síntese e caracterização de membranes de quitosana para aplicação na regeneração de pele”, Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2005).
- [43] Felse, A. P. & Panda, T. - *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 20(6), p.505 (1999).

- [44] Aloysius, R., Karim, M. I. A. & Ariff, A. B. - World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(2), p.571 (1999).
- [45] Zhou, J.L. - Applied Microbiology and Biotechnology, 51(7), p.686 (1999).
- [46] Franco, L. O., Maia, R. C. C. & Porto, A. L. F., Messias, A. S., Fukushima, K. & Campos Takaki, G. M. - Brazilian Journal of Microbiology, 35(3), (2004).
- [47] Roux Van Der Merwe, M. P., Badenhorst, J. & Britz, T. J. - World Journal Microbiology & Biotechnology, 15, p.312 (2004).
- [48] Amorim, R. V. S., Pedrosa, R. P., Kazutaka, F., Martínez, C. R., Ledingham, W. M. & Campos-Takaki, G. M. - Food Technology and Biotechnology, 44(4), p.519 (2006).
- [49] Stamford, T. C. M., Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Neto, B. B. & Campos-Takaki, G. M. - Electronic Journal of Biotechnology, 10(1), p.1 (2007).
- [50] Garcia, S. B. - Elsevier Applied Science, 23 (1989).
- [51] Davis, L. L. & Bartnicki-Garcia, S. - Journal of General Microbiology, 130, p.400 (1984).
- [52] Synowiecki, J. & Al-Khatteb, N. A. A. Q. - Food Chemistry, 60(4), p.605 (1997).
- [53] Andrade, V. S., Neto, B. B., Fukushima, K. & Campos-Takaki, G. M. - Revista Iberoamericana de Micología, 20, p.149 (2003).
- [54] Andrade, V. S., Neto, B. B., Souza, W. & Campos-Takaki, G. M. - Canadian Journal of Microbiology, 46(11), p.1042 (2000).
- [55] Amorim, R. V. S., Souza, W., Fukushima, K. & Campos-Takaki, G. M. - Brazilian Journal of Microbiology, 32, p.20 (2001).
- [56] Silva, M. C. F., Stamford, T. C. M., Franco, L. O. & Campos-Takaki, G. M. - Asian Chitin Journal, 2, p.29 (2006).
- [57] Amorim, R. V. S., Campos-Takaki, G. M., Ledingham, W.M. & Fukushima, K. - Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32(1), p.19 (2005).

- [58] Assis, O. B. G. & Leoni, A. M. – Biotec-Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 30, p.33 (2003).
- [59] Borderías, A. J., Sánchez-Alonzo, I. & Pérez-Mateos, M. - Trends in Food Science & Technology, 16, p.458 (2005).
- [60] Yamaguchi, R., Arai, Y. & Itoh, T. - Carbohydrates Research, 88, p.172 (1981).
- [61] Mello, K. G. P. C., Bernusso, L. C., Pitombo, R. N. M. & Polakiewicz, B. - Brazilian Archives of Biology and Technology, 49(4), p.665 (2006).
- [62] Gracy, R. W. - American Journal of Orthopedics, 14(4), p.53 (2003).
- [63] Costa Silva, H. S. R., Santos, K. S. C. R. & Ferreira, E. I. - Química Nova, 29(4), p.776 (2006).
- [64] Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon. Y. J. - Trends in Food Science & Technology, 10, p.37 (1999).
- [65] Li, Y., Chen, X. G., Liu, N., Liu, C. S., Liu, C. G., Meng, X. H., YU, L. J. & Kenedy, J. F. - Carbohydrate Polymer, 67, p.227 (2007).
- [66] Borgogni, C. F., Polakiewicz, B. & Pitombo, R. N. M. - Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26(3), p.502 (2006).
- [67] Zheng, L-Y., Zhu, J-F. - Carbohydrate Polymer, 54, p.527 (2003).
- [68] Chung, Y. C., Tsai, C. F., Li, C. F. - Fisheries Science, 72, p.1096 (2006).
- [69] Yadav, A. V. & Bhise, S. B. - Current Science, 87(9), p.1176 (2004).
- [70] Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. & Deschamps, A. - Journal of Food Science, 67(3), p.1162 (2004).
- [71] Rhoades, J. & Roller, S. - Applied and Environmental Microbiology, 66(1), p.80 (2000).

- [72] Sagoo, S. K., Board, R. & Roller, S. - Letters in Applied Microbiology, 34, p.168 (2002).
- [73] Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Tahzibi, A., Bayati, K. H., Pouladzadeh, M., Zohuriaan-Mehr, M. J. & Rafiee-Tehrani, M. - European Polymer Journal, 40, p.1355 (2004).
- [74] Tsai, G-J., Hwang, S-P. - Fisheries Science, 70, p.675 (2004).
- [75] Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J, International Dairy Journal, **14**, 273 (2004)
- [76] Harish Prashanth, K. V. & Tharanathan, R. N. - Trends in Food Science & Technology, 18(3), p.117 (2007).
- [77] Lee, H. W., Park, Y. S., Jung, J. S. & Shin, W.S. - Anaerobe, 8(6), p.319 (2002).
- [78] Barreteau, H., Delattre, C. & Michud, P. - Food Technology and Biotechnology, 44(3), p.323 (2006).
- [79] El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C. & Benhamou, N. - Postharvest Biology and Technology, 12(2), p.183 (1997).
- [80] Jiang, Y. & Li, Y. - Food Chemistry, 73(2), p.193 (2001).
- [81] Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. & Wilson, C. L. - Crop Protection, 22(9), p.1087 (2003).
- [82] El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. & Boulet, M. - Journal of Food Science, 56(6), p.1618 (1991).
- [83] Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Venere, D. Di & Salerno, M. - Food Microbiology and Safety, 67(5), p.1862 (2002).
- [84] Romanazzi, G., Nigro, F. & Ippolito, A. - Postharvest Biology and Technology, 29(1), p.73 (2003).
- [85] Botrel, D. A., Soares, N. F. F., Geraldine, R. M., Pereira, R. M. & Fontes, E. A. F. - Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, 27(1), (2007).

- [86] Altieri, C., Scrocco, C., Sinigaglia, M. & Del Nobile, M. A. - Journal of Dairy Science, 88, p.2683 (2005).
- [87] Chi, S., Zivanovic, S. & Penfield, M. P. - Food Science and Technology International, 12(2), p.111 (2006).
- [88] Kanatt, S. R., Chander, R. & Sharma, A. - Food Science and Technology International, 39, p.997 (2004).
- [89] Shahidi, F., Kamil, J., Jeon, Y-J. & Kim, S. K. - Journal of Food Lipids, 9, p.57 (2002).
- [90] Darmadji, P. & Izumimoto, M. - Meat Science, 38, p.243 (1994).
- [91] Kamil, J. Y. V. A., Jeon, Y. J. & Shahidi, F. - Food Chemistry, 79, p.69 (2002).

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Microrganismos

A produção e extração de quitosana foram realizadas a partir da biomassa de *Mucor rouxii* (UCP 064), isolado do sedimento de mangue do Município de Rio Formoso (Recife, Pernambuco, Brasil), sendo tal cepa gentilmente cedida pelo Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB- Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP. A cepa foi mantida em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) e estocada sob refrigeração (4°C).

Para os testes de atividade antibacteriana, utilizou-se a cepa padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como microrganismo revelador, a qual foi cedida pelo Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos - LEAAL, do Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, UFPE (Recife, Pernambuco, Brasil I).

3.2 Padronização dos inóculos microbianos

Esporos obtidos a partir de culturas *M. rouxii* UCP 064 foram coletados e transferidos para tubo de ensaio contendo NaCl (0,85 g.100 mL⁻¹). A suspensão foi inoculada, em placa de Petri, contendo meio de BDA. Após 12 horas de crescimento, retirou-se uma UFC (unidade formadora de colônia) para realização do cultivo por 7 dias a 28°C. Os esporos formados foram retirados com auxílio de zaragatoas estéreis e suspensos em solução salina tamponada, sendo o inóculo padronizado na concentração de 10⁸ esporos/mL, os quais foram contados com o auxílio de uma Câmara de Newbauer (STAMFORD et al., 2007).

O inóculo de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana foram obtidos de culturas crescidas em caldo BHI a 37 °C por 18 – 24 horas.

Após incubação as células bacterianas foram separadas do meio de cultivo através de centrifugação (10000 rpm, 10 min), lavada três vezes em tampão KCl (0,05 M KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 1 Mm CaCl_2 , 0,1 Mm MgCl_2 , pH 6,0) e ressuspendida em tampão KCl. A suspensão celular foi ajustada para um densidade ótica de 1,5 a 600 nm, sendo obtido um inóculo bacteriano de aproximadamente de $1,0 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ (SANO et al., 2001).

3.3 Meio de cultivo para produção da quitosana

Para a produção da quitosana foi utilizado o Caldo Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) cuja composição química contém: 8,72g proteínas totais, 16,9g lipídeos, 40,9g amido, 11,14g glicose. L^{-1} , e valor de pH 7,0. Os tubérculos de jacatupé utilizados na preparação do caldo foram colhidos na Estação Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil), cujas superfícies foram lavadas com água e sabão, para retirada de impurezas. O caldo jacatupé foi preparado a partir das túberas descascadas e fatiadas em rodela ($\pm 1,5 \text{ cm}$), as quais foram fervidas em água destilada na proporção de 1:2 (p/v) por 45 minutos. Após o resfriamento o caldo obtido foi filtrado em papel de filtro, sendo em seguida, autoclavado a $121,5^\circ\text{C}$, por 15 minutos, como descrito por Stamford et al. (2007).

3.4 Produção de quitosana

Para a produção de quitosana, 10 m L do inóculo padronizado de *M. rouxii* UCP 064 foram adicionados a frascos Erlenmeyer (1000 L), contendo 290 mL de meio Jacatupé, sendo tal sistema incubado a 28°C sob agitação de 150 rpm durante 96 horas Stamford et al. (2007). Ao final do período de incubação, a massa micelial fúngica foi separada do meio de

crescimento através de filtração simples, sendo o material obtido lavado duas vezes com água destilada gelada e deionizada, e posteriormente submetido ao processo de extração de quitosana.

3.5 Parâmetros bioquímicos do crescimento de *M. rouxii*

Para avaliação do perfil do crescimento de *M. rouxii* no caldo Jacatupé as variáveis biomassa, consumo de glicose, consumo de nitrogênio e pH foram avaliadas nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo. A quantificação da massa micelial foi determinada por método gravimétrico; o consumo de glicose foi determinado por método colorimétrico (Labtest® Kit - Glucose oxidase) através do uso de uma curva padrão com solução de glicose (0,5 - 5,0 g.mL⁻¹); o consumo de nitrogênio foi determinado por método colorimétrico (Labtest® Kit for protein) através do uso de uma solução padrão BSA (albumina de soro bovino) com faixa de concentração variando entre 1,0 e 4,0 g.100mL⁻¹. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital de duplo feixe (Spectronic Mod. Genesys 2) no comprimento de onda de 510nm e de 545nm, respectivamente, para determinação de glicose e proteínas totais. Os valores de pH foram mensurados através do uso de potenciômetro (Digital Pontentiometer Quimis Mod. 400 A). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6 Extração de quitosana

A quitosana foi extraída a partir da massa micelial de *M. rouxii* obtida após cultivo em caldo Jacatupé, e submetida a processo de liofilização de acordo com o método descrito por Stamford et al. (2007). O processo envolveu: i) desproteinização com hidróxido de sódio a 2

% (30:1 v/p, 9 0°C, 2 horas); ii) separação da fração álcali-insolúvel por centrifugação (4000 rpm, 15 minutos); iii) hidrólise ácida com de ácido acético a 10 % (40:1 v/p, 60 °C, 6 horas); iv) separação da quitina por centrifugação (4000xg, 15 minutos.); e v) precipitação da quitosana com NaOH 4 M, até obtenção do pH 9,0.

3.7 Caracterização da quitosana de *M. rouxii*

3.7.1 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DEACETILAÇÃO

O grau de deacetilação da quitosana foi determinado por espectroscopia de raio infravermelho, segundo metodologia descrita por Amorim et al (2006). Alíquotas de 2,0 mg de quitosana foram submetidas a secagem em esufa a vácuo por 15 horas a 60 °C. Após este período, 100 mg de KBr foram adicionados, e a mistura homogeneizada em almofariz de ágata. As pastilhas foram preparadas e mantidas em estufa a vácuo a 110 °C por 24 horas. Os espectros foram registrados em um espectrofotômetro BRUKER Mod. IFS 66. O grau de deacetilação foi determinado pela equação: 100 - DA (grau de acetilação), enquanto que o grau de acetilação foi determinado usando a absorbância A_{1655}/A_{3450} , calculado através da seguinte equação:

$$DA/\% = (A_{1655}/A_{3450}) \cdot 100 / 1,33$$

3.7.2 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da quitosana foi determinado por viscosidade, segundo a metodologia proposta por Santos et al. (2003). As medidas de viscosidade foram feitas utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske ($d_{\text{interno}} = 1,01\text{mm}$) termostatizado a $(25 \pm$

0,01 C), em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte. Para a determinação da viscosidade intrínseca, foram preparadas soluções de quitosana (utilizando tampão de ácido acético como solvente) com concentrações variando de $9,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ g.mL⁻¹. Os tempos de escoamento foram determinados em segundos.

