

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos**

Milton Luiz Pinho Espírito Santo

**EFEITO DA BACTERIOCINOGENICIDADE  
DO *Lactobacillus sakei* 2a  
NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA  
SARDINHA - VERDADEIRA (*Sardinella  
brasiliensis*) FERMENTADA**

Tese de Doutorado

Florianópolis  
2003

Milton Luiz Pinho Espírito Santo

**EFEITO DA BACTERIOCINOGENICIDADE  
DO *Lactobacillus sakei* 2a  
NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA  
DA SARDINHA - VERDADEIRA (*Sardinella  
brasiliensis*) FERMENTADA**

Tese apresentada ao Programa  
de Pós - Graduação em Ciência  
dos Alimentos da Universidade  
Federal de Santa Catarina como  
requisito final para obtenção do  
grau de Doutor em Ciência dos  
Alimentos

Orientador: Prof. Luiz Henrique Beirão, Dr.

Florianópolis  
2003

Santo, Milton Luiz Pinho Espírito

Efeito da bacteriocinogenicidade do *Lactobacillus sakei* 2a na qualidade microbiológica da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) fermentada / Milton Luiz Pinho Espírito Santo; orientador Luiz Henrique Beirão. – Florianópolis, 2003.

201f.: il., tabs. Grafs., fots. + anexos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 2003.

**EFEITO DA BACTERIOCINOGENICIDADE DO *LACTOBACILLUS SAKEI* 2a NA  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA  
DA SARDINHA - VERDADEIRA (*SARDINELLA BRASILIENSIS*) FERMENTADA**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência dos Alimentos** no **Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis  
2003

Profa. Roseane Fett, Dra.  
Coordenadora do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

.....  
Prof. Luiz Henrique Beirão, PhD.  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Orientador

.....  
Prof. Wladimir Padilha da Silva, Dr.  
Universidade Federal de Pelotas  
Membro

.....  
Prof. Ernani Sant'Anna, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Membro

.....  
Prof. Germano Dornelles Soares, PhD.  
Universidade Federal de Pelotas  
Membro

.....  
Profa. Evanilda Teixeira, PhD.  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Membro

Aos meus filhos, Gabriela e  
Marcelo pelo incentivo.

*Agradecimentos*

À Universidade Federal de Santa Catarina.  
Ao orientador Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão.

Ao co-orientador Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna.

À Profa. Dra. Bernadete Franco, pelos ensinamentos transmitidos.

Às Profas. Dra. Cleide Batista e Dra. Evanilda Teixeira.

Aos amigos, Prof. Cesar Damian, Dr. Ruben Villar e Dra. Edna Amante.

À doutoranda Elza Maria Meinert.

Ao colega e amigo Fabiano Bertoldi.

## RESUMO

ESPÍRITO SANTO, Milton Luiz Pinho. **Efeito da bacteriocinogenicidade do *Lactobacillus sakei* 2a na qualidade microbiológica da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) fermentada.** 2003. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC, Florianópolis.

Produtos de peixe obtidos por fermentação láctica são muito comuns no sudoeste da Ásia. A composição e a qualidade variam consideravelmente apesar de serem produzidos em pequena escala; a fermentação da mistura peixe - sal - carboidrato é dependente da microbiota natural. Neste trabalho, a mistura peixe (*Sardinella brasiliensis*) - NaCl - glicose foi usada para avaliar os fatores que favorecem a rápida fermentação láctica, o rápido decréscimo do pH (< 4,5) e uma rápida multiplicação das bactérias lácticas (BL) com redução dos microrganismos deterioradores. Foram avaliados as características da fermentação láctica e os principais fatores antimicrobianos produzidos pelo *Lactobacillus sakei* 2a. O principal fator antimicrobiano identificado foi a habilidade do *Lactobacillus sakei* 2a para produzir ácidos orgânicos e reduzir o pH do peixe (*Sardinella brasiliensis*) fermentado. Outro fator, como a produção de bacteriocinas pode ter contribuído para a segurança alimentar, mas sua participação é secundária. A bacteriocina produzida pela cepa (*Lactobacillus sakei* 2a), isolada a partir de “lingüiça frescal” (embutido de carne tipicamente brasileiro) foi ativa contra *Listeria monocytogenes*. A detecção das bacteriocinas foi realizada utilizando o sobrenadante, obtido por centrifugação do meio de cultivo, pelo método da difusão em poços, usando *Listeria monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador. As colônias circundadas por uma zona clara de inibição, indicaram a presença de bacteriocinas no meio de cultivo a partir de 4 horas de fermentação, quando o microrganismo encontrava-se na fase exponencial de crescimento. A produção de bacteriocinas foi máxima após 7 horas de incubação e a cultura neste momento apresentou uma carga equivalente a  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Após este tempo, não houve mais produção de bacteriocinas. A relação de fermentação aumentou na faixa entre 2 e 4% glicose (p/p), ao passo que, com o aumento da concentração de NaCl, de 2 para 6%, houve somente uma pequena relação de redução do pH. De acordo com os objetivos, não houve dificuldades na redução do pH para valores inferiores a 4,5 nas primeiras 48 horas de fermentação. A glicose foi fermentada rapidamente, mas a redução do pH (3,9) foi lenta na sardinha suplementada com 4% glicose e 6% NaCl. A acidez titulável (% ácido láctico), após 21 dias de fermentação, atingiu 2,55% (2% glicose) e 2,76% (4% glicose) com 2% NaCl. Com a inoculação do *starter* (*Lactobacillus sakei* 2a), foi mantida a qualidade microbiológica (produto); as bactérias deterioradoras reduziram significativamente, provavelmente por causa do baixo valor do pH. Várias pesquisas, relacionadas com a avaliação de microrganismos patogênicos em alimentos; como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium sporogenes* e *Escherichia coli*, indicam que estas bactérias desaparecem rapidamente durante a fermentação. A contagem de bactérias em PCA mostrou um aumento até o 7<sup>o</sup> dia e posteriormente foi reduzindo gradualmente até o final da fermentação para  $1,4 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup> com 6% NaCl e 2% glicose. Na suplementação com 6% NaCl e 4% glicose, a maior redução foi  $6,5 \times 10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>. O aumento, no começo da fermentação se deve à presença de bactérias não formadoras de ácidos que gradualmente desaparecem durante o processamento pela transformação do meio em um substrato bastante acidificado. As bactérias lácticas ou formadoras de ácidos (FA) predominaram durante todo o período de fermentação e as bactérias não formadoras de ácidos (NFA) permaneceram presentes, apenas, no reduzido estágio inicial da fermentação. Durante os 21 dias de fermentação, houve um aumento na relação entre os teores de nitrogênio protéico e nitrogênio solúveis total, evidenciando a autólise, indicando a formação de diferentes aminas e bases nitrogenadas voláteis. A extensão da proteólise durante a fermentação depende não só da natureza da microbiota como dos parâmetros de processamento, com influencia direta na atividade das proteases e peptidases envolvidas no processo.

Palavras-chave: bactérias lácticas, *Lactobacillus sakei*, bacteriocinas, peixe fermentado.

## ABSTRACT

ESPÍRITO SANTO, Milton Luiz Pinho. **Efeito da bacteriocinogenicidade do *Lactobacillus sakei* 2a na qualidade microbiológica da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) fermentada.** 2003. Tese (Doutorado em ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC, Florianópolis.

Lactic fermented fish products are common in South East Asia. The composition and quality of the products vary considerably since they are usually produced on a small scale and the fermentation of the fish - salt - carbohydrate mixtures depends on the natural microflora. This study, fish (*Sardinella brasiliensis*) - NaCl - glucose system was used to evaluate the factors that favour a rapid lactic fermentation, i.e. a rapid decrease in pH (< 4,5) within the first 48 hr; a rapid proliferation of lactic acid bacteria (LAB) with concomitant decrease in spoilage micro-organism count. The characteristics of lactic acid bacterial fermentation and the principal antimicrobial factors produced by *Lactobacillus sakei* 2a are reviewed and assessed. The principal anti-microbial factor identified is the ability of *Lactobacillus sakei* to produce organic acids and decrease the pH of fish fermentation process. Other factor such the production of bacteriocin may play a contributory role in assuring the safety alimentary but their contribution is secondary. The bacteriocin produced by strain (*Lactobacillus sakei* 2a), isolated from "lingüiça" (typical Brazilian meat product) was active against *Listeria monocytogenes*. Bacteriocins detection was accomplished using the supernatant obtained by centrifugation of cultivation medium in the well diffusion method using *Listeria monocytogenes* Scott A as in indicator microorganism. From 4 hours on of fermentation, presence of colonies surrounded by a clear zone of inhibition indicated bacteriocins production in cultivation medium when the microorganism was in the exponential growth phase. With 7 hours incubation, the bacteriocins production was highest concentrations and the microorganisms count were below  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. After this time, bacteriocins were not detected. The fermentation rates increase in the range 2 - 4% w/w of glucose, whereas increasing the salt concentration from 2 to 6% slows the rate of pH decrease. The objective of reducing the pH to below 4,5 within the 48 hours was not difficult to achieve. Glucose was fermented rapidly, whereas pH decreased only very slowly in sardine supplemented with 4% glucose and 6% NaCl. The % titrable acidity obtained after 21 d of fermentation were 2,55% (2% glucose) e 2,76% (4% glucose) with 2% NaCl. Inoculation with the *Lactobacillus sakei* starter culture strains maintained the microbiological quality of the product; the spoilage microorganisms are not tolerant to low pH. Preliminaries studies with the common food pathogens *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium sporogenes* and *Escherichia coli* indicated that these microorganisms rapidly disappear during the fermentation. A sharp increase was observed on the seven day (PCA), reduced until the end of the fermentation period for  $1,4 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup> with 6% NaCl e 2% glucose. With 6% NaCl and 4% glucose, the reduction great was  $6,5 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup>. The sharp increase could be due to the presence of non-acid producing colonies that gradually disappeared as the environment becomes more acidic. The lactic acid bacteria or acid formers (AF) predominated almost throughout the twenty one-day fermentation period while the non-acid formers bacteria (NAF) were present only at the early stages of the fermentation. Increase in the ratio of amino nitrogen to total soluble nitrogen during the fermentation period, indicating the occurrence of autolysis; different amines and volatile nitrogen bases are formed. The extent of proteolysis during fermentation varies with several factors including the nature of microflora and conditions during processing with effects on muscle proteases and peptidases.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus sakei*, bacteriocins, fish fermentation.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	p.10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	p.12
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	p.15
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	p.16
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	p.19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	p.21
<b>2.1 Alimentos produzidos por fermentação</b> .....	p.21
<b>2.2 Bioquímica da deterioração do pescado</b> .....	p.31
2.2.1 Evolução <i>post mortem</i> .....	p.31
2.2.2 Reações autolíticas.....	p.34
2.2.3 Enzimas proteolíticas.....	p.38
2.2.3.1 Catepsinas.....	p.38
2.2.3.2 Calpaínas.....	p.39
2.2.3.3 Colagenases.....	p.40
2.2.4 Redução do OTMA.....	p.40
2.2.5 Oxidação de lipídios.....	p.45
<b>2.3 Sardinha</b> .....	p.48
<b>2.4 Bactérias lácticas</b> .....	p.52
2.4.1 Metabólitos.....	p.52
2.4.1.1 Ácidos orgânicos e pH.....	p.54
2.4.1.2 Peróxido de hidrogênio.....	p.55
2.4.1.3 Diacetil.....	p.56
2.4.1.4 Dióxido de carbono.....	p.57
2.4.1.5 Reuterina.....	p.58

2.4.1.6 Bacteriocinas.....	p.58
2.4.2 Efeito dos nutrientes.....	p.60
2.4.3 <i>Lactobacillus sakei</i> .....	p.69
2.4.3.1 Taxionomia, fisiologia e bioquímica.....	p.69
2.4.4 Bactérias lácticas em produtos cárneos.....	p.71
2.4.4.1 Manipulação genética.....	p.77
2.4.5 Bacteriocinas de bactérias lácticas.....	p.77
2.4.5.1 Cepas bacteriocinogênicas da classe I (lantibióticos).....	p.78
2.4.5.2 Cepas bacteriocinogênicas da classe II.....	p.80
2.4.5.3 Cepas bacteriocinogênicas da classe IIb.....	p.84
2.4.5.4 Cepas bacteriocinogênicas da classe IIc.....	p.84
2.4.6 Modo de ação das bacteriocinas.....	p.84
2.4.6.1 Formação de poros pela nisina.....	p.86
2.4.6.2 Ação da pediocina PA-1.....	p.86
2.4.6.3 Biopreservação do peixe.....	p.87
2.4.7 Potencialidade das bacteriocinas.....	p.88
2.4.7.1 Fatores intrínsecos dos alimentos.....	p.88
2.4.7.2 Efeito da temperatura.....	p.88
2.4.7.3 Resistência a bacteriocinas.....	p.89
2.4.8 Legislação.....	p.89
2.4.9 Detecção e quantificação de bacteriocinas.....	p.92
<b>2.5 <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	p.93
2.5.1 Incidência em produtos pesqueiros.....	p.94
2.5.2 Efeito dos inibidores.....	p.96
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	p.97
<b>3.1 Material</b> .....	p.97
3.1.1 Matéria-prima.....	p.97
3.1.2 Cultivo iniciador bacteriocinogênico.....	p.97
<b>3.2 Métodos</b> .....	p.98

3.2.1 Fermentação dos filés de sardinha.....	p.98
3.2.2 <i>Lactobacillus sakei</i> 2a.....	p.98
3.2.2.1 Caracterização morfológica.....	p.98
3.2.2.2 Caracterização fisiológica.....	p.100
3.2.2.3 Caracterização bioquímica.....	p.100
3.2.2.4 Ativação e preparação do inóculo.....	p.100
3.2.2.5 Espectrofotometria da biomassa.....	p.101
3.2.2.6 Avaliação do número de células viáveis no inóculo.....	p.101
3.2.2.7 Detecção de bacteriocinas pela técnica da difusão em poços.....	p.101
3.2.2.8 Produção de bacteriocinas relacionada com a curva de crescimento do <i>Lactobacillus sakei</i> 2a.....	p.102
3.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	p.102
3.2.4 Análises microbiológicas dos filés de sardinha.....	p.102
3.2.4.1 Amostragem.....	p.102
3.2.4.2 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos.....	p.103
3.2.4.3 Contagem de bactérias lácticas.....	p.103
3.2.4.4 Enumeração de coliformes fecais.....	p.103
3.2.4.5 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	p.104
3.2.4.6 Contagem de <i>Enterococcus</i> spp.....	p.104
3.2.4.7 Detecção de <i>Salmonella</i> sp. ....	p.105
3.2.5 Análises físico - químicas.....	p.105
3.2.5.1 Composição centesimal.....	p.105
3.2.5.2 Nitrogênio protéico (NP) e nitrogênio solúvel total (NST).....	p.106
3.2.5.3 pH.....	p.106
3.2.5.4 Acidez titulável total (ATT).....	p.106
3.2.5.5 Cloretos.....	p.106
3.2.6 Análise sensorial.....	p.106
3.2.6.1 Análise descritiva quantitativa (ADQ).....	p.106