3.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), a quitosana fúngica foi inicialmente diluída em ácido acético a 1 %, sendo o pH ajustado a 5,8 utilizando NaOH ou HCl (SHIGEMASA e MINAMI, 1996), para a obtenção da solução mãe (10 mg.mL⁻¹). A partir deste procedimento, foram realizadas diluições seriadas da solução mãe em caldo BHI, para obtenção de soluções de quitosana nas concentrações de 5,0; 2,5; 1,25 e 0,625 mg.mL⁻¹. Como controle, foram preparadas soluções de caldo BHI adicionado de ácido acético, e uma segunda solução contendo apenas o caldo BHI. A padronização do pH em 5,8 nas diferentes concentrações foi realizada utilizando NaOH 1M ou HCl 1M.

A CIM e CBM da quitosana foram determinadas através do teste de Heilman por macrodiluição em caldo, de acordo com o descrito por Chambrevil & Marmonier (1987). Inicialmente, 1 mL da suspensão de *Listeria monocytogenes* foi inoculado em 5 mL em cada solução com diferentes concentrações de quitosana. Após agitação em vortex por 30 segundos, o sistema foi incubado a 35 °C por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração que não apresentou crescimento microbiano visível foi determinada como CIM. Para determinação da CBM, uma alíquota de 100 µL foi inoculada em Ágar

Muller-Hinton por 48 horas a 35 °C, sendo considerada a CBM a menor concentração na qual a cepa não apresentou capacidade de crescimento em Ágar Muller-Hinton.

3.9 Efeito da quitosana sobre a viabilidade bacteriana

Os ensaios da interferência da quitosana sobre a viabilidade celular de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foram realizados através do método de contagem de células viáveis, nos quais se verificou o comportamento das cepas microbianas frente às diferentes concentrações da quitosana. Amostras sem a adição de quitosana foram utilizadas como ensaios controle.

Inicialmente 10 mL do caldo com diferentes concentrações de quitosana foram acrescidos de 1 mL da suspensão bacteriana, sendo o sistema incubado a 35 °C por 24 horas. Nos intervalos de 0, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas pós-incubação, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi diluída seriadamente (10^{-1} a 10^{-5}) em solução salina 0,85 % estéril, e inoculada em placas de Petri estéreis contendo ágar Muller-Hinton (Figura 1), e uniformemente distribuídos com o auxílio de alças de Drigalski descartáveis (Figura 2), sendo incubadas por 48 horas a 35 °C. Após o fim do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC.mL⁻¹ (SAGDIÇ, 2003).



Figura 2. Plaqueamento da amostra



Figura 3. Espalhamento da amostra

3.10 Produção de Patê de Carne Bovina

Para a produção do patê de carne, foram utilizados cortes de carne bovina tipo alcatra, sal (Pirâmide Ltda., Areia Branca, Brasil) e açúcar (União, São Paulo, Brasil) comercialmente disponíveis em Supermercados da Cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. Os condimentos gengibre, mostarda e pimenta do reino, foram obtidos secos e moídos em casa especializada localizadas no mercado do Centro da Cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. Os demais ingredientes como, nitrito de sódio (Kienast & Kraischmer Ltda., Santo André, Brazil), o antioxidante eritorbato de sódio (Kienast & Kraischmer Ltda., Santo André, Brazil) e o amido dextrinizado (Rhoister Ind. Com. Ltda., Vargem Grande, Brasil) foram adquiridos de representantes comerciais especializados em indústrias de alimentos. As quantidades de cada ingrediente utilizado na formulação do patê bovino são demonstradas na Tabela 1 (adaptado de SILVA et al. 2000).

TABELA 1. Formulação do patê de carne

MATÉRIA-PRIMA	QUANTIDADES (g.100g ⁻¹)
Carne bovina	100
Nitrito	0,25
Eritorbato	0,25
Pimenta	0,02
Gengibre	0,05
Açúcar	0,08
Mostarda	0,1
Sal	1,5
Amido dextrinizado	0,05
Água	25,0

Em sala asséptica, bancadas e instrumentos foram separados e devidamente higienizados (Figura 3). A carne foi limpa com o auxílio da faca e tábua (Figura 4), cortada (Figura 5) e triturada em moedor de bancada (Figura 6). Em seguida, foi realizada a mistura dos ingredientes, sendo a massa transferida para cutter (Sire, Super Cutter model, São Paulo, Brasil) para total homogeneização, e obtenção da consistência desejada de patê.



Figura 3. Instrumentos utilizados para preparação do patê



Figura 4. Limpeza da carne utilizada no patê



Figura 5. Corte da carne para facilitar trituração



Figura 6. Trituração da carne utilizada no patê

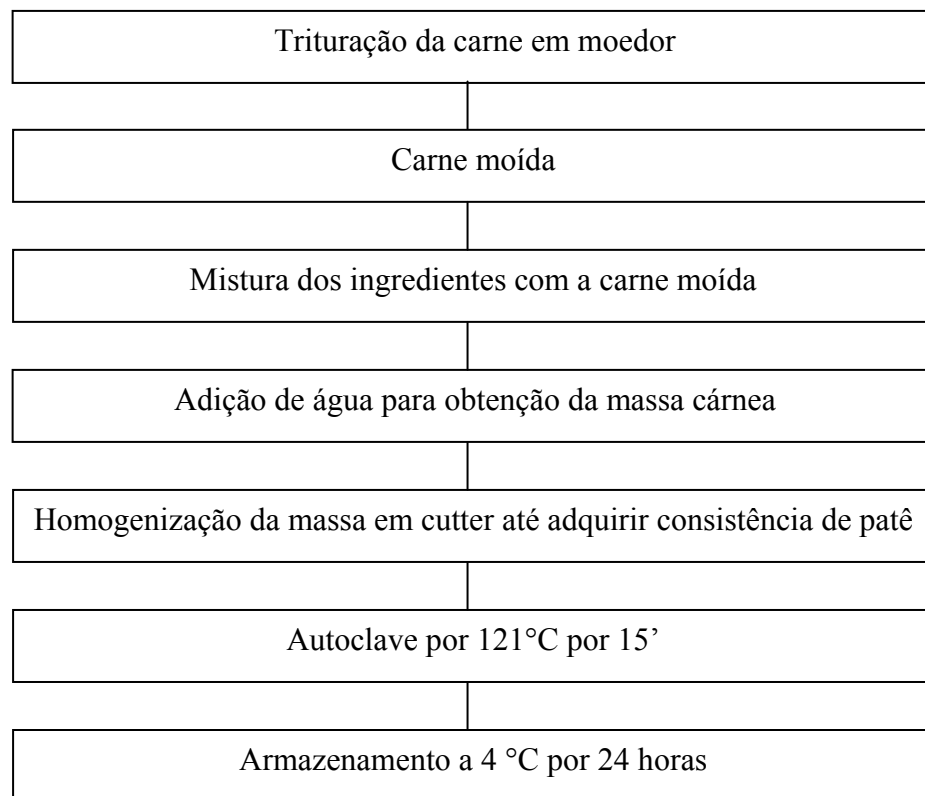


Figura 7. Fluxograma das etapas de produção do patê de carne bovina.

Alíquotas de 50g do patê obtido foram acondicionadas em frascos de vidro estéreis com tampa, os quais foram submetidos à autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Após tal procedimento, os frascos contendo as amostras foram resfriados a temperatura ambiente, sendo em seguida armazenadas a 4 °C por um período máximo de 24 horas, até a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana (Figura 8).



Figura 8. Erlemeyer com patê

3.11 Tratamento de Patê com Quitosana

As amostras de patê de carne bovina contidas nos frascos de vidro foram assepticamente transferidas para sacos de polipropileno estéreis (figura 9), sendo em seguida adicionados de solução de quitosana, em quantidade e concentração suficiente para prover uma concentração final no sistema de 5 mg de quitosana por grama de patê. Em seguida, 1 mL do inóculo de *L. monocytogenes* foi adicionado a cada amostra, e homogenizados manualmente por pressão durante 10 minutos. O sistema obtido foi armazenado a 4° C.



Figura 9. Saco estéril com patê adicionado de quitosana

A contagem de *L. monocytogenes* foi realizada nos tempos 0, 1, 2, 4, 6 dias de armazenamento. Para tal, 10 g de cada amostra foi seriadamente diluída (1:10 p/v) em solução salina (0,85 % p/v) estéril, homogenizada por 5 minutos utilizando vortex, e diluída seriadamente (10^{-2} a 10^{-5}) em solução salina (0,85 % p/v) estéril. Em seguida, uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo ágar seletivo *Listeria* com suplemento (ceftazidime: 10,0 mg; ácido nalidix: 10,0 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas, sendo os resultados da contagem bacteriana expressos como Log UFC.g⁻¹. Amostras de patê sem adição de quitosana foram utilizadas como ensaios controle.

3.12 Influência dos Ingredientes do Patê Sobre o Efeito Antibacteriano da Quitosana

Como forma de avaliar a possível influência dos diferentes ingredientes utilizados na formulação do patê sobre a eficácia da quitosana fúngica (5 mg.g^{-1}) em relação a viabilidade celular de *L. monocytogenes* ATCC 7644, foram realizados oito diferentes modelos:

- I) Carne bovina moída (50 g);
- II) Carne bovina moída (50 g) + açúcar ($0,08 \text{ g.100g}^{-1}$);
- III) Carne bovina moída + especiarias (pimenta $0,02 \text{ g.100g}^{-1}$; mostarda $0,1 \text{ g.100g}^{-1}$; gengibre $0,05 \text{ g.100g}^{-1}$);
- IV) Carne bovina moída (50 g) + nitrito de sódio ($0,25 \text{ g.100g}^{-1}$);
- V) Carne bovina moída (50 g) + eritorbato ($0,25 \text{ g.100g}^{-1}$);
- VI) Carne bovina moída (50 g) + amido dextrinizado ($0,05 \text{ g.100g}^{-1}$);
- VII) Carne bovina moída (50 g) + sal ($1,5 \text{ g.100g}^{-1}$);
- VIII) Formulação do patê com todos os ingredientes (50 g)

Todos os modelos cárneos foram previamente autoclavados, sendo após resfriamento a temperatura ambiente acondicionados em sacos de prolipropileno estéreis, adicionados de solução de quitosana (5 mg de quitosana. g patê) e posteriormente adicionado de 1 mL do inóculo de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e armazenados a 4°C conforme procedimento descrito anteriormente (item 3.14). A contagem de *L. monocytogenes* em cada modelo foi realizada nos tempos 0, 1, 2, 4, 5 e 6 dias de armazenamento. Para tal, 10 g de cada amostra foi seriadamente diluída ($1:10 \text{ p/v}$) em solução salina ($0,85 \text{ \% p/v}$) estéril, homogenizada por

5 minutos utilizando vortex, e diluída seriadamente (10^{-2} a 10^{-5}) em solução salina (0,85 % p/v) estéril. Em seguida, uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo ágar seletivo *Listeria* com suplemento (ceftazidime: 10,0 mg; ácido nalidixico: 10,0 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas, sendo os resultados da contagem bacteriana expressos como Log UFC.g⁻¹. Amostras dos diferentes modelos cárneos foram utilizadas como ensaios controle.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e de estatística inferencial (teste t de Student e teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.01$) entre os diferentes tratamentos aplicados.

RESULTADOS

4 RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS

Os artigos apresentados a seguir referem-se às observações dos ensaios laboratoriais de investigação da atividade da quitosana produzida por *Mucor rouxii* (UCP064) sobre a inibição do crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em caldo e em matriz alimentar. Dois artigos científicos originais foram submetidos a revistas internacionais, os quais serão apresentados em ordem cronológica de elaboração em suas versões originais.

4.1 Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes* in foods

O primeiro artigo original deste estudo é intitulado: **“POTENTIAL OF CHITOSAN FROM *Mucor rouxii* UCP064 AS ALTERNATIVE NATURAL COMPOUND TO INHIBIT *Listeria monocytogenes* IN FOODS”**. Tal artigo foi submetido como artigo original à revista: **Current Microbiology**, a qual é classificada como qualis internacional A pela CAPES. (ANEXO A)

Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes* in foods

Roberta A. Bento ^a, Tânia L.M. Stamford ^b, Galba M. de Campos-Takaki ^c, Thayza C.M. Stamford ^d, Evandro L. de Souza ^e

^a Laboratory of Fermentation, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

^b Laboratory of Fermentation, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

^c Nucleus of Research in Environmental Sciences, Department of Chemistry, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil;

^d Department of Physiology and Pathology, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

^e Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Abstract Contamination of foods with *Listeria monocytogenes* has been known as a threat for human health and a concern for the food industry. The objective of this study was to evaluate the growth profile and chitosan production by *Mucor rouxii* UCP 064 grown in yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) medium, as well to assess the anti-*L. monocytogenes* efficacy of the obtained chitosan in order to a possible application in foods. Higher value of biomass of *M.*

rouxii (16.9g.L⁻¹) and best yield the chitosan (62 mg.g⁻¹) was found after 48 hours of cultivation. Residual glucose and nitrogen in the growth media were 4.1 and 0.02 g.L⁻¹, respectively, after 96 h. Obtained chitosan presented 85% of degree of deacetylation and 2.60×10^4 g.mol⁻¹ of molecular weight. MIC and MBC values of chitosan against *L. monocytogenes* ATCC 7664 were, respectively, 2.5 and 5.0 µg.mL⁻¹. At 2.5 and 5.0 mg.mL⁻¹ chitosan caused cidal effect in a maximum time of 4 h. Values below 2 log cfu.mL⁻¹ were found from 2 h on and no recovery in bacterial growth was noted up to 96 h. These results show the biotechnological potential of yam bean medium for chitosan production by *Mucor rouxii*, as well support the possible rational use of chitosan from fungi as natural antimicrobial to control *L. monocytogenes* in foods.