3.2.7 Análise estatística.....	p.107
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>p.109</b>
<b>4.1 Matéria-prima.....</b>	<b>p.109</b>
4.1.2 Composição química.....	p.109
4.1.3 Tamanho e rendimento.....	p.111
4.1.4 Microbiota.....	p.111
4.1.5 pH.....	p.113
<b>4.2 <i>Lactobacillus sakei</i> 2a.....</b>	<b>p.114</b>
4.2.1 Caracterização morfológica.....	p.114
4.2.2 Caracterização fisiológica.....	p.114
4.2.3 Caracterização bioquímica.....	p.115
4.2.4 Relação entre o crescimento do <i>Lactobacillus sakei</i> 2a e a produção de bacteriocinas.....	p.118
<b>4.3 Fermentação do pescado.....</b>	<b>p.121</b>
4.3.1 Definição do experimento .....	p.121
4.3.2 Avaliação do pH e acidez .....	p.127
4.3.3 Atividade antagônica do <i>L. sakei</i> 2a.....	p.136
4.3.4 Relação entre o nitrogênio protéico (NP) e o nitrogênio solúvel total (NST).....	p.145
4.3.5 Avaliação sensorial.....	p.149
<b>4.4 Sugestões para futuros trabalhos.....</b>	<b>p.156</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>p.158</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>p.160</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>p.182</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Duração do <i>rigor mortis</i> de várias espécies de peixes.....	p.33
Tabela 2:	Capturas anuais (em toneladas) de sardinha na costa brasileira.....	p.51
Tabela 3:	Composição físico-química de amostras de filés da sardinha - verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ).....	p.109
Tabela 4:	Tamanho da espécie e rendimento de amostras de filés (com pele) da sardinha - verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) .....	p.112
Tabela 5:	Avaliação microbiológica de amostras de filés de sardinha-verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ).....	p.113
Tabela 6:	Variação do pH de amostras de filés de sardinha - verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ).....	p.114
Tabela 7:	Caracterização fisiológica do <i>Lactobacillus sakei</i> 2a.....	p.115
Tabela 8:	Caracterização bioquímica do <i>Lactobacillus sakei</i> 2a.....	p.116
Tabela 9:	Médias dos valores atribuídos pelos julgadores na análise sensorial dos filés de sardinha-verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ) submetidos a fermentação com <i>L. sakei</i> 2a, glicose e NaCl.....	p.149
Tabela 10:	Teste LSD ( <i>Least Significant Difference</i> ) - Valores de $p^*$ amostras.....	p.153

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Autoxidação de lipídios polinsaturados..... p.47
- Figura 2: Diagrama do fluxo operacional da fermentação da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)..... p.99
- Figura 3: Crescimento do *Lactobacillus sakei* 2a MRS, incubado a 30 °C por 24 horas..... p.119
- Figura 4: Produção de bacteriocinas por *Lactobacillus sakei* 2a em MRS, incubado a 30 °C por 24 horas..... p.120
- Figura 5: Fermentação da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) utilizando o *Lactobacillus sakei* 2a, NaCl e glicose como carboidrato fermentescível..... p.122
- Figura 6: Evolução da fermentação dos filés de sardinha.  
Tempo: 2 dias.  
A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.  
B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl..... p.123
- Figura 7: Evolução da fermentação dos filés de sardinha.  
Tempo: 7 dias.  
A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.  
B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl..... p.124
- Figura 8: Evolução da fermentação dos filés de sardinha.  
Tempo: 14 dias.  
A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.  
B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl..... p.125

- Figura 9: Evolução da fermentação dos filés de sardinha.  
Tempo: 21 dias.  
A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.  
B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl..... p.126
- Figura 10: Variação do pH durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a com 2 e 4% glicose. O efeito sobre o pH inicial do substrato foi comparado através da adição de 2, 4 e 6 % NaCl (p/p)..... p.128
- Figura 11: Influência da concentração salina sobre o pH da sardinha - verdadeira submetida ao processo de cura, na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito sobre o pH inicial do substrato foi comparado através da adição de: 2, 4 e 6 % NaCl (p/p)..... p.132
- Figura 12: Produção de ácido láctico durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a, com 2 e 4% glicose. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p)..... p.134
- Figura 13: Influência da concentração salina na produção de ácido láctico durante a cura da sardinha - verdadeira submetida ao processo de cura, na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito sobre o pH inicial do substrato foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p)..... p.135
- Figura 14: Variação na contagem de microrganismos em placas sobre PCA ( $\text{Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ ) durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a, com 2 e 4 % glicose. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p)..... p.138
- Figura 15: Variação na contagem das bactérias lácticas sobre MRS ( $\text{Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ ) durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a, com 2 e 4 % glicose. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e

	6 % NaCl (p/p).....	p.139
Figura 16:	Influência da concentração salina sobre o crescimento dos microrganismos em PCA ( $\text{Log}_{10}$ UFC $\text{g}^{-1}$ ) durante a cura da sardinha - verdadeira, na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).....	p.141
Figura 17:	Influência da concentração salina sobre o crescimento das bactérias lácticas em MRS ( $\text{Log}_{10}$ UFC $\text{g}^{-1}$ ) durante a cura da sardinha - verdadeira, na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).....	p.142
Figura 18:	Efeito da adição da glicose (2 e 4%) e NaCl (2, 4 e 6%) na relação de fermentação da sardinha – verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ).....	p.144
Figura 19:	Evidência da autólise durante a fermentação da sardinha – verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> ).....	p.148
Figura 20:	Variação organoléptica das amostras de sardinha fermentada, inoculadas com <i>Lactobacillus sakei</i> 2a. Amostras: I - 2% glicose e 2% NaCl; II - 2% glicose e 4% NaCl; III - 2% glicose e 6% NaCl; IV - 4% glicose e 2% NaCl; V - 4% glicose e 4% NaCl; VI - 4% glicose e 6% NaCl. Propriedades organolépticas: cor; odor; sabor; textura.....	p.152



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Fungos importantes utilizados na fermentação de alimentos.....	p.29
Quadro 2:	Atividades autolíticas relacionadas com a estabilidade do peixe fresco.....	p.42
Quadro 3:	Substratos e compostos responsáveis por odores e sabores relacionados com a deterioração microbiana.....	p.44
Quadro 4:	Compostos resultantes da deterioração do pescado na estocagem; resfriado (aeróbica), resfriado (embalado) e à temperatura ambiente.....	p.44
Quadro 5:	Fatores antimicrobianos associados às bactérias láticas.....	p.53
Quadro 6:	Inibição de microrganismos patogênicos por bactérias láticas.....	p.61
Quadro 7:	Subdivisão taxionômica das bactérias láticas.....	p.69
Quadro 8:	Fermentação de carboidratos por <i>L. sakei</i> ATCC 15521.....	p.70
Quadro 9:	Características fisiológicas e bioquímicas do <i>L. sakei</i> ATCC 15521.....	p.71
Quadro 10:	Características das bacteriocinas produzidas por bactérias láticas associadas aos produtos cárneos.....	p.79

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABIA	- Associação Brasileira da Indústria da Alimentação
ADP	- Adenosina di - fosfato
AMP	- Adenosina mono - fosfato
APHA	- <i>American Public Health Assocoation</i>
Art.	- Artigo
ATPase	- Adenosina tri - fosfatase
ATP	- Adenosina tri - fosfato
ATT	- Acidez titulável total
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
A <sub>w</sub>	- Atividade de água
BL	- Bactérias lácticas
BH Broth	- Caldo de Cérebro - Coração
BP Agar	- Ágar Baird - Parker
BPM	- <i>Boas Práticas de Manipulação</i>
BVT	- Bases voláteis totais
°C	- Temperatura em graus centígrados
CA	- <i>Codex Alimentarius</i>
Ca	- Símbolo químico do cálcio
Ca <sup>+2</sup>	- Íon cálcio
Conc.	- Concentração
De	- Dextrógero
D	- Peso molecular em daltons
DETEN	- <i>Departamento de Técnicas Normativas</i>
DINAL	- <i>Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos</i>
DL	- Dextrógero - levógero
DNA	- Ácido desoxirribonucléico