Introduction

Listeria monocytogenes is widely distributed in nature and has been frequently isolated from a range of sources such as soil, decaying vegetables, vegetal matter, silage, sewage, animal feed, fresh and processed meats, dairy products, slaughter-house waste and food processing plants [3, 22]. Listeriosis is recognized as a potential health threat because of its mortality rate, particularly in immune-suppressed patients, neonates, children, pregnant woman and elderly [16].

Since the majority of human listeriosis is caused by the consumption of contaminated food, alternative anti-*L. monocytogenes* strategies to control this pathogen in foods are of particular interest. The increased demand for safe and natural food, without chemical preservatives, has provoked researchers to investigate the antimicrobial efficacy of many natural compounds against some food-related pathogen microorganisms [13]. Concern over the

negative consumer perception to chemical preservatives prompts an increased interest in the antimicrobial properties of chitosan to be applied in food conservation [4, 8].

Chitosan is a cationic amino polysaccharide, common constituent of fungal cell walls, particularly the class of Zygomycetes, essentially composed of β - 1,4 D-glucosamine linked to N-acetyl-D-glucosamine residues. This polymer is traditionally obtained by chemically deacetylation crustacean chitin with strong alkali [5, 15]. In order to obtain chitosan of greater quality, filamentous fungi have been considered an attractive source for industrial applications [1, 2] since it can be carried out under standardized conditions in wide scale; by a simple and cheap process of extraction; provides simultaneous extraction of chitin and chitosan; and presents no proteins involved in human allergic reactions to shellfish [24].

This study aimed to evaluate the chitosan production by *Mucor rouxii* UCP 064 growing in the alternative yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) media, and also to investigate the efficacy of the obtained chitosan as anti-*L. monocytogenes* compound to be applied in foods.

Material and Methods

Microorganism and culture conditions

Mucor rouxii UCP 064 (Microorganism Culture Collection, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil) isolated from mangrove sediment (Rio Formoso, Pernambuco, Brazil) was assayed for chitosan production. The strain was kept at Potato Dextrose Agar slants at 4 °C. For chitosan production, spores were harvest of 7 days-old cultures grown on Potato Dextrose agar Petri dishes by adding sterile NaCl (0.85 g.100 mL⁻¹) on the media growth followed for gentle shaking for 30 s. Spores suspension was adjusted with sterile NaCl (0.85 g.100 mL⁻¹) to have approximately 10⁸ spores.mL⁻¹ using a hemocytometer.

Listeria monocytogenes ATCC 7644 (Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) was assayed as revealed strain. Stock culture was kept on Muller-Hinton agar slants at 4 °C. Inocula used in antimicrobial assays were obtained from overnight cultures grown on BHI broth at 37 °C. After incubation, bacterial cells were separated from the growth medium by centrifugation (10000 rpm, 10 min), washed three times in buffered KCl (0.05 M KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, pH 6.0) and resuspended in buffered KCl. Cell suspension was adjusted for a optical density at 600 nm of 1.5 providing a bacterial inocula of approximately 1.0×10^8 cfu.mL⁻¹.

Chitosan production

The production of chitosan was carried out by submerge cultivation in yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) media (protein 8.72; starch 40.9; glucose 11.4 g.L⁻¹; pH 7.0) prepared according to Stamford et al. (2007) . For this, 10 mL of *M. rouxii* UCP 064 spores suspension ($ca 10^8$ spores.mL⁻¹) was inoculated in Erlenmeyer flasks of 1000 mL containing 290mL of growth medium, followed for incubation at 28°C in an orbital shaker at 150 rpm for 96 hours. Mycelia were harvested, washed twice in distilled and deionized water, and submitted to lyophilization. Afterward, the obtained mass was maintained in a vacuum desiccator until constant weight. During the cultivation aliquots were collected every 24 hours for biomass, chitosan production, pH, glucose and total nitrogen determination.

Measure of biomass (g) was performed by a gravimetric procedure; glucose consumption (g.L⁻¹) was determined by an enzymatic colorimetric method (Labtest[®] Kit - Glucose oxidase); nitrogen consumption (g.L⁻¹) was found by a colorimetric method (Labtest[®] Kit for protein); pH was measured using a potentiometer (Digital Potentiometer Quimis Mod. 400 A). All assays were performed twice.

Chitosan extraction

The process of extraction involved deproteination with 2% w/v sodium hydroxide solution (30:1 v/w, 90°C, 2 h), separation of alkali-insoluble fraction (AIF) by centrifugation (4000 rpm, 15 min.), extraction of chitosan from AIF under reflux (10% v/v acetic acid 40:1 v/w, 60°C, 6 h), separation of crude chitin by centrifugation (4000 xg, 15 min.) and precipitation of chitosan from the extract at pH 9.0, adjusted with a 4 M NaOH solution. Crude chitin and chitosan were washed with distilled water, ethanol and acetone and air-dried at 20°C [10].

Obtained chitosan in a range of 10–0.06 mg.mL⁻¹ was assessed for anti-*L. monocytogenes* effect. Chitosan solutions were prepared in acetic acid (1 %) and adjusted to pH 5.8 using NaOH or HCl [21].

Determination of deacetylation degree (DD) and molecular weight (MW_v) of chitosan

DD of chitosan was determined using infrared spectroscopy, and an absorbance ratio (A %) calculated as follow: (A₁₆₅₅/A₃₄₅₀) x 100/1.3. For this, two milligrams of chitosan overnight dried at 60 °C under reduced pressure were mixed with 100 mg of KBr to provide 0.5 mm thick disks. The disks were dried for 24 h at 110 °C under reduced pressure. Infrared spectroscopy was recorded using a Bruker 66 Spectrometer and 100 mg KBr disks for reference. Intensity of maximum absorbance bands were found by the baseline method [19].

MW_v of chitosan was found by viscosity [20]. The viscosity of chitosan was determined using an AVS-350 viscosimeter (Schott-Geräte), type/capillary: Cannon-Fenske d_{inside}= 1.01mm, at 25C. After getting the intrinsic viscosity from tables K and a, were obtained for HAc/NaAc. K = 0.076, a = 0.76. The flow time was determined in seconds. Mark-Houwinks equation was used to find the average viscosimetric molecular weight in g.mol⁻¹.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration – MIC and Minimum Bactericidal Concentration – MBC

MIC and MFC of chitosan was found by macrodilution in broth. 5 mL of double strength BHI broth was inoculated with 1 mL of the bacterial inocula ($ca\ 10^8\text{ cfu.mL}^{-1}$). After that, 4 mL of the chitosan solution with proper concentration was added and followed by shaking for 30 s. The system was statically incubated for 24 hours at 35 ° C. MIC was defined as the lowest concentration of required to completely prevent visible bacterial growth. An aliquot (100 μL) of the tubes with no visible bacterial growth was subcultured on sterile Muller-Hinton agar at 35 °C for 48 h to determine if the inhibition was reversible or permanent. MBC was defined as the lowest concentration which no growth was noted on Muller-Hinton agar. Control flasks without chitosan were tested in the same way.

Time-kill assay

For analyzing 96-h time-kill curves chitosan was assayed at 5.0 and 2.5 mg.mL^{-1} . For this, 5mL of double strength BHI broth was inoculated with 1 mL of the bacterium suspension. After that, 4 mL of chitosan was added to obtain the final proper concentrations, and the culture statically incubated at 37 °C. Aliquots (100 μL) were taken at 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 h, serially diluted in sterile peptone water (0.1 % w/v) and spread-plated onto sterile Muller-Hinton agar. After 48 h of incubation at 37 °C, colonies were counted and the results were expressed in log of count forming unit per mL (CFU.mL^{-1}). Control flasks without chitosan were tested in the same way.

Statistical analysis

The data were analyzed for significance by the Student's t-test and chi-square test using STATISTICA program version 6.0 of Statsolt Inc., USA. All experiments were carried out in triplicate and the results are expressed as mean $\pm$ S.D

Results and discussion

Results of biomass, chitosan production, glucose and nitrogen consumption of *Mucor rouxii* UCP 064 grown in yam bean medium at 28°C are showed in Figure 1. Biomass production increased rapidly within 48 h, and reached a higher value (16.9g.L⁻¹), statistically significant (p=0.005), after 72 h. This value is higher than that reported by Synowiecki and Al-Khatteb [25] which found maximum amount of biomass (4 g.L⁻¹) of *Mucor rouxii* grown in yeast extract and glucose 2% medium after 48 h. Residual glucose and nitrogen in the growth media were 4.1 and 0.02 g.L⁻¹, respectively. Similar results were reported by Franco et al. [10] and Stamford et al. [24]. These authors suggests that the remaining glucose and nitrogen in the media could be related to nitrogenous compounds like secondary metabolites present at the metabolism of the last fungal growth, and the high amount of carbon sources in the medium.

During the growth of *M. rouxii* the pH of the medium drops to 5-4 in the first 48 h, and stayed near to 4 for the remainder times. pH values decreased during the exponential growth phase, probably, because the high glucose and starch concentration in yam bean medium resulting in a formation of pyruvic acid. The best yields of chitosan (mg per gram of dry mycelia biomass) were obtained with 48 hours of culture (62 mg.g⁻¹). Chitosan production stabilized after 48 hours. This result is in agreement with Stamford et al. [24] investigating the production of chitosan from *Cunninghamella elegans* in yam bean medium, where noted best yield of chitosan (66 mg.g⁻¹) with 48 hours of cultivation.

Chitosan obtained from *M. rouxii* grown on yam bean medium presented 85% DD and 2.60×10^4 g.mol⁻¹ of MW_v (data not showed). In general, DD of chitosan from fungi is in a range of 80 to 90 % [5, 11, 17]. The found molecular weight characterizes the assayed chitosan as having low molecular weight. Chitosan with a low molecular weight is reported to reduce the tensile strength and elongation of the chitosan membrane and increase its permeability [17].

MIC and MBC values of chitosan from *Mucor rouxii* UCP 064 grown in yam bean medium against *L. monocytogenes* ATCC 7664 were, respectively, 2.5 and 5.0 µg.mL⁻¹ (data not showed). Previous studies reported on the antimicrobial property of a variety of chitosan toward many pathogen and spoiling food-related microorganisms, including the bacteria *Staphylococcus aureus*, *E. coli* [26], *Salmonella tiphymurium* [6], and the fungi *Fusarium* and *Alternaria* [7]. The antimicrobial efficacy of chitosan depends on its molecular weight and methods used to convert chitin to chitosan because it could affect the characteristics of deacetylation and distribution at acetyl groups, chain length, and the conformation structure of chitosan molecule [4].

Kanatt et al. [12] states that most studies has noted MIC values of chitosan in a range of 0.1 - 10 mg.mL⁻¹ against a variety of food-related microorganisms. Even the MIC and MBC values of chitosan found in many studies are regarded high in comparison to other alternative antimicrobial compounds (e.g. essential oils, phenolics, bacteriocins) its broad spectrum of antimicrobial activity and low toxicity to mammalian cells makes it a promising antimicrobial compound to be applied in foods [18].

Kill-curves of *L. monocytogenes* ATCC 7644 when treated with chitosan from *Mucor rouxii* UCP 064 along 96 h is showed in Figure 2. At 2.5 mg.mL⁻¹ chitosan caused cidal effect (≥ 3 log₁₀ reduction in viable cells, i.e., ≥ 99.9 % kill rate) just after 4 h, compared to 2 h for concentration 5.0 mg.mL⁻¹. Values below 2 log cfu.mL⁻¹ were found at the remainder evaluated

times with no recovery in bacterial growth. Results from the kill-curves demonstrated a clear concentration and time-dependent bactericidal effect.

Although some researchers have reported antimicrobial property of commercial chitosan there has been a lack of data about the antimicrobial potential of chitosan from fungi. Fai [9] found MIC values of 1.25 mg.mL^{-1} for chitosan from *Mucor circinelloides* UCP 050 (MW_v $2.7 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, DD 83 %) against *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*, while MBC were two or four-folds higher. Stamford [23] noted MIC values of chitosan from *Cunninghamella elegans* UCP 542 (MW_v $4.02 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, DD 85 %) of 1.25 mg.mL^{-1} against *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis* and *S. oralis*.

Antimicrobial activities of chitosan are believed to originate from its polycationic nature, being hypothesized to be mediated by the electrostatic forces between the protonated amino group (NH_2) in chitosan and the negative residues at cell surfaces [4]. The cidal effect of chitosan toward *L. monocytogenes* is caused by the electrostatic interaction between NH_3^+ groups of chitosan and the negatively charged phosphoryl groups of phospholipid components of the cell membrane [14].

The results obtained in this study show the interesting antibacterial potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP 064, particularly, its anti-*L.monocytogenes* property. The chitosan studied here could become a promising compound to be added in food conservation systems to control *L. monocytogenes*. Moreover, the results of this study encourage further researches in our laboratory about the antimicrobial effect of the assayed chitosan in real food matrix and the interference of food components on its efficacy against a range of microorganism of interest in foods.

References

1. Amorim RVS, Ledingham WM, Fuskushima K, Campos-Takaki GM (2005) Screening of chitin deacetylase from *Mucor* strains (Zygomycetes) and its relationships to cell growth rate. J Ind Microbiol Biotechnol 32: 19-23
2. Amorim RVS, Pedrosa RP, Kazutaka F, Martínez CR, Ledingham WM, Campos-Takaki GM. (2006). Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. Food Technol Biotechnol 44: 519-523
3. Azevedo I, Regalo M, Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogg T, Gibbs P (2005) Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. Food Cont 16: 121–124
4. Beverlya RL, Janes ME, Prinyawiwatkula W, No HK (2008) Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol 25: 534-537
5. Chatterjee S, Adhya M, Guah AK, Chatterjee BP. (2005). Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. Process Biochem 40: 395-400
6. Chung YC, Su YA, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, Lin JG. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. Acta Pharmacologica Sinica 25: 932-936
7. Costa e Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI (2006) Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. Quim Nova 29: 776-785

8. Devlieghere F, Debevere AV (2004) Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruits and vegetables. *Food Microbiol* 21: 703-714
9. Fai AEC (2008) Potencial do efeito antibacteriano de quitosana extraída de *Mucor circinelloides* UCP 050: uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos. Msc dissertation. Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. 943p
10. Franco LO, Maia RCG, Porto AL, Messias AC, Fuskushima K, Campos-Takaki GM (2004) Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Braz J Microbiol* 35: 243-247
11. Franco LO, Stamford TCM, Stamford NP, Campos-Takaki GM. (2005). *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Revi Analyt* 14: 40-44
12. Kanatt S, Chander R, Sharma A (2008) Chitosan and mint mixture: a new perspective for meat and meat products. *Food Chem* 107: 845-852
13. Lin YT, Labbe RG, Shetty K (2005) Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemicals synergies and lactic acid. *Innovat Food Sci Technol* 6: 453-458
14. Liu J, Zhang J, Xia W (2004) Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem* 107: 419-425
15. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP (2002) Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 74: 65-72
16. Peccio A, Autio T, Korkeala H, Rosmini R, Trevisani M (2003) *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat producing plants. *Let Appl Microbiol* 37: 234-238

17. Pochanavanich P, Suntornsuk W. (2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Let Appl Microbiol* 35: 17–21
18. Rhoades J, Roller S (2000) Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *App Environ Microbiol* 66: 80-86
19. Roberts GAF (1992) *Chitin Chemistry*. London, McMillan Press
20. Santos JE, Soares JP, Dockal ER, Campana Filho SP, Cavaleiro ETG. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímero: Ciência e Tecnologia* 13(4): 242-249
21. Shigemasa Y, Minami S (1996) Application of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Gen Eng Rev* 17: 413-420
22. Souza VM, Franceschini SA, Martinez RCR, Ratti RP, de Martinis ECP (2008) Survey of *Listeria* spp. in matched clinical, food and refrigerator samples at home level in Brazil. *Food Cont* 19: 1011–1013
23. Stamford TC (2006) Produção, caracterização e atuação anticariogênica de quitosana extraída de *Cunninghamella elegans* UCP 542. PhD thesis. Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. 143p
24. Stamford TCM, Stamford TLM, Stamford NP, Barros Neto BB, Campos-Takaki GM (2007) Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electron J Botechnol* 10: 61-68
25. Synowiecki J, Al-Khatteb NAA. (1997) Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chem* 60: 605-610

26. Zheng LY, Zhu JF. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydr Polym 54: 527-530

Fig. 1 Curve of growth, chitosan production, glucose and nitrogen consumption of *Mucor rouxii* UCP 064 grown in yam bean medium at 28°C, 150 rpm, during 96 hrs of cultivation.

Fig. 2 Survivors curves for *L. monocytogenes* ATCC 7644 in Brain Heart Infusion Broth at 35 °C during as a function of chitosan concentration: (▲): control (0 mL.mL⁻¹); (◆): chitosan CIM (2.5 mg.mL⁻¹); (■): chitosan CBM (5.0 mg.mL⁻¹). The detection limit for viable cells was 2 log cfu.mL⁻¹. Where no cells were recovered, the detection limit is indicated

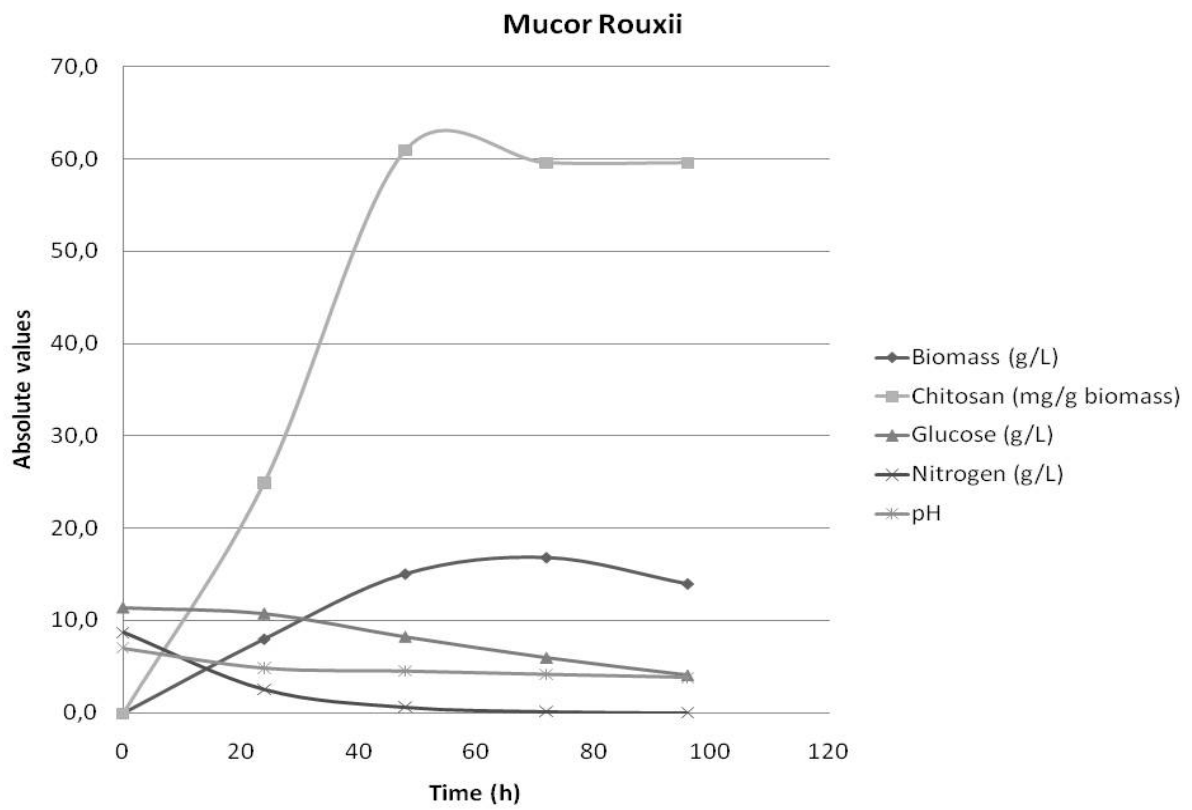


Fig. 1.

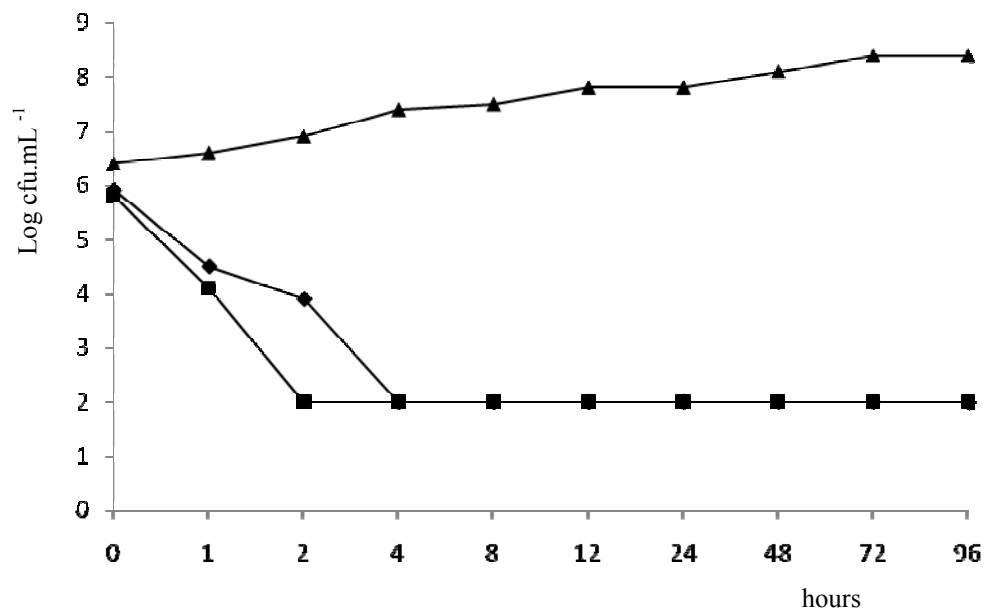


Fig. 2.

4.2 Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pâté by chitosan from *Mucor rouxii* UCP064

O segundo artigo deste estudo é intitulado: **“INHIBITION OF *Listeria monocytogenes* IN PÂTÉ BY CHITOSAN FROM *Mucor rouxii* UCP064”**. Foi submetido como artigo original à revista **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, a qual é classificada como qualis internacional A pela CAPES.

Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pâté by chitosan from *Mucor rouxii*

UCP064

Roberta A. Bento¹, Tânia L.M. Stamford¹, Galba M. de Campos-Takaki²,

Thayza C.M. Stamford³, Evandro L. de Souza⁴

¹ *Laboratory of Fermentation, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

² *Nucleus of Research in Environmental Sciences, Department of Chemistry, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil*

³ *Department of Physiology and Pathology, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

⁴ *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

Abstract

Chitosan has emerged as potential antimicrobial to inhibit the growth of spoiling and pathogen microorganisms in different foods. This study aimed to assess the efficacy of chitosan extracted from *Mucor rouxii* UCP064 in inhibiting the survival of *L. monocytogenes* in the ready-to-eat meat product pâté by 6 days time-kill curves. It was also to investigate the effect of pâté ingredients on its antilisterial effect by time-kill curves in different meat models. The addition of 5 mg.g⁻¹ of chitosan from *M. rouxii* significantly reduced ($p<0.01$) *L. monocytogenes* to 3 log₁₀ cfu.mL⁻¹ after 6 days at 4 °C. The application of chitosan in the eight assayed meat models resulted in a significant decrease ($p<0.01$) in the count of *L. monocytogenes* along refrigerated storage. Even noting a range of inhibition rate of *L. monocytogenes* among the different chitosan-treated models, it was not enough to mean a significant difference ($p>0.01$). Smallest counts after 6 days were found in whole bovine pâté,

ground meat and ground meat + eritorbate model, resulting in a decrease of 2.8, 2.4 and 2.9 log cfu.g⁻¹ of the initial inocula, respectively. From these results, antilisterial effect of chitosan from *M. rouxii* was not significantly limited by any components forming the tested meat models, and it could arise as a suitable compound to control the survival of *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products.

Key-words: Chitosan; *Mucor rouxii*; Antilisterial effect; Meat products; Food ingredients

Industrial relevance: chitosan is a polymer with a range of biological properties of interest in food conservation, which could contribute to improve the shelf life of different foods. Although, chitosan is traditionally obtained by chemically deacetylation crustacean chitin, its obtainment from biomass of moulds has emerged as attractive source for industrial applications in a wide scale. In this manuscript, we have found that chitosan from *Mucor rouxii* strongly inhibited the survival of *L. monocytogenes* in bovine pâté and other different meat models along refrigerated storage. Such a strategy could be used by food industry as natural barrier to control the survival of *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products.

1. Introduction

Listeria monocytogenes causes foodborne listeriosis, a disease that occurs largely in pregnant woman and the elderly leading to illness, miscarriages and death. *Listeria* contamination has also been responsible for the recall of millions of kilograms of food product and substantial economic loss to industry worldwide (Franklin, Cooksey & Getty, 2004; Nguyen, Gidley and Dykes, 2008). *L. monocytogenes* is a foodborne pathogen of particular concern in ready-to-eat meat products because of its ability to survive and grow at refrigeration temperatures (Ye, Neetoo and Chen, 2008). Moreover, it is thought to continue

being the number one target for control in ready-to-eat meat and poultry products in 21st century, considering its ubiquitous presence, potential to contaminate products after processing, and the ability to multiply even under cold temperatures (Sofos, 2008).