D.O.	- Densidade ótica
Dp	- Desvio padrão
EC	- <i>European Community</i>
EC Broth	- Caldo EC
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
FA	- Formaldeído
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i>
FCA	- Fator cálcio - ativado
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
g	- Força centrífuga
g	- Peso em gramas
GMP	- <i>Goods Manufacturing Practices</i>
GRAS	- <i>Generally Regarded As Safe</i>
h	- Tempo em horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>p</sub>	- Água peptonada
Hx	- Hipoxantina
ICMSF	- <i>International Commission on Microbiological Specification for Food</i>
IMP	- Inosina mono - fosfato
Ino	- Inosina
K	- Índice de frescor
kD	- Peso molecular em quilodaltons
KF Agar	- Ágar KF
kg	- Peso em quilogramas
L	- Levógero
LANARA	- <i>Laboratório Nacional de Referência Animal</i>
LIA Agar	- Ágar Lisina Ferro
log	- Função logarítmica base decimal
LS Broth	- Caldo Lauril Sulfato
mg	- Peso em miligramas
mL	- Volume em mililitros
mm	- Distância em milímetros
min	- Tempo em minutos

Mod.	- Modelo
MRS	- Ágar DE Man, Rogosa e Sharpe
MS	- <i>Ministério da Saúde</i>
NaCl	- Cloreto de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
nm	- Nanômetro
NNP	- Nitrogênio não-protéico
NT	- Nitrogênio total
NP	- Nitrogênio protéico
Núm.	- Número
OMS	- <i>Organização Mundial da Saúde</i>
OTMA	- Óxido de trimetilamina
PCA	- Ágar de Contagem em Placas
pH	- Potencial hidrogeniônico
p/p	- Relação peso por peso
ppb	- Concentração em partes por bilhão
ppm	- Concentração em partes por milhão
p/v	- Relação peso por volume
rpm	- Velocidade em rotações por minuto
SC	- Santa Catarina
SC Broth	- Caldo Selenito Cistina
SIM Agar	- Ágar Sulfeto - Indol - Motilidade
SP	- São Paulo
SPS Agar	- Ágar Sulfito - Polimixina - Sulfadiazina
TMA	- Trimetilamina
TSAYE	- Ágar-peptona de farinha de soja com extrato de levedura
TSI Agar	- Ágar Três Açúcares e Ferro
TTB	- Caldo de enriquecimento Tetracionato
UFC	- Unidades formadoras de colônias
µg	- Peso em microgramas
U.I.	- Unidades internacionais
µL	- Volume em microlitros
µmol	- Concentração em micromoles

un - Unidade  
YE - Extrato de levedura



## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de carne e seus derivados têm uma grande importância econômica e nutricional e, as bactérias lácticas representam um papel relevante na elaboração de produtos fermentados. Os alimentos cárneos, e o pescado são incluídos nesta classificação; são ricos em proteínas altamente perecíveis, possuindo uma vida-de-prateleira reduzida com a utilização dos processos convencionais de preservação. Desde o período Neolítico, estes métodos têm sido a fermentação, a salga e a secagem. Mais recentemente, o enlatamento, o congelamento e os aditivos químicos têm sido utilizados na extensão da durabilidade destes alimentos. Devido à tendência generalizada na redução da utilização de aditivos químicos nos produtos alimentícios, a atenção começa a se concentrar nos alimentos minimamente processados, mais saudáveis, associados à produção de metabólitos que ocorrem naturalmente, produzidos por bactérias específicas, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis.

Atualmente, bactérias lácticas são amplamente utilizadas na produção de queijos e leites fermentados, incluindo o iogurte, produzindo efeitos bioquímicos e biológicos sobre estes alimentos, resultando em produtos com definições organolépticas, nutricionais e probióticas, de elevada importância. Na Europa, os *Lactobacillus* são encontrados em diferentes alimentos cárneos fermentados, conferindo e assegurando uma melhoria na qualidade sensorial e uma apropriada formação de cor. Os mais importantes são os salames fermentados em que as bactérias lácticas são os principais agentes envolvidos, convertendo carboidratos em ácidos orgânicos com conseqüente redução do pH. As bactérias lácticas crescem e se multiplicam naturalmente nos produtos protéicos, produzindo substâncias antimicrobianas como: ácido acético, láctico, diacetil, peróxido de hidrogênio e determinados peptídios como as bacteriocinas, com capacidade para atuarem de forma letal ou inibitória sobre espécies Gram - positivas. Nas últimas décadas, vários estudos têm sido direcionados no isolamento e caracterização de bactérias lácticas para serem utilizadas no controle de microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*.

O pescado fermentado pode ser produzido com alto teor salino (20%) em que a contagem microbiana decresce durante a cura e, aquele caracterizado por um baixo teor em que carboidratos específicos são adicionados para que ocorra a fermentação propriamente dita. Esta última categoria apresenta um aumento da microbiota durante a fermentação com predominância das bactérias láticas. Produtos pesqueiros fermentados e acondicionados em embalagens a vácuo apresentam uma microbiota dominada predominantemente por bactérias láticas após uma ou duas semanas de estocagem sob refrigeração. Muito pouco se conhece sobre as características das bactérias láticas presentes nos produtos fermentados, relacionadas com as propriedades antibacterianas. Determinadas atividades como a produção de ácidos orgânicos, a formação de bacteriocinas, a competição por nutrientes e a associação com outros microrganismos são os fatores que mais influenciam esses processos fermentativos, condicionando o consumo destes alimentos. O efeito antimicrobiano destas bactérias nos alimentos fermentados é importante para a segurança destes produtos através da atividade antagônica com a microbiota patogênica *in situ*. A utilização da bacteriocinogenicidade destas cepas láticas é considerada um poderoso instrumento na prevenção de contaminantes externos. O espectro de aplicabilidade das bactérias láticas é vasto e, as culturas de *Lactobacillus* são altamente eficientes neste efeito de biopreservação. É apropriado considerar que, estas culturas poderão ser incluídas na elaboração de novos produtos alimentícios com valor agregado; filé de peixe fermentado é apenas um exemplo destes alimentos.

A proposta para o presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação da bacteriocinogenicidade do cultivo iniciador formado pelo *Lactobacillus sakei* 2a e o seu efeito na qualidade microbiológica da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) fermentada, com particular referência para a sua atividade antagônica contra as bactérias deterioradoras associadas ao processo fermentativo. Especificamente foi avaliada a qualificação da cepa quanto à sua potencialidade para a produção de bacteriocinas, a otimização dos parâmetros envolvidos na produção de ácido lático utilizando glicose como substrato fermentescível, a estabilidade do produto e o catabolismo de aminoácidos pela formação de amins biogênicas associadas com a atividade aminopeptidase.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Alimentos produzidos por fermentação

As fermentações são métodos de preservação alimentar caracterizadas por importantes modificações químicas das matérias - primas, com formação de agentes conservadores através da ação de microrganismos como resultado de alterações dirigidas. O valor nutricional, textura e aroma das matérias - primas e dos alimentos mudam, como efeito da fermentação. Nos alimentos cárneos e, o pescado exemplifica isso, há uma conversão das proteínas insolúveis em formas solúveis. Nestes processos fermentativos ocorre uma degradação gradual da actomiosina em peptídios e aminoácidos que são solúveis em baixas concentrações iônicas (ROBINSON, 1991; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 1995).

Durante o processamento para a obtenção de molhos fermentados de peixe, o teor de nitrogênio solúvel no líquido formado com a desintegração das fibras musculares aumenta com o tempo. Este nitrogênio solúvel passa para a forma insolúvel e essa conversão atinge o máximo, ou seja, cerca de 56%, após 120 a 130 dias de fermentação, de modo que, as proteínas degradadas na carne de pescado se difundem na salmoura. Há um aumento de nitrogênio amínico e de nitrogênio não - protéico no pescado, enquanto frações de nitrogênio total e de nitrogênio protéico passam para a salmoura. A contribuição dos aminoácidos livres formados, para o aumento do nitrogênio amínico é da ordem de 66 a 67% (AQUARONE et al., 1983; MULLER e TOBIN, 1991).

Coadjuvante da fermentação, a salga auxilia na seletividade de uma desejável microbiota, eliminando geralmente a multiplicação de microrganismos responsáveis pela putrefação. Entretanto, várias espécies de microrganismos ou enzimas, decompõem o produto, solubilizando porções protéicas e elevando o teor dos sais minerais nestes alimentos (GRAIKOSKI, 1973).