Research has indicated in recent years that there has been a continuous adaptation and development of resistance by pathogenic microorganisms to antibiotics and potentially to traditional food preservation barriers such as low pH, heat, cold temperatures, dryness or low water (Brull and Coote, 1999; Burt, 2004; Sofos, 2008). The special risk of listeriosis posed by consumption of ready-to-eat meat products has led to studies on risk assessments of these products and novel technologies to control this contamination (Cornu et al., 2006; Gibbons, Adesiyun, Seepersadsingh and Raham, 2006). One method could be the use of the antimicrobial chitosan, which has been proved to be nontoxic, biodegradable and biocompatible (Devlieghere and Debevere, 2004; Kathleen and Johnson, 2004).

Chitosan is a natural cationic amino polysaccharide essentially composed of β -1,4 D-glucosamine linked to N-acetyl-D-glucosamine residues traditionally obtained from crustacean shells (crabs, shrimp and crayfishes) either by chemical or microbiological (No, Park, Lee & Meyers, 2002). Although the main commercial source of chitosan is crustacean shells, recent researches have proposed that cultivation of selected fungi could provide an effective source of chitosan for industrial applications (Amorim, Ledingham, Fuskushima and Campos-Takaki, 2005; Stamford, Stamford, Stamford, Barros Neto and Campos-Takaki, 2007).

Chitosan has intrinsic antimicrobial activity and inhibits the growth of a wide variety of spoiling and/or pathogen food-related microorganisms (Zheng and Zu, 2003; Costa e Silva, Santos and Ferreira, 2006). The antimicrobial activity of chitosan will depend on several factors such as the kind of chitosan (deacetylation degree, molecular weight) used, the pH of the medium, the temperature, the presence of several food components, etc (Devlieghere et

al., 2004). Zivanovic, Chi and Draughon (2005) states that antimicrobial agents may be inactivated by some components of the food they are present in.

The majority of studies about the inhibitory effect of chitosan toward food-related microorganisms has been conducted in laboratory medium, consequently little is understood about its effectiveness when applied to food. This paper presents data about the efficacy of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 in inhibiting the survival of *L. monocytogenes* in a ready to eat meat product. To our knowledge there has been a lack of reports about the antimicrobial effect of chitosan from *M. rouxii* when applied in a food model.

2. Material and Methods

2.1 Microorganism and culture conditions

Mucor rouxii UCP 064 (Microorganism Culture Collection, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil) isolated from mangrove sediment (Rio Formoso, Pernambuco, Brazil) was assayed for chitosan production. The strain was kept at Potato Dextrose Agar slants at 4 °C. For chitosan production, spores were harvest of 7 days-old cultures grown on Potato Dextrose agar Petri dishes by adding sterile NaCl (0.85 g.100 mL⁻¹) on the media growth followed for gentle shaking for 30 s. Spores suspension was adjusted with sterile NaCl (0.85 g.100 mL⁻¹) to have approximately 10⁸ spores.mL⁻¹ using a hemocytometer.

Listeria monocytogenes ATCC 7644 (Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) was assayed as revealed strain. Stock culture was kept on Muller-Hinton agar slants at 4 °C. Inocula used in antimicrobial assays were obtained from overnight cultures grown on BHI broth at 37 °C. After incubation, bacterial cells were separated from the growth medium by centrifugation (10000 rpm, 10 min), washed three times in buffered KCl (0.05 M KCl, 1 mM KH₂PO₄, 1 Mm CaCl₂, 0.1 Mm

MgCl₂, pH 6.0) and resuspended in buffered KCl. Cell suspension was adjusted for a optical density at 600 nm of 1.5 providing a bacterial inocula of approximately 1.0×10^8 cfu.mL⁻¹.

2.2 Chitosan production

The production of chitosan was carried out by submerge cultivation in yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) media (protein 8.72; starch 40.9; glucose 11.4 g.L⁻¹; pH 7.0) prepared according to Stamford et al. (2007) . For this, 10 mL of *M. rouxii* UCP 064 spores suspension ($ca\ 10^8$ spores.mL⁻¹) was inoculated in Erlenmeyer flasks of 1000 mL containing 290 mL of growth medium, followed for incubation at 28 °C in an orbital shaker at 150 rpm for 96 h. Mycelia were harvested, washed twice in distilled and deionized water, and submitted to liophylization. Afterward, the obtained mass was maintained in a vacuum desiccator until constant weight.

2.3 Chitosan extraction

The extraction initially involved deproteination with 2 % sodium hydroxide solution (30:1 v/w, 90 °C, 2 h), separation of alkali-insoluble fraction – AIF by centrifugation (4000 rpm, 15 min), extraction of chitosan from AIF under reflux (10 % v/v acetic acid 40:1 v/w, 60 °C, 6 h), separation of chitin by centrifugation (4000 rpm, 15 min) and precipitation of chitosan from the extract at pH 9.0, adjusted with a 4 M NaOH solution. Obtained chitosan was washed with sterile distilled water, ethanol and acetone and air-dried at 20 °C (Franco et al., 2004). Obtained chitosan presented molecular weight of 2.60×10^4 g.mol⁻¹ and deacetylation degree of 85 % (not published data). Chitosan in powder form was stored at freezer temperature until use in antimicrobial assays.

2.4 Preparation of chitosan solution

Chitosan was dissolved in acetic acid ($1\text{ mL} \cdot 100\text{ mL}^{-1}$) at $20\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ on dry basis (Shigemasa and Minami, 1996).

2.5 Pâté samples

Pâtés samples were prepared using bovine steaks purchased from a local grocery store. Meat was ground and homogenized with NaCl $1.5\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ (Pirâmide Ltda., Areia Branca, Brazil); sodium nitrite $0.25\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ (Kienast & Kraischmer Ltda., Santo André, Brazil); antioxidant sodium eritorbate $0.25\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ (Kienast & Kraischmer Ltda., Santo André, Brazil); a mixture of pepper $0.02\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$, mustard $0.1\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ and ginger $0.05\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ purchased from a local market; dextrined starch $0.05\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ (Rhoister Ind. Com. Ltda., Vargem Grande, Brazil); sugar $0.08\text{ g} \cdot 100\text{ g}^{-1}$ (União, São Paulo, Brazil) and water $25\text{ mL} \cdot 100\text{ g}^{-1}$. A cutter (Sire, Super Cutter model, São Paulo, Brazil) was used for homogenizing this mixture. Aliquots of 50 g of the obtained pâté were aseptically put into a sterile capped glass flasks and heated at 121°C for 15 min. Afterward the flasks were cooled to room temperature and stored at 4°C for no more than 24 h prior the chitosan treatment. Control flasks without chitosan were tested in the same way.

2.6 Treatment of pâté samples with chitosan

The content of pâté of each flask (50 g) was aseptically transferred to sterile polypropylene bags and added of the chitosan solution to achieve final concentration of $5\text{ mg chitosan} \cdot \text{g} \text{pâté}^{-1}$. The mixture was inoculated with 1 mL of bacterium inoculum. The inoculum was mixed thoroughly with pâté by gently squeezing the bags by hand for 10 min. The samples were refrigerated at 4°C . Bacterial counts determined at 0, 1, 2, 4 and 6 days were obtained by

taking an aliquot of the system, diluting (1:10) in phosphate buffer saline (PBS), stomaching for 5 min, making serial dilutions (10^{-2} – 10^{-5}) in PBS and plating onto Selective *Listeria* agar with a selective supplement (ceftazidime: 10.00; nalidixic acid: 10.00 mg.L⁻¹). The plates were incubated at 35 °C for 48 h and the colony counts expressed as Log cfu.g⁻¹. Initial experiments of inoculating Selective *Listeria* agar with a selective supplement (ceftazidime: 10.00 mg; nalidixic acid: 10.00 mg.L⁻¹) with pâté diluted 1 in 10 with PBS and incubating at 37 °C for 48 h showed no contamination of either product.

2.7 Influence of pâté ingredients

To estimate the influence of the different pâté ingredients on the antilisterial effect of chitosan, the growth of *L. monocytogenes* ATCC 7644 was followed at 4 °C in eight different models: i) ground bovine meat (100 g); ii) ground bovine meat (50 g) + sugar (0.08 g.100g⁻¹); iii) ground bovine meat (50 g) + mixture of spices (0.02 g.100g⁻¹ of pepper; 0.1 g.100g⁻¹ of mustard; 0.05 g.100g⁻¹ of ginger); iv) ground bovine meat (50 g) + sodium nitrite (0.25 g.100g⁻¹); v) ground bovine meat (50 g) + eritorbate (0.25 g.100g⁻¹); vi) ground bovine meat (50 g) + dextrined starch (0.05 g.100g⁻¹); vii) ground bovine meat (50 g) + food grade salt (1.5 g.100g⁻¹) and viii) whole bovine pâté. All ingredients forming the models were previously autoclaved, put into sterile polypropylene bags, added of the chitosan solution (5 mg chitosan.g pâté⁻¹) and of 1 mL of the bacterial inoculum, and followed for gently squeezing by hand for 10 min. At 0, 1, 2, 4 and 6 days an aliquot of each model was serially diluted (10^{-1} – 10^{-5}) in PBS and plated onto Selective *Listeria* agar with a selective supplement (ceftazidime: 10.00; nalidixic acid: 10.00 mg.L⁻¹). The plates were incubated at 35 °C for 48 h and the colony counts expressed as Log cfu.g⁻¹. Control assays without chitosan were tested in the same way.

2.8 Reproducibility and statistics

All assays were made in triplicate on two separate occasions, and the results were expressed as average of the assays. Student t-test and Tukey test were used to determine statistical significance at $p < 0.01$. For this the Sigma Stat 2.03 program was used.

3. Results and discussion

The data presented here show the potential of chitosan from *M. rouxii* UCP 064 as natural inhibitor of *L. monocytogenes* ATCC 7644 in the ready-to-eat meat product pâté. Regarding the problem of *L. monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat meat products the assayed chitosan appeared to inhibit the survival of *L. monocytogenes* in pâté in a time exposure-depend manner. The addition of 5 mg.g⁻¹ of chitosan reduced *L. monocytogenes* to 3 log₁₀ cfu.mL⁻¹ along 6 days at 4 °C (Figure 1). Along the evaluated intervals chitosan-treated pâté showed a significantly lower ($p < 0.01$) bacterial count in respect to the control assay.

Beverly, Janes, Prinyawiwatkula and No (2008) noted that the use of 1 % (w/v) of commercial low molecular weight chitosan as an edible film on ready-to-eat roast beef cubes were effective in reducing *L. monocytogenes* counts along 28 days. Chi, Zivanovic and Penfield (2006) found that chitosan films enriched with oregano essential oil reduced *L. monocytogenes* by 3.6 to 4.0 log₁₀ in bologna slices in comparison to 3 log₁₀ by pure chitosan film. Juneja, Thippareddi, Bari, Inatsu, Kawamoto and Friedman (2006) reported that adding chitosan (3 %, w/w) in bovine and turkey meat provided an inhibition of germination of *Clostridium perfringens* during the cold (54.5 to 7.2 °C) for 18 h. In addition to the antimicrobial effect, some studies have noted an interesting antioxidant property of chitosan when applied in/on different meat products (Shahidi, Arachchi, and Jeon, 1999; Kanatt, Chander and Sharma 2008).

Previous experiments showed that chitosan here studied at 5 mg.mL⁻¹ was able to decrease the count of *L. monocytogenes* to < 2 log cfu.mL⁻¹ in nutrient broth after 2 h, with no recovery in bacterial growth up to 96 h (not published data). Apart the polymerization, molecular weight and deacetylation degree (Bautista-Baños et al., 2006), the antimicrobial efficacy of chitosan appears to be very dependent on the components of the food matrix and combinations of food preservative procedures (Ouattara, Sabato and Lacroix, 2001). Burt (2004) states that interaction among antimicrobials and food components could be responsible for different results found in *in vitro* assays and food models. Previous studies found that food components, mainly fat and proteins, could provided a protection of the microorganism in the food matrix, resulting in decreased antimicrobial efficacy of classical and alternative food preservatives (Juven, Kanner, Schved and Weisslowicz, 1994; Kathleen and Johnson, 2004). Moreover, it is suggested that the greater availability of nutrients in foods compared to laboratory media may enable bacteria to repair damaged cells faster (Gill, Delaquis, Russo and Holley, 2002).

In this study seven different model substrates were prepared to assess and quantify the effect of pâté components on the antimicrobial efficacy of chitosan from *M. rouxii* UCP064 against *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Figure 2). According to the obtained results, the use of chitosan (5 mg.g⁻¹) in all assayed meat models resulted in a significant decrease ($p<0.01$) in the viable count of *L. monocytogenes* along storage for 6 days at 4 °C, in comparison to the control assays. Although some authors have reported that chitosan generally presents a stronger inhibitory effect toward Gram-positive bacteria in comparison to Gram-negative ones, *L. monocytogenes* was able to grow in the presence of chitosan regardless of the meat model.