A decomposição que se manifesta no pescado pode ser produzida por enzimas proteolíticas, próprias das espécies, pelo resultado de atividades

bacterianas ou, ainda, consistir em uma combinação dos dois processos metabólicos (LINDEN e LORIENT, 1994).

Vários trabalhos de pesquisas (BORGSTROM, 1965; CHEFTEL et al., 1977; MULLER e TOBIN, 1991; ROBINSON, 1991) comprovaram o metabolismo bacteriano relacionado com o desenvolvimento de odores, produzido através de micrococos, clostrídios e pediococos.

As proteínas do pescado, pela própria característica, se comparada com outras proteínas animais, apresentam uma conservação quase sempre acompanhada de uma difícil contenção das alterações deterioradoras. Mas, quando estas deteriorações são controladas, passam a ser benéficas, produzindo *flavour* e odores apropriados, mascarando o sabor indesejável de algumas espécies e aumentando a aceitabilidade de outras. É o papel da fermentação (ROBINSON, 1991).

Estudos (LISTON, 1979) atestaram que, a introdução de uma fermentação anaeróbica se mostra capaz de interromper temporariamente os processos bioquímicos oxidativos e a deterioração microbiana putrefativa.

Na elaboração de produtos fermentados de pescado, o peixe pode ser processado de várias maneiras: inteiro e apenas lavado, somente eviscerado ou, eviscerado e descabeçado, influenciando o metabolismo das cargas microbianas naturais ou contaminantes, presentes nestes produtos alimentícios (MULLER e TOBIN, 1991).

De acordo com AQUARONE et al. (1983), a ação das enzimas no processo fermentativo é essencial para a textura do produto, o que é desejável. Porém, dependendo dos hábitos regionais, o amolecimento ou a parcial liquefação da carne, conduz a uma depreciação do alimento.

Em certos países, os produtos fermentados são elaborados nas mais variadas formas e, o processamento tem a finalidade de conferir textura, sabor e odor a estes alimentos; geralmente o efeito conservador é considerado um benefício secundário (BERTULLO, 1975; MORZEL et al., 1997).

Na Ásia, produzem-se molhos e pastas de pescado. Nas Filipinas a fermentação deve levar à desintegração do pescado. Tradicionalmente, o peixe é inicialmente salgado e a seguir, disposto em *containers*. Estes acondicionadores são fechados e mantidos em ambientes refrigerados por períodos que variam entre uma semana e dezoito meses. A fermentação se processa, produzindo solubilizados

líquidos ou produtos semilíquidos com características específicas de sabor, aparência e odor. O líquido é geralmente drenado ou posteriormente eliminado por filtração, conforme o hábito de consumo (BERTULLO, 1975).

Conforme CRISAN e MILLER (1975), citados por WHEATON e LAWSON (1985), o valor nutricional e a digestibilidade do produto sofrem modificações que dependem do tipo de fermentação produzida, consumo e necessidade de comercialização.

Pescados tradicionalmente não comercializáveis são utilizados ou convertidos em alimentos com elevado valor nutricional. No Oriente, pequenas espécies de peixes têm sido utilizadas para produzir molhos e pastas de fácil aceitação (WHEATON e LAWSON, 1985).

Segundo ROBINSON (1991), a fermentação é uma operação, através da qual se potencializa deliberadamente o crescimento de microrganismos para consumirem uma determinada quantidade de substrato e, com isso, enriquecer o meio com produtos de seu metabolismo.

Existem centenas de produtos fermentados de pescado, mas a maioria não tem sido estudada cientificamente e muitos são elaborados através de processamentos artesanais que se baseiam em experiências e práticas totalmente empíricas (MORZEL et al., 1997).

Por possuírem uma base alimentar insuficiente, desenvolvida com dietas apoiadas no consumo de cereais, o Leste Oriental tem nestes produtos fermentados uma grande fonte alternativa de proteínas. Porém, devido ao elevado teor de sal, a aceitação destes produtos se realizou de uma forma gradual e, a introdução na dieta alimentar se desenvolveu conjuntamente com alimentos mais tradicionais como o arroz ou outros produtos com condimentação mais suave (WHEATON e LAWSON, 1985).

De um modo geral, os produtos pesqueiros fermentados são caracterizados através do *nuoc - mam*, do *shiokara*, e das silagens de pescado. O *nuoc - mam* é um molho fermentado produzido a partir de uma variedade muito grande de peixes, usualmente das espécies de pequeno porte. A maior produção se situa no Vietnã, Tailândia, Malásia e outros países Indo - Chineses. Baseado em técnicas primitivas, as espécies são amassadas e prensadas manualmente. A seguir, são salgadas e acondicionadas em potes de barro que posteriormente serão selados e enterrados no piso, estabilizando os efeitos negativos provocados pela elevação da

temperatura. Alguns meses depois, os potes são abertos, o líquido sobrenadante é decantado e o *nuoc - mam* estará pronto para o consumo (WEATON e LAWSON, 1985).

Alguns processamentos, em escala comercial, utilizam o peixe fresco inteiro. As espécies são misturadas com NaCl (6:4) e, posteriormente empilhadas em grandes cubas para a realização da fermentação que poderá durar até 3 dias. Neste processamento há o desenvolvimento de uma grande turbidez da solução formada pela exudação da água de constituição do pescado. O excesso de solução é esgotado e o peixe é acomodado para uma posição mais inferior da cuba. Uma parte da secreção aquosa é extraída e, em seqüência, uma nova salmoura é adicionada de maneira que todo o pescado permaneça submerso por uma camada de 10 cm com este líquido de cobertura. A duração da fermentação é variável em função do tamanho do pescado; poucos meses para as espécies menores e até dezoito meses para aquelas de maior tamanho. Com a finalização da hidrólise, o *nuoc - mam* é drenado e oferecido ao consumo (WEATON e LAWSON, 1985).

No Japão, o *shiokara* generaliza vários tipos de pastas produzidas por fermentação com diversas espécies de peixes. Tradicionalmente, o produto é obtido com postas de peixes frescos com vísceras, misturadas com NaCl (10:4). Inicialmente, a matéria - prima é disposta em barris e, por alguns dias, realizam-se periódicas agitações de forma manual. Posteriormente, o barril é selado e promove-se uma fermentação parcial que deverá estender - se durante algumas semanas e até 1ano. Após o término da hidrólise, adiciona-se malte de arroz na proporção de 30% (p/p) e promove-se uma fermentação adicional por mais 2 ou 3 dias. A fermentação é completada e o *shiokara* estará pronto para o consumo (WEATON e LAWSON, 1985).

Existem, portanto, diferentes tipos de produtos fermentados e, o processo é essencialmente variável em função do tempo operacional. De um modo geral, estas operações envolvem um baixo custo, comumente praticado no sul da Ásia e oeste da África através de técnicas extremamente populares que se mantiveram ao longo dos anos, principalmente a partir da década de 50, na região de Gâmbia (THE UNITED NATIONS DEVELOPMENT FUND FOR WOMEN - UNIFEM, 1988).

Nos países asiáticos, a fermentação envolve diferentes tipos de produtos; os produzidos com peixes salgados, os formulados que incluem os molhos condimentados e pastas, como o *patis* e o *bagoong* e, os produzidos por

fermentação láctica através de misturas de várias espécies de peixes, NaCl e carboidratos, como o *burong isda* e o *balao-balao*, originários das Filipinas (UNIFEM, 1988).

No sueste asiático, o *bagoong* é produzido por fermentação de anchovas (*Engraulis encrasicolus*) e sardinhas (*Clupea pilchardus*). O processamento inicia com a lavagem do pescado e posterior salga utilizando NaCl (3:1). As espécies salgadas são transferidas para tambores, cobertas com gazes de algodão e mantidas durante 5 dias nestas condições. A seguir, o pescado é dessecado ao sol durante 7 dias e, posteriormente fermentado durante 3 a 12 meses. O produto acabado é uma pasta consistente de cor avermelhada que pode ser conservada por muito tempo (AQUARONE et al., 1983).

O *balao - balao*, produzido nas Filipinas, é obtido através da fermentação láctica do camarão - vermelho (*Hymenopenaeus mülleri*) após uma operação de salga com concentração de NaCl entre 15 e 20% e, permanência nestas condições durante 3 a 6 horas. Após este período, é misturado com arroz salgado cozido na proporção 1:4. A seguir, o composto é fermentado durante 7 a 10 dias (UNIFEM, 1988).

O sul da Índia produz o *colombo cure*, produto obtido por fermentação de sardinhas (*Clupea pilchardus*) com baixo teor de gordura. As espécies são misturadas com NaCl (3:1) e, posteriormente dispostas em tanques com polpas de tamarindos para favorecer a fermentação pelo aumento da acidez do composto. O processamento dura de 3 a 4 meses. O *colombo cure* é um produto fermentado produzido com o peixe inteiro, apresentando acentuado odor de frutas e textura fibrosa, podendo ser conservado por mais de 24 meses sem perder as características iniciais de produção (AQUARONE et al., 1983; UNIFEM, 1988).

Em Burma, sueste da Ásia, é produzido o *ngapi*, alimento fermentado a partir de anchovas de pequeno porte (*Engraulis encrasicolus*). Os peixes, após secarem ao sol durante 48 horas, são salgados na proporção de 6 partes de peixe seco para 1 parte de NaCl. A seguir, são transformados em pastas com posterior acondicionamentos em tanques para a fermentação, que deverá durar durante 7 dias em condições anaeróbicas. Posteriormente, o produto é dessecado ao sol durante 5 horas e novamente fermentado por mais 30 dias. O *ngapi* é uma pasta com elevada consistência, adicionada ou não de corantes artificiais, podendo ser consumida em até 2 anos. Países como a Indonésia, produzem o *keropok*, um tipo

de salsicha produzida com várias espécies de sardinhas ou camarões. Removem-se as vísceras e as espinhas do peixe fresco (os camarões são descascados) e efetua-se uma mistura com amido de mandioca (1:1). A seguir, realiza-se uma homogeneização com vários ingredientes: glutamato de sódio, NaCl, sacarose e, opcionalmente corantes vermelhos. Após a homogeneização, as salsichas são moldadas e cozidas em vapor saturado ou água aquecida. Posteriormente, as peças são resfriadas, dessecadas ao sol durante 24 horas e acondicionadas em filmes de polietileno (UNIFEM, 1988).

Na região oeste da África e especificamente em Ghana, é produzido o *mamone* ou o *bomone*, utilizando várias espécies de peixes: a cavala branca (*Thyrsitops lepidopodea*), a bicuda (*Sphyræna barracuda*) ou badejos (*Mycteroperca* spp.). O método de processamento difere entre as regiões, mas geralmente envolve a escamagem, evisceração e lavagem das espécies em água salgada. Em determinados processamentos, as guelras são removidas e o NaCl (1:9) é aplicado internamente na cavidade abdominal. O peixe salgado deverá ser fermentado entre 1 e 7 dias e posteriormente dessecado até 72 horas. O produto final possui sabor suave e poderá ser utilizado para condimentar sopas e alimentos cozidos (WHEATON e LAWSON, 1985).

Em países como Gâmbia e Senegal, também se fabricam diversos produtos de pescado fermentado e, entre eles, o *gaedja*, utilizado como condimento. O peixe é lavado, aberto no dorso e eviscerado. Após uma rápida fermentação, se processa uma desidratação vagarosa por vários dias e posteriormente uma lenta dessecagem ao sol até adquirir uma textura adequada, própria para o consumo. O *gaedja* pode ser consumido junto com o *yate*; caracóis marinhos fermentados e dessecados, constituindo-se num prato tradicional (UNIFEM, 1988).

Ao norte da África, o Egito produz o *fasikh*, a partir da fermentação de pequenos pelágicos, utilizando processamentos semelhantes àqueles empregados na fabricação do *gaedja* (AQUARONE et al., 1983).

No Japão, peixes e moluscos, juntamente com cereais ou vegetais, são utilizados para a preparação de produtos fermentados, como o *i - sushi*, através do envolvimento de determinadas espécies de bolores e bactérias lácticas. Um produto oriental com bastante aceitação e que envolve a fermentação produzida por bolores é o *katsuobushi*. Sua produção envolve a fermentação controlada de filés de peixe

(*Sarda sarda*), com posterior aquecimento, defumagem e dessecação ao sol. Sua maior aplicação é na elaboração de sopas. (AQUARONE et al., 1983)

Conforme CONNELL (1979), um produto semelhante, conhecido como *koji-zuki*, é obtido com arroz fermentado e recortes de peixes ou ovas, por meio do *Aspergillus oryzae*. Várias enzimas, particularmente as proteinases, contribuem para a formação do odor característico e variações na textura deste produto.

LISTON (1979) menciona que, a maioria dos bolores que se desenvolvem em produtos dessecados por aquecimento solar, pertencem ao gênero *Aspergillus* ou *Penicillium*. Estes fungos são importantes na medida em que auxilia a operação de desidratação do produto, redução do teor de gordura e melhoria do sabor. Espécies de *Penicillium* são também recomendadas para a produção de determinados produtos fermentados de carne, bastante populares no sul da Europa.

Conforme DJIEN (1988), no México, o *pozol* é produzido através da fermentação natural da massa de pão de milho. Leveduras, bactérias e algumas espécies de fungos crescem na superfície deste substrato para produzir vários produtos alimentícios. Entretanto, nenhuma cepa se torna dominante, assim como não se sabe que espécie de fungo é essencialmente requerida para esta fermentação.

O Quadro 1 mostra algumas espécies de bactérias e fungos utilizados em alimentos fermentados e, entre eles, alguns produtos de pescado. É conveniente especificar que, produtos similares são conhecidos por nomes diferenciados, dependendo do país de origem.

Na América do Sul, países como Peru, Chile e Argentina, desenvolveram fermentações à base de anchovas (*Pomatomus saltator*). Os peixes são misturados com sal na proporção de 30% e processados por fermentações que podem durar até 4 meses. Os processos enzimáticos conferem odor e cor rosada, característica destes produtos anchovados (UNIFEM, 1988).

MORZEL et al. (1997), compararam produtos asiáticos com europeus e descreveram sobre a qualidade sensorial destes fermentados. Os produtos asiáticos adquirem variações significativas devido ao alto teor de NaCl utilizado, com adições superiores a 300g NaCl kg<sup>-1</sup> de peixe e elevada proteólise que se desenvolve através das elevadas temperaturas de fermentação, próximas de 30 °C. A proteólise desenvolvida é devida à atividade enzimática, originária das vísceras e enzimas bacterianas, provenientes da microbiota natural ou contaminante, considerando a

espontaneidade da fermentação. Estes processamentos são realizados em poucas semanas ou alguns meses, produzindo alimentos com texturas líquidas ou semilíquidas, com acentuado odor a queijo e sabor salgado.

Na Europa, os exemplos de produtos pesqueiros fermentados são encontrados na Escandinávia. Entre as espécies utilizadas, encontra-se o arenque (*Clupea harengus*), o salmão (*Salmo salar*) e a truta (*Salmo trutta*), que produzem fermentados como o *gaffelbi* ou o *tidbits*, o *gravlax* e o *rakþrett*, respectivamente. Na produção do *tidbits*, os arenques inteiros são misturados com NaCl (150 a 170 g kg<sup>-1</sup>), sacarose (60 a 70 g kg<sup>-1</sup>) e especiarias. Posteriormente são fermentados espontaneamente durante 12 a 18 meses. A seguir, os peixes são filetados e acondicionados em embalagens de vidro. Produtos, como o *gravlax* e o *rakþrett* possuem um tempo menor de fermentação. O processamento envolve a adição de NaCl e sacarose aos peixes já filetados. A duração da operação atinge 2 semanas sob condições de refrigeração. É importante ressaltar que existe um efetivo controle durante toda a fermentação, incluindo avaliações microbiológicas, necessárias para a manutenção da qualidade do produto final (AQUARONE et al., 1983).