The counts of *L. monocytogens* ATCC 7644 in the eight different meat models treated with chitosan from *M. rouxii* UCP 064 are showed in Figure 3. Although a range extent of

inhibition of *L. monocytogenes* among the different chitosan-treated meat models was noted, it was not enough to mean a significant difference ($p>0.01$).

Among the chitosan-treated models (Figure 3) the smallest counts after 6 days of storage were found in whole bovine pâté (3.7 log cfu.g⁻¹), ground meat (3.7 log cfu.g⁻¹) and ground meat + eritorbate (3.5 log cfu.g⁻¹) model, resulting in a decrease of 2.8, 2.4 and 2.9 log cfu.g⁻¹ of the initial inocula. On the other hand, this decrease was between 1.6 and 2.0 log cfu.g⁻¹ in the other models (data not showed). Higher counts of *L. monocytogenes* after 96 h were found in meat + sugar (4.6 log cfu.g⁻¹), meat + sodium nitrite (4.5 log cfu.g⁻¹) and meat + whey starch (4.5 log cfu.g⁻¹) models.

Biscola (2007) reported that sodium eritorbate was the compound that less affected the anti-*L. monocytogenes* activity of the combined application of nisin and oregano essential oil in a like-fresh pork sausage model in comparison to sugar, NaCl, spices, nitrite and sodium nitrate, and the emulsifying sodium tri-polyphosphate. Roller et al. (2002) noted that chitosan, in combination with sulphites, reduced lactic acid bacteria by 1–2 log cfu.g⁻¹ in fresh pork sausages after 24 h of refrigerated storage. Comma, Martial-Gros, Garreau, Salin and Deschamps (2002) observed that *L. monocytogenes* was able to grow on chitosan film coated-cheese regardless the chitosan treatment. These finding were thought to be possibly related to the decrease of the antimicrobial activity of chitosan films over time due to the low availability of amino groups on chitosan.

In ground meat + NaCl model the count of *L. monocytogenes* after 6 days of storage was 4.3 log cfu.g⁻¹. Devlieghere and Debevere (2004) noted that 1% NaCl was already enough to low the antimicrobial effect of chitosan toward *Candida lambica*. According to these authors adding NaCl to the medium diminished the antimicrobial activity of chitosan because of its interference with the electrostatic forces between chitosan and the microbial surface. On one hand the Cl⁻ ions can neutralize the positive charges on the chitosan, while on

the other hand the Na⁺-ions can compete with chitosan for the negative charges on the microbial cell surface. This study also found that high concentrations of starch (30% (w/v)) provided lowered antimicrobial activity of chitosan. These findings are in disagreement to the general observation that carbohydrates in foods do not protect bacteria from the action of antimicrobials.

Counts of *L. monocytogenes* in meat ground + spices models were always around 4 log cycles from 2 days of storage on. Early researchers reported an enhanced antimicrobial effect of chitosan when applied in combination with rosemary extract in pork sausage (Georgantelis, Ambrosiadis, Katikou, Blekas and Georgakis, 2007), with mint extract in pork cocktail salami (Kanatt et al., 2008), and with oregano essential oil in bologna sausage (Chi et al., 2006), suggesting a possible synergistic effect.

Antimicrobial activities of chitosan are believed to originate from its polycationic nature, being hypothesized to be mediated by the electrostatic forces between the protonated amino group (NH₂) in chitosan and the negative residues at cell surfaces (Berverly et al., 2008). The cidal effect of chitosan toward *L. monocytogenes* is caused by the electrostatic interaction between NH₃⁺ groups of chitosan and the negatively charged phosphoryl groups of phospholipid components of the cell membrane (Liu, Zhang and Xia, 2004).

According our results chitosan from *M. rouxii* has proven to be a suitable alternative to control the growth and survival of *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products, particularly in bovine meat pâté. Also, our experiments showed that the antilisterial effect of the assayed chitosan was no significantly limited to any components forming the assayed meat models. Use of chitosan from fungi in ready-to-eat meat products could be well suited to improving shelf life and safety of them, as well as to attend the demand of the consumers regarding the decreased use of chemical preservatives in food conservation.

References

- Amorim R.V.S., Ledingham, W.M., Fuskushima, K., & Campos-Takaki, G.M. (2005). Screening of chitin deacetylase from *Mucor* strains (Zygomycetes) and its relationships to cell growth rate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 19-23.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velásques-del Vale, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina E., & Wilson, C.L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25, 108-118.
- Beverly, R.L., Janes, M.E., Prinyawiwatkula, W., & No, H.K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25, 534-537.
- Biscola, V. (2007). Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos. Msc. Dissertation. University of São Paulo, Brazil.
- Brull, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-17.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Chi, S., Zivanovic, S., & Penfield, M.P. (2006). Application of chitosan film enriched with oregano essential oil on bologna – active compounds and sensory attributes. *Food Science and Technology International*, 12, 111-117.
- Comma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67, 1162–1169.

- Cornu, M., Beaufort, A., Rudelle, S., Laloux, L., Bergis, H., Miconnet, N., Serot, T., & Delignette-Muller, M.L. (2006). Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 159 – 168.
- Costa e Silva, H.S.R., Santos, K.S.C.R., & Ferreira, E.I. (2006). Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29, 776-785.
- Devlieghere, F., & Debevere, A.V. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruits and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.
- Franklin, N.B., Cooksey, K.D., & Getty, K.J.K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the surface of individually packaged hot dogs with a packaging film coating containing nisin. *Journal of Food Protection*, 67, 480–485.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76, 172–181.
- Gibbons, I., Adesiyun, A., Seepersadsingh, N., & Raham, S. (2006). Investigation for possible source(s) of contamination of ready-to-eat meat products with *Listeria* spp. and other pathogens in a meat processing plant in Trinidad. *Food Microbiology*, 23, 359–366.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R.A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83–92.
- Juneja, V.K., Thippareddi, H., Bari, L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., & Friedman, M. (2006). Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling. *Journal of Food Science*, 71, 236-240.

- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626–631.
- Kanatt, S., Chander, R., Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: a new perspective for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107, 845-852.
- Kathleen, A.G., & Johnson, E.A. (2004). Antagonistic effect of fat on the antibotulinial activity of food preservatives and fatty acids. *Food Microbiology*, 21, 675-682.
- Liu, J., Zhang, J., & Xia, W. (2004). Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, 107, 419-425.
- Nguyen, V.T., Gidley, M.J., Dykes, G.A. (2008). Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiology*, 25, 471–478.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., & Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.
- Ouattara, B., Sabato, S.B., & Lacroix, M. (2001). Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life of pre-cooked shrimp (*Pnaeus* spp.). *International Journal of Food Microbiology*, 68, 1-9.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M., & Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science*, 62, 165–177.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37–51.

- Shigemasa, Y., Minami, S. (1996). Application of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology, Genetic and Engineering Reviews*, 17, 413-420.
- Sofos, J.N. 2008. Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science*, 78: 3–13.
- Stamford, T.C.M., Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Barros Neto, B.B., & Campos-Takaki, G.M. (2007). Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 61-68.
- Ye, M., Neetoo, H., Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, 25, 260–268.
- Zheng, L.Y., & Zhu, J.F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrates Polymers*, 54, 527-530.
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70, 45-51.

Fig. 1. Survivors curves for *L. monocytogenes* ATCC 7644 pâté added of chitosan (5 mg chitosan.g⁻¹) from *M. rouxii* UCP 064 as a function of time of exposure. (◆) control (0 mg.chitosan.g⁻¹); (■) 5 mg chitosan.g⁻¹.

Fig. 2. Survivors curves for *L. monocytogenes* ATCC 7644 in meat models with and without chitosan from *M. rouxii* UCP 064 as a function of the time of exposure: a) ground bovine steak; b) ground bovine steaks + sugar; c) ground bovine steaks + spices; d) ground bovine steaks + sodium nitrite; e) ground bovine steaks + eritorbate; f) ground bovine steaks + whey starch; and g) ground bovine steaks + food grade salt. (◆) control (0 mg.chitosan.g⁻¹); (■) 5 mg chitosan.g⁻¹.

Fig. 3. Counts of *L. monocytogenes* ATCC 7644 in different meat models added of chitosan (5 mg.g⁻¹) from *M. rouxii* UCP 064 at 4 °C as a function of the time of exposure: i) ground bovine meat; ii) ground bovine meat + sugar; iii) ground bovine meat + spices; iv) ground bovine meat + sodium nitrite; v) ground bovine meat + eritorbate; vi) ground bovine meat + whey starch; vii) ground bovine meat + food grade salt; and viii) bovine pâté. (□) day 0; (■) day 1; (□) day 2; (■) day 4; (■) day 6.

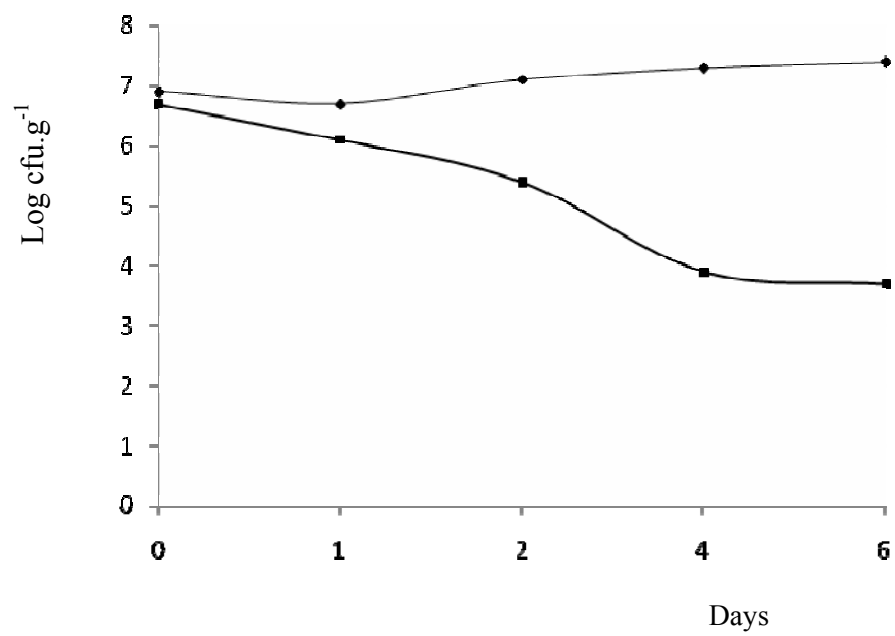


Fig. 1.

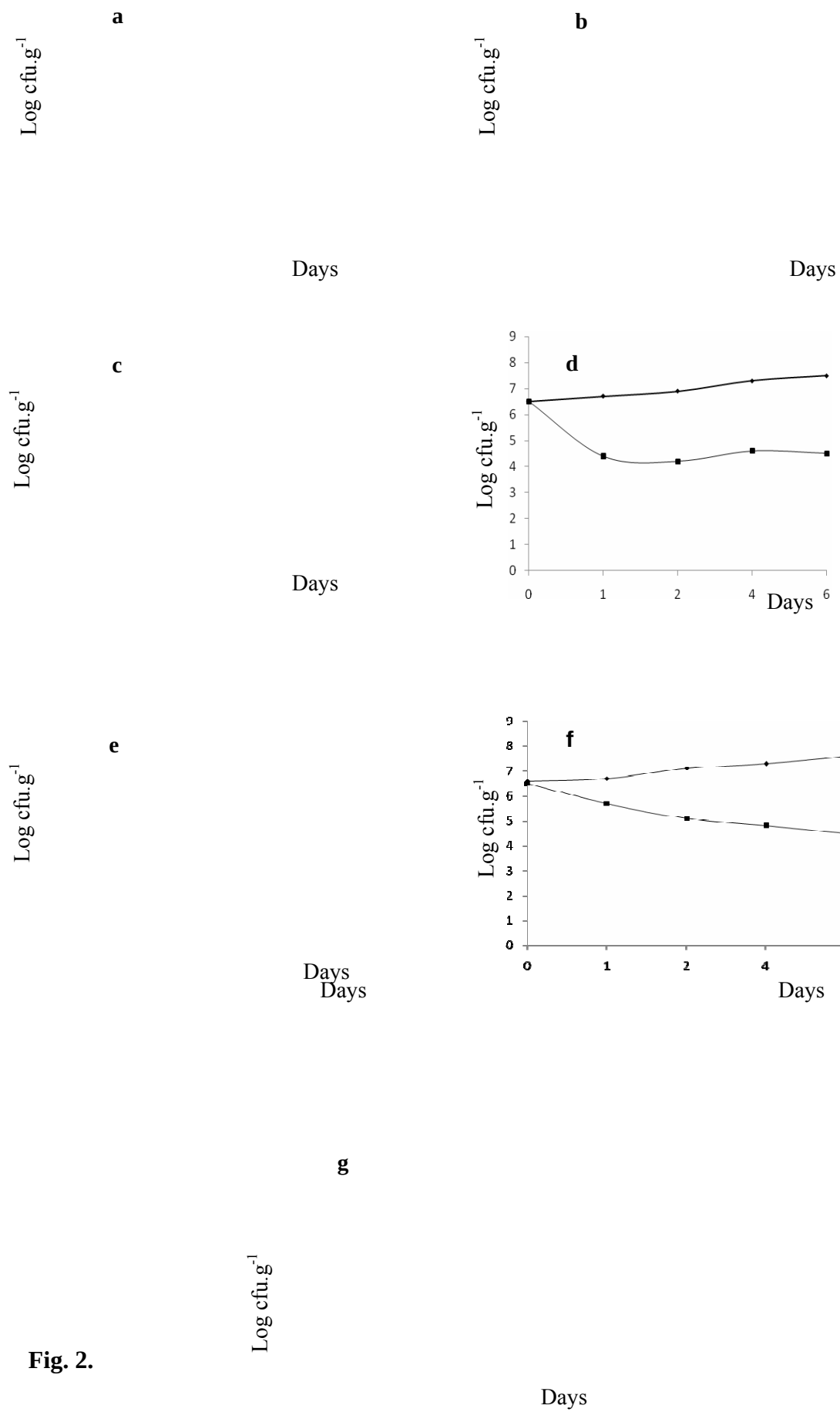


Fig. 2.

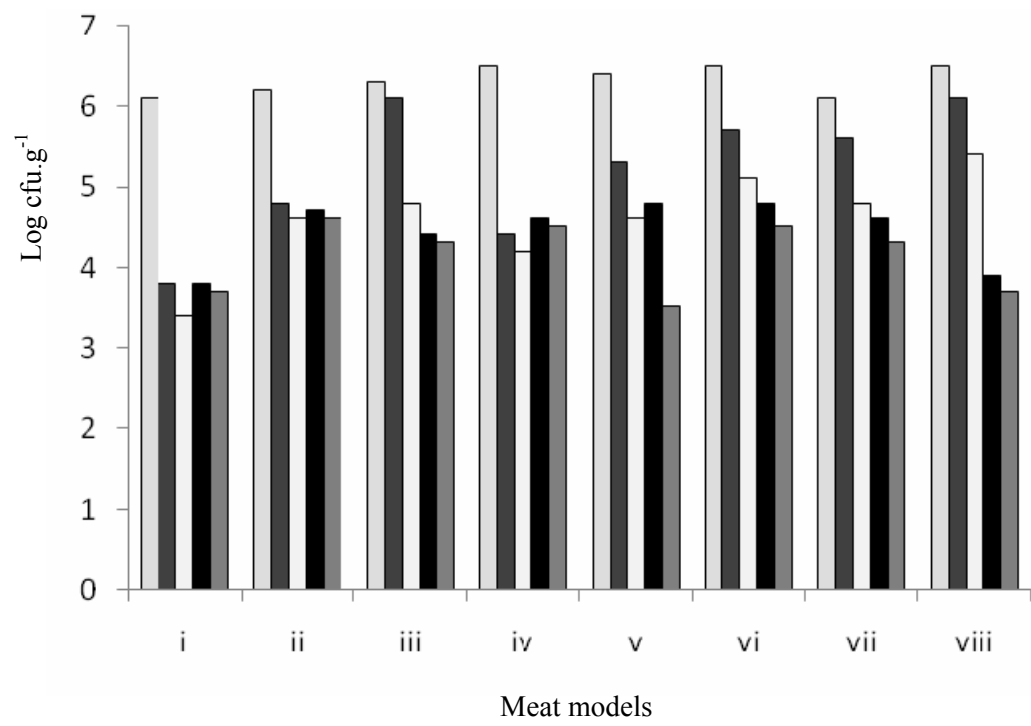


Fig. 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a produção do biopolímero quitosana através de *Mucor rouxii*, podendo ser considerado como uma alternativa viável para extração de quitosana fúngica. A quitosana de *Mucor rouxii* mostrou-se efetiva na inibição e eliminação de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), similar aos valores encontrados para os fungos da mesma Ordem Mucorales. Nos ensaios com produto cárneo, apesar de comprovada eficácia do antibacteriano, a atividade não foi influenciada significativamente pelos componentes da matriz alimentar. Dessa forma, podemos concluir que tal estudo contribuiu de forma significativa não somente para comunidade científica, mas também para as indústrias de produtos cárneos, uma vez que o importante achado da utilização de quitosana sob *Listeria monocytogenes*, pode auxiliar no controle deste patógeno emergente.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- AMORIM, R. V. S.; PEDROSA, R. P.; KAZUTAKA, F.; MARTÍNEZ, C. R.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, p. 519-523, 2006.
- BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.1000-1005, 2001.
- BORDERÍAS, A. J.; SÁNCHEZ-ALONZO, I.; PÉREZ-MATEOS, M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 10, p. 458-465, 2005.
- BORGOGNI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 502-508, 2006.
- CHAMBREVIL, G.; MARMORIER, A. A. **Contrôle de la thérapeutique antibiotique**. In: Bactériologie médicale. Carbonnelle, B.; Denis, F.; Mormorier, A.; Pinon, G.; Vargues, R. auteurs. Paris: SIMEP, 1987.
- COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas**, 2ª edição, Artmed, Porto Alegre, 2006.

- LI, Y.; CHEN, X. G.; LIU, N.; LIU, C. S.; LIU, C. G.; MENG, X. H.; YU, L. J.; KENEDY, J. F. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. **Carbohydrate Polymer**, v. 67, n. 2, p. 227-232, 2007.
- MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B. & ANDRADE, S. A. C. Níveis de Nitrito e Nitrato em salsichas comercializadas na Região Metropolitana do Recife. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.390, 2004.
- KASNOWSKI, M. C. *Listeria ssp., Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. 111p. 2004. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, Brasil.
- SILVA, J. G.; MORAIS H. A.; JUNQUEIRA, R. G.; OLIVEIRA, A. L.; SILVESTRE, M. P. C. Avaliação da estabilidade e da qualidade do patê de presunto, adicionado de globina bovina e de caseinato de sódio, como agente emulsificante. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.1, p.390, 2003.
- SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Application of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnol Gen Eng Rev**, v. 17, p. 413-420, 1996.
- SANO, H.; SHIBASAKI, K.; MATSUKUBO, T.; TARAESU, Y. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 44, n. 1, p. 9-16, 2003.
- SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímero: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SOUZA, E. L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos.** 134p. 2006.

Tese de Doutorado em Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electron J Botechnol**, v. 10, p. 61-68, 2007.

SYNOWIECKI, J. & AL-KHATTED, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v.60, n.4, p.605, 1997.

ANEXOS

A - SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Roberta Albuquerque Bento (robertabentonutricionista@hotmail.com)

Painel do Autor

[Iniciar nova submissão](#)

[Alterar meu cadastro](#)

[Alterar minha senha](#)

[Sair \(Logout\)](#)

Submissão de Trabalhos para:
Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia

Submissões Pendentes

Código	Título trabalho	Criada em	Ações

Submissões Completas

Código	Título trabalho	Enviada em	Situação
0327	PERSPECTIVAS E POTENCIAL APLICAÇÃO DE QUITOSANA COMO AGENTE INIBIDOR DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM PRODUTOS CARNEOS	04/08/2008	Submetido

www.aissystems.com.br

Angela da Cunha e Souza
Oficial de Registro - Tabela
do 2º Distrito de Jalcato
Prazeres - Estado de Pernambuco

11 AGO 2008

TRIBUNAL DE JUSTIÇA DE PERNAMBUCO
Selo de Autenticidade
e Fiscalização

ANEXO DE
AUTENTICAÇÃO
AWX008189

Manuscript Central Pág. 1

Current Microbiology  Springer

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

 **ScholarONE**
Manuscript Central

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged in as Evandro Souza

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Current Microbiology*.

Manuscript ID:	CM-08-07-0535
Title:	Potential of chitosan from <i>Mucor rouxii</i> UCP064 as alternative natural compound to inhibit <i>Listeria monocytogenes</i> in foods
Authors:	Bento, Roberta Stamford, Tânia Campos-Takaki, Galba Stamford, Thayza Souza, Evandro
Date Submitted:	31-Jul-2008

 Print  Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.10 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)

Elsevier Editorial System(tm) for Innovative Food

Science and Emerging Technologies

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pâté by chitosan from *Mucor rouxii*

UCP064

Article Type: Research Article

Keywords: Chitosan; *Mucor rouxii*; Antilisterial effect; Meat products; Food ingredients

Corresponding Author: Professor Evandro Souza, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Paraíba

First Author: Roberta A Bento, Ph.D.

Order of Authors: Roberta A Bento, Ph.D.; Tânia L Stamford, Ph.D.; Galba M Campos-Takaki, Ph.D.; Thayza C Stamford, Ph.D.; Evandro Souza, Ph.D.

Abstract: Chitosan has emerged as potential antimicrobial to inhibit the growth of spoiling and pathogen microorganisms in different foods. This study aimed to assess the efficacy of chitosan extracted from *Mucor rouxii* UCP064 in inhibiting

the survival of *L. monocytogenes* in the ready-to-eat meat product pâté by 6 days

time-kill curves. It was also to investigate the effect of pâté ingredients on its antilisterial effect by time-kill curves in different meat models. The addition of 5 mg.g⁻¹ of chitosan from *M. rouxii* significantly reduced ($p < 0.01$) *L. monocytogenes* to 3 log₁₀ cfu.mL⁻¹ after 6 days at 4 °C. The application of chitosan in the eight assayed meat models resulted in a significant decrease ($p < 0.01$) in the count of *L. monocytogenes* along refrigerated storage. Even noting a range of inhibition rate of *L. monocytogenes* among the different chitosan-treated models, it was not enough to mean a significant difference ($p > 0.01$). Smallest counts after 6 days were found in whole bovine pâté, ground meat and ground meat + eritorbate model, resulting in a decrease of 2.8, 2.4 and 2.9 log cfu.g⁻¹ of the initial inocula, respectively.

From these results, antilisterial effect of chitosan from *M. rouxii* was not significantly limited by any components forming the tested meat models, and it could arise as a suitable compound to control the survival of *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products.

Industrial relevance: chitosan is a polymer with a range of biological properties of interest in food conservation, which could contribute to improve the shelf life of different foods. Although, chitosan is traditionally obtained by chemically deacetylation crustacean chitin, its obtainment from biomass of moulds has emerged as attractive source for industrial applications in a wide scale. In this manuscript, we have found that chitosan from *Mucor rouxii* strongly inhibited the survival of *L. monocytogenes* in bovine pâté and other different meat models along refrigerated storage. Such a strategy could be used by food industry as natural barrier to control the survival of *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products.

B – ENVIO DE RESUMO PARA CONGRESSO - SBCTA

EFICÁCIA DE QUITOSANA PRODUZIDA POR *Mucor rouxii* UCP064 NA INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

ROBERTA ALBUQUERQUE BENTO* (conutri@msn.com); Tânia L.M. STAMFORD (tlmstamford@yahoo.com.br)*; Galba M. de CAMPOS-TAKAKI** (takaki@unicape.br);
³Erilane de Castro Lima MACHADO* (erilane@ig.com.br); Thayza C.M. STAMFORD*** (thayzastamford@yahoo.com.br); Evandro L. SOUZA*** (evandroleitesouza@ccs.ufpb.br)
*Laboratório de Fermentação, Depto. de Nutrição, UFPE, Av. Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife, PE, 50732-970; **Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife, PE, 50050-900; ***Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, 58051-900.

RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia da quitosana extraída de *Mucor rouxii* UCP 064 crescido em meio milhocina na inibição de *L. monocytogenes* ATCC 7664 através da determinação dos valores de CIM e CBM, e avaliação da cinética de morte bacteriana. A quitosana ensaiada apresentou valores de CIM e CBM de 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹, respectivamente. Nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹, a quitosana ensaiada causou um efeito bactericida, após 4 horas e 2 horas, respectivamente. Valores de contagem inferiores a 2 log ufc.mL⁻¹ foram encontrados nos demais tempos posteriores avaliados. Os resultados obtidos no presente estudo mostram um interessante potencial antibacteriano da quitosana extraída de *Mucor rouxii* UCP 064, particularmente sua propriedade anti-*L.monocytogenes*.

Palavras-chave: quitosana, *Mucor rouxii*, *Listeria monocytogenes*, efeito antimicrobiano.

1 – INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes apresenta-se amplamente distribuída na natureza, e tem sido freqüentemente isolada de amostras de solo, vegetais em deterioração, água, esgotos, ração animal, carnes frescas e processadas, produtos lácteos e de ambientes de produção de alimentos (Souza et al., 2008). A listeriose é reconhecida pela potencial ameaça a saúde humana em decorrência da sua alta taxa de mortalidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, neonatos, crianças, mulheres grávidas, e pessoas idosas (Azevedo et al., 2005). Considerando-se que a maioria dos casos de listeriose humana está relacionada ao consumo de alimentos contaminados, o estudo de procedimentos alternativos para controlar a sobrevivência de *L. monocytogenes* em alimentos torna-se de particular interesse.