De um modo geral, os fermentados asiáticos e escandinavos são elaborados pelo processo de fermentação espontânea. Além de não conferir consistência aos produtos, ocasionam a incidência de patogênicos, com elevado risco à saúde pública. *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* estão implicados em toxinfecções pelo consumo de alimentos fermentados de carnes vermelhas e frangos, similarmemente, produtos fermentados de pescado estão sujeitos ao mesmo risco (AQUARONE et al., 1983; GELLI, 1994).



Quadro 1: Fungos importantes utilizados na fermentação de alimentos

Fungo	Coadjuvante Bactérias/Levedur	Substrato Principal	Produto	Natureza	Uso	País
<i>Actinomucor elegans</i>		Coalho de soja	Tufu tou - fu - ju	Torta semi – sólida	Condimento	China
<i>Amylomyces rouxii</i>	<i>Endomycopsis</i>	Mandioca	Peuyeum tapé sing - kong	Torta semi – sólida	Refeição	Indonésia
<i>Amylomyces rouxii</i>	<i>Endomycopsis</i>	Arroz	Brem	Torta sólida	Adoçante	Indonésia
<i>Amylomyces rouxii</i>	<i>Endomycopsis</i>	Arroz	Brem Bali Mie - chiu Sato Tapai Tupuy Yakju	Líquido	Bebida	Oriente
<i>Amylomyces rouxii</i>	<i>Endomycopsis</i>	Arroz	Chiu - ping Bubod Look-pang Nuruk Ragi  Levedura Chinesa Chiu - ping Bubod Look - pang Nuruk Ragi	Torta sólida	Inóculo	Oriente
<i>Amylomyces rouxii</i> <i>Rhizopus chinensis</i>	<i>Endomycopsis</i> <i>Hansenula</i> <i>Saccharomycopsis</i>	Arroz	Lao - chao Chiu - niang Khao - mak Tapé ketan Tapé pulut	Torta semi – sólida	Refeição	Oriente
<i>Aspergillus oryzae</i>			Tané koji	Pó	Inóculo	Japão
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Pediococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Soja	Hamanattot oU - shih Tao - si	Grãos	Condimento	Japão China

Quadro 1 continuação

Fungo	Coadjuvante Bactéria/Levedura	Substrato principal	Produto	Natureza	Uso	País
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Hansenula</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulopsis</i>	Soja (aquecida)	Molho de soja Chiang - yu Shoyu Kecap Si-ieu Toyo Kanjang	Líquido	Flavorizante	Oriente
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Pediococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulopsis</i>	Soja c/arroz e cevada	Miso Chiang Doenjang Taoco	Pasta	Flavorizante	Oriente
<i>Aspergillus glaucus</i>		Peixe	Katsuobu - shi	Sólido	Condimento	Japão
<i>Monascus purpureus</i>		Arroz	Angkak	Grãos	Corante	China
<i>Neurospora sitophila</i> <i>N. crassa</i> <i>N. intermedia</i>		Torta (amendoim prensado)	Oncom	Torta	Iguaria	Indonésia
<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Candida</i>	Leite curado	Queijo roquefort, gorgonzola	Torta		Ocidente
<i>Penicillium camemberti</i> <i>P. candidum</i> <i>P. caseicolum</i>	<i>Bacillus</i> <i>Candida</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulopsis</i>	Leite curado	Queijo camembert	Torta		Ocidente
<i>Penicillium nalgiovense</i> <i>A. chryso- genum</i> <i>B.</i>		Carne	Bauerns - peck salame	Pernil embutido	Iguaria	Europa
<i>Rhizopus oligosporus</i>		Soja	Tempe bongkrek	Torta	Iguaria	Indonésia
<i>Rhizopus oligosporus</i>		torta (côco prensado)	tempe bongkrek	Torta	Iguaria	Indonésia

Fonte: DJIEN, 1988

## 2.2 Bioquímica da deterioração do pescado

### 2.2.1 Evolução *post mortem*

A primeira mudança sensorial do peixe após a captura e durante a estocagem se relaciona com a aparência e a textura. A caracterização do sabor das espécies é normalmente desenvolvida nos primeiros 2 dias de conservação sob refrigeração em gelo, mas a maior mudança acontece no estado do *rigor mortis* (HUSTIN, 1991).

LINDEN e LORIENT (1994), ao estudarem os processos bioquímicos envolvidos na deterioração do pescado, verificaram que, imediatamente após a morte, o músculo se apresenta totalmente relaxado, com uma textura flácida e elástica, usualmente persistindo por algumas horas, quando então, o músculo se contrai. E, quando isto acontece, todo o corpo se apresenta bastante rígido; o peixe entra no estado de *rigor mortis*. Normalmente, estas condições podem durar até 12 horas. A seguir, o *rigor* se modifica e um novo estado mostra o músculo relaxado e flácido, mas, muito diferente da elasticidade apresentada anteriormente ao *rigor*.

Segundo KORHONEN e LANIER (1990), a relação entre estes fenômenos varia com as espécies e é afetada pela temperatura, manipulação, tamanho e condições físicas do peixe (Tabela 1). O efeito da temperatura no *rigor mortis* não é uniforme para todas as espécies. Assim que, para o bacalhau (*Gadus morhua*), as temperaturas mais elevadas provocam de uma só vez a rigidez muscular, ocasionando um *rigor mortis* mais estável e durável. Esta manutenção da rigidez poderá se explicada através da maior ou menor fragilidade do tecido conectivo e pela ruptura das fibras musculares.

IWAMOTO et al. (1987), com base na atividade metabólica envolvida com a musculatura do pescado, mencionam que, geralmente a entrada no estado de *rigor mortis* é mais rápida e com um tempo de duração maior nas temperaturas mais elevadas; peixes tropicais mostram o efeito oposto. Isto fica bastante evidente quando determinadas espécies apresentam a entrada neste estado muito mais rápida na temperatura de 0 °C do que a 10 °C, mostrando uma boa correlação com a estimulação das trocas bioquímicas nesta temperatura mais reduzida.

Na publicação da FAO (1995), é encontrado considerações de ABE e OKUMA (1991) sobre pesquisas com carpas (*Cyprinus carpio*), mostrando que, a rápida

entrada no estado de *rigor mortis* depende da diferença entre a temperatura da água do mar e aquela em que imediatamente o peixe for conservado. Quanto maior a diferença, mais rápida é a entrada no *rigor* e vice - versa.

Ao considerar os efeitos relacionados com a manutenção da qualidade do pescado após a captura, WHEATON e LAWSON (1985) descreveram que, o início imediato do estado de *rigor mortis* dependerá de vários fatores: estado nutricional, reserva de glicogênio e o estresse no momento da captura. O atordoamento e morte por hipotermia (água resfriada) proporcionam um aumento do tempo no estado de *rigor mortis* e, se o peixe for eviscerado e descabeçado imediatamente, este tempo poderá se estender até 18 horas.

Segundo BERTULLO (1975), o *rigor mortis* é de grande importância quando o peixe é filetado. No *rigor mortis*, o corpo do peixe está rígido e a operação de filetagem poderá se processar desuniformemente, causando fendas ou cortes irregulares no filé.

Por outro lado, trabalhos da FAO (1995) mencionam que, se o peixe for cozido no estado de *pré-rigor*, a textura final poderá se apresentar amolecida e pastosa. Contrastando, a textura se apresentará mais rígida quando o peixe for cozido no estado de *rigor mortis*. No *post-rigor*, o músculo deverá se apresentar firme, suculento e elástico. O peixe inteiro e os filés congelados no *pré - rigor* podem fornecer bons produtos se forem descongelados sob baixas temperaturas e de forma lenta, no estado de *rigor mortis*.