³ Erilane de Castro Lima Machado, Av. Eng. Domingos Ferreira, 3965, Apto 904, Ed. Cerejeira, Recife, PE, CEP: 51021-040.

Este estudo teve como objetivo avaliar a potencialidade da quitosana extraída de *Mucor rouxii* UCP064 como composto antimicrobiano natural para inibição do crescimento e sobrevivência de *L. monocytogenes* em alimentos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

A produção de quitosana por *Mucor rouxii* UCP foi realizada através de cultivo submerso em meio milhocina por 96 horas, sendo que a sua extração foi realizada de acordo com Franco et al. (2004). Soluções de quitosana foram preparadas em ácidos acético 1 % (pH 5.8) (Shigemasa e Minami, 1996). A cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (inóculo de $1,0 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹) foi utilizada como cepa reveladora de atividade antimicrobiana. Os ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana fúngica, bem como da cinética de morte bacteriana (0-96 horas) foram realizadas através da técnica de macrodiluição em caldo.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de CIM e CBM da quitosana extraída de *Mucor rouxii* UCP 064 crescido em meio milhocina contra *L. monocytogenes* ATCC 7664 foram, respectivamente, 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1 – CIM e CBM de quitosana extraída de *Mucor rouxii* UCP 064 contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Ensaio	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)	Viabilidade da cepa *
I	2,5	5,0	+
II	2,5	5,0	+
III	2,5	5,0	+

* capacidade de *L. monocytogenes* ATCC 7644 de crescer em caldo BHI sem adição de quitosana

O efeito de diferentes concentrações de quitosana de *Mucor rouxii* UCP 064 sobre a viabilidade celular de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ao longo de 96 horas é mostrado na Figura 1. Em ambas as concentrações ensaiadas, a quitosana fúngica diminuiu a viabilidade celular bacteriana em comparação ao ensaio controle. Na concentração de 2,5 mg.mL⁻¹ a quitosana causou um efeito bactericida (redução $\geq 3 \log_{10}$ na contagem de células viáveis, i.e., taxa de morte ≥ 99.9 %) após 4 horas de exposição, em comparação a 2 horas para a concentração de 5,0 mg.mL⁻¹. Valores de contagem inferiores a 2 log ufc.mL⁻¹ foram encontrados nos demais tempos posteriores avaliados. Os resultados da curva de morte

evidenciaram um efeito bactericida dependente do tempo de exposição e da concentração de quitosana ensaiada.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram um interessante potencial antibacteriano da quitosana extraída de *Mucor rouxii* UCP 064, particularmente, sua propriedade anti-*L.monocytogenes*. A quitosana de origem fúngica poderia tornar-se um promissor agente antimicrobiano para aplicação em sistemas de conservação de alimentos com o objetivo de controlar o crescimento e sobrevivência de *L. monocytogenes*.

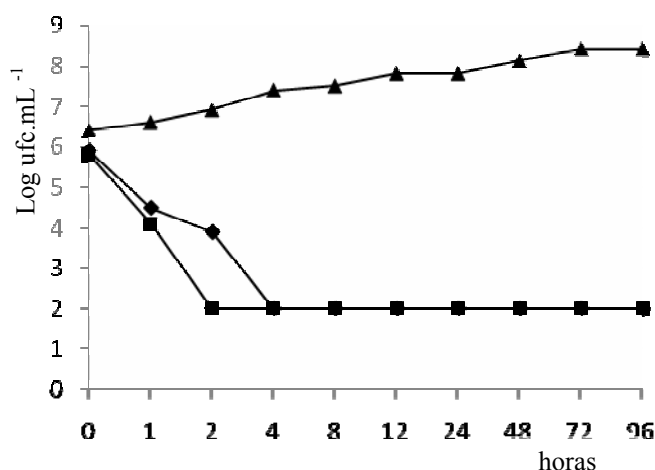


Figura 1. Curva de morte de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em caldo BHI a 35 °C em função da concentração de quitosana: (▲): controle (0 mg.mL⁻¹); (◆): quitosana CIM (2,5 mg.mL⁻¹); (■): quitosana CBM (5,0 mg.mL⁻¹). O limite de detecção do teste para células viáveis foi 2 log ufc.mL⁻¹. Quando nenhuma célula viável foi detectada, o limite de detecção foi indicado como a contagem obtida.

REFERÊNCIAS

- SOUZA, V.M.; FRANCESCHINI, S.A.; MARTINEZ, R.C.R.; RATTI, R.P.; DE MARTINIS, E.C.P. Survey of *Listeria* spp. in matched clinical, food and refrigerator samples at home level in Brazil. *Food Control*, 19, 1011–1013, 2008.
- FRANCO, L.O.; MAIA, R.C.G.; PORTO, A.L.; MESSIAS, A.C.; FUSKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 243-247, 2004.
- SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Application of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology Genetic and Engineering Review*, 17, 413-420, 1996.
- AZEVEDO, I.; REGALO, M.; MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*, 16: 121–124, 2005.

BEM-estar

Light ■ Diet ■ Vegetariano

QUITOSANA:

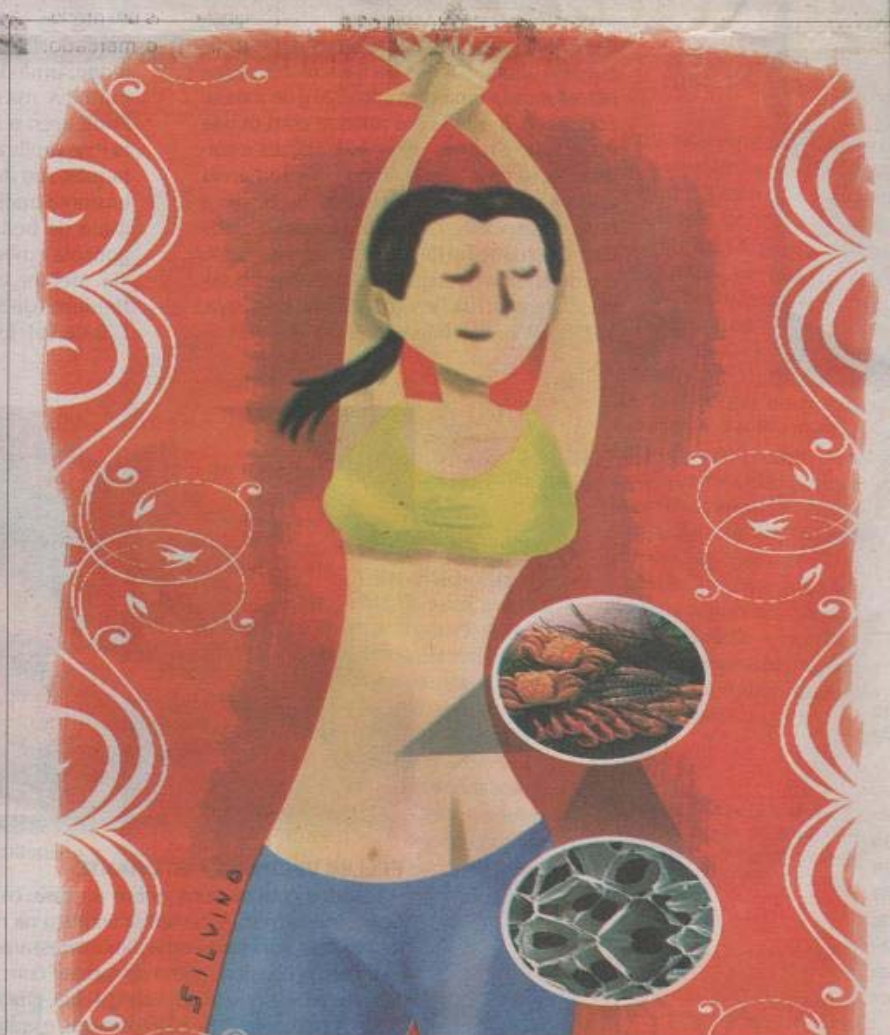
benefícios e alertas

Substância é alvo de estudo da UFPE

VANESSA LINS

Dentre os temas recorrentes nas discussões sobre nutrição e saúde, dois têm se destacado pela importância dada pela sociedade, cada dia mais exigente. São as contaminações por alimentos e as dietas. E em meio a tantas informações a respeito, é importante se resguardar com fontes sérias, para entender melhor como se cuidar e como os dois assuntos podem ter algo em comum.

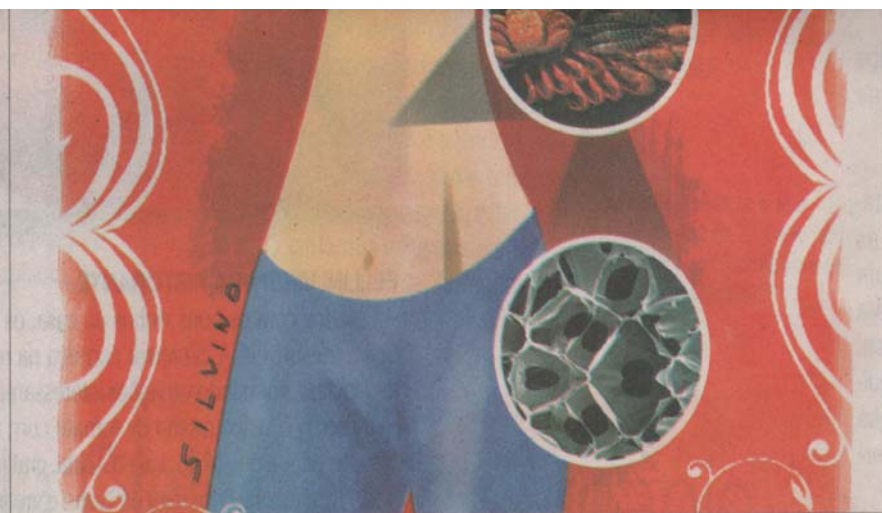
A necessidade de aprofundar esses temas impulsiona a realização de pesquisas em todo o mundo e a busca por alternativas de aditivos mais naturais (que evitem a proliferação de microorganismos), com a finalidade de atender as expectativas de um mercado mais exigente. Este é o caso do Grupo de Pesquisa da Pós-Graduação em Nutrição da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco), que vem se dedicando ao estudo da quitosana, composto abundante na natureza, eficaz na inibição e eliminação de microorganismos, ocasionando a redução de aditivos químicos nos alimentos que chegam a nossa mesa. Presente principalmente na carapaça de animais invertebrados como, por exemplo, na casca de camarão, e na parede ce-



(ligação) com as gorduras. "Apesar de bastante lógica tal tam que, quando enxertada no osso quebrado, tem o Pesquisas atuais também mostram a aplicação da qui-

mais exigente. Este é o caso do Grupo de Pesquisa da Pós-Graduação em Nutrição da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco), que vem se dedicando ao estudo da quitosana, composto abundante na natureza, eficaz na inibição e eliminação de microorganismos, ocasionando a redução de aditivos químicos nos alimentos que chegam a nossa mesa. Presente principalmente na carapaça de animais invertebrados como, por exemplo, na casca de camarão, e na parede celular de fungos, é atóxico e biodegradável, atendendo assim a grande preocupação com a questão da poluição ambiental.

Mas o que tudo isso tem a ver com dietas? O grupo formado por nutricionistas dá mais uma boa notícia sobre a atuação da quitosana. Além de ser ótimo conservante e ecologicamente correto, devido a sua estrutura e facilidade em reagir com outros compostos, a quitosana tem sido bastante utilizada como um coadjuvante no emagrecimento humano por sua interação



(ligação) com as gorduras. "Apesar de bastante lógica tal teoria, somada ainda ao fato de as farmácias estarem repletas de fórmulas emagrecedoras, cujo composto principal é a quitosana, os estudos em humanos ainda são bastante controversos", relata Roberta Bento, membro do grupo de pesquisa da UFPE.

Enquanto a eficácia total não é comprovada, outras aplicações, entretanto, podem ser destacadas. A substância funciona como auxiliadora no controle da pressão arterial, ajuda na absorção de cálcio, é regeneradora da estrutura óssea (estudos recentes apon-

tam que, quando enxertada no osso quebrado, tem o poder de regeneração), redutora do nível de ácido úrico, redutora do colesterol LDL (o ruim), é bactericida e antiviral. Precisa mais?

Os profissionais "da quitosana", porém, alertam para o uso de doses excessivas. Afinal, além da não comprovação científica de todos os benefícios, os remédios de quitosana provocam um efeito colateral muito incômodo - a prisão de ventre -, pois reagindo com qualquer meio ácido (no caso o estômago) forma um gel, podendo dificultar a evacuação.

Pesquisas atuais também mostram a aplicação da quitosana na remoção de resíduos em lagos e rios, biotransformação de pesticidas, como componente de cosméticos, coadjuvante da higiene oral, antiácido, produtos de biofilme (filmes de plástico para cobrir os alimentos), além de ser elemento básico para a confecção das cápsulas de remédios.

▶ SERVIÇO

Grupo de pesquisa em Quitosana (pós-graduação em Nutrição - UFPE): Roberta Bento, Tânia Stamford, Evandro Souza, Thayza Stamford, Ana M. Assis, Ana E. Fai, Carlos E. Vasconcelos.