Vários trabalhos (PINHEIRO, 1979; MACHADO, 1984; WHEATON e LAWSON, 1985; IWAMOTO et al., 1987; BEIRÃO, 1988; OSCAR et al., 1989; KORHONEN e LANIER, 1990) mostraram que, a qualidade do pescado *in natura* e a importância de uma adequada avaliação sensorial no momento do recebimento ou descarga, não são determinadas somente pela aparência, textura e odor. Os atributos sensoriais envolvem outras características como; estado das vísceras, coluna vertebral, peritônio, cavidade abdominal, guelras, olhos e músculos do abdome. A maioria das tabelas que relacionam uma classificação por pontuação com a deterioração do pescado está baseada nas mudanças da qualidade que se verificam durante a estocagem sob resfriamento em gelo.

Tabela 1: Duração do *rigor mortis* de várias espécies de peixes

Espécie	Condições de captura	Temperatura (°C)	Tempo entre a morte e início do <i>rigor mortis</i> (h)	Tempo entre a morte e final do <i>rigor mortis</i> (h)
Badejo ( <i>Epinephelus malabaricus</i> )	Não estressado	2	2	18
Tilápial azul ( <i>Areochromis aureus</i> )	Estressada	0	1	-
	Não estressada	0	6	-
Tilápia ( <i>Tilapia mossambica</i> )	Não estressada	0 - 2	2 - 9	26
Merluza de cola ( <i>Macruronus magellanicus</i> )	Estressada	0	< 1	35 - 55
Anchoita ( <i>Engraulis anchoita</i> )	Estressada	0	20 - 30	18
Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> )		0	8	
		10	60	
		20	16	
	Estressada	0	1	
	Não estressada	0	6	

Fonte: NAZIR e MAGAR, 1963; PAWAR e MAGAR, 1965; PARTMANN, 1965; TRUCCO et al., 1982; IWAMOTO et al., 1987; KORHONEN et al., 1990; HWANG et al., 1991; NAKAYAMA et al., 1992, citados pela FAO, 1995.

A FAO (1995) preconiza que, a caracterização da deterioração do peixe seja dividida em quatro fases:

- na primeira, o estágio caracteriza o peixe fresco (até 3 dias após a captura), apresentando odor de algas marinhas e sabor específico para cada espécie;

- na segunda, há uma diminuição do odor e do sabor característicos;

A carne apresenta uma certa neutralidade relacionada com as características sensoriais de cada espécie. A textura se apresenta, ainda, bastante aceitável;

- na terceira fase, há evidências da formação de substâncias voláteis. O odor se torna desagradável. Este efeito dependerá da espécie microbiana envolvida no metabolismo, atuante como microbiota natural ou contaminante, na forma aeróbica ou anaeróbica;

Segundo BERTULLO (1975), um dos compostos voláteis desenvolvidos, é a trimetilamina (TMA), derivada da redução microbiana do óxido de trimetilamina

(OTMA). A formação da TMA é uma característica própria do pescado e, nesta fase de formação de bases voláteis, há uma gradual produção de odores desagradáveis que lembram frutas ácidas e odor a ranço, principalmente para as espécies com maior teor de lipídios. No final deste estágio, é evidenciada a presença de odores amoniacais, sulfurosos ou rançosos, semelhantes a repolho apodrecido. A textura poderá se apresentar bastante flácida e úmida ou rígida e dessecada, dependendo do tipo da deterioração,

- na quarta fase, o peixe é considerado deteriorado. O processo é sempre irreversível.

### **2.2.2 Reações autolíticas**

Os músculos dos peixes vivos são estéreis. Imediatamente após a captura, a flora bacteriana se encontra em três localizações principais: na superfície ou no limo externo, nas guelras e nas vísceras. Em função do tempo e da temperatura de conservação, dois tipos de deterioração poderão se desenvolver, uma enzimática e outra bacteriana (JAY, 1978).

UCHYAMA e EHIRA (1974), citados pela FAO (1995), mostraram que, para o bacalhau (*Gadus morhua*) e o atum (*Thunnus thynnus*), o metabolismo enzimático influencia o frescor destas espécies e não se relaciona com as qualidades microbiológicas. Em determinadas espécies, a autólise enzimática predomina imediatamente após a captura, somando-se aos processos microbiológicos que acontecem logo em seguida, acelerando a deterioração do peixe resfriado. Após a morte, o suprimento de oxigênio nos tecidos musculares é interrompido porque o sangue não é mais bombeado pelo coração e, não atinge as guelras (órgãos importantes na manutenção da respiração dos peixes e de alguns anfíbios). Não somente o oxigênio tem importância na manutenção da respiração, mas também a produção de energia proveniente da ingestão de nutrientes.

Segundo BRAVERMAN (1976), o glicogênio, as proteínas ou o lipídio são oxidados por meio de enzimas tissulares numa série de reações aeróbicas ou anaeróbicas para produzirem produtos finais como: CO<sub>2</sub>, ATP e H<sub>2</sub>O. Apesar de muitos crustáceos manterem a respiração fora d'água por absorção do oxigênio

atmosférico, mesmo que por um período limitado, o processo aeróbico sempre dependerá da presença contínua do oxigênio, utilizando o sistema circulatório. Sob condições anaeróbicas, a adenosina tri - fosfato (ATP) pode ser sintetizada para a obtenção de energia por duas importantes vias: a creatina fosfato e a arginina fosfato, restrita ao músculo dos vertebrados (peixes teleósteos). Alguns invertebrados como os cefalópodes mostram características relacionadas com a segunda via, a arginina fosfato. Mas, em ambos os casos, a produção de ATP é interrompida quando a creatina ou a arginina fosfato são consumidas. Para a maioria dos teleósteos, a glicólise é a única via possível para a produção de energia quando o coração pára de bater. E este fenômeno tem como produtos finais, o ácido láctico e o pirúvico. Normalmente, 2 moléculas de ATP são produzidas na via glicolítica por molécula de glicose oxidada, se comparada com as 36 de ATP produzidas por molécula de glicose quando os produtos finais são oxidados aerobicamente na mitocôndria, no peixe vivo. Após a morte, quando a anaerobiose muscular não consegue manter o nível de ATP ou quando este índice intracelular se reduz de 7 ou 10  $\mu\text{moles}$  para menos de 1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de tecido, o músculo entra no *rigor mortis*.

Segundo WHEATON e LAWSON (1985), a glicólise *post mortem* resulta na acumulação de ácido láctico com uma redução no pH muscular.

Para o bacalhau (*Gadus morhua*), a redução do pH pode variar de 6,8 para 6,1 e, em outras espécies a redução pode até ser mais acentuada. Para a cavalinha-de-reis (*Decapterus macarellus*), o pH pode atingir 5,8 a 6 e, para o atum (*Thunnus thynnus*), 5,4 a 5,6. Entretanto, conforme vários trabalhos (BERTULLO, 1975; WHEATON e LAWSON, 1985; KAI e MORAIS, 1988; FAO, 1995), estes valores no *post mortem* não são comuns para a maioria dos teleósteos marinhos, assim como para os músculos dos mamíferos. No processo metabólico, o conteúdo de ácido láctico produzido é proporcional ao teor de carboidrato (glicogênio) disponível no tecido vivo. O músculo dos peixes apresenta um reduzido teor de glicogênio comparado com o dos mamíferos, gerando menos quantidade de ácido láctico após a morte.

Segundo JAY (1978), pelos níveis relativamente altos de glicogênio, a deterioração de moluscos é basicamente fermentativa e, indica a determinação do pH como referencial para estabelecer a qualidade microbiológica deste pescado. Aparentemente, a medida do pH é mais significativa que a determinação de bases voláteis nitrogenadas, para detectar alterações na maioria dos moluscos.

O estado nutricional do peixe e o estresse na captura têm um grande efeito no residual de glicogênio acumulado e conseqüentemente no pH do *post mortem*. CHIBA et al. (1991) comprovaram que alguns minutos de estresse antes da captura resultam em uma diminuição de 0,5 unidade de pH em 3 horas, para 0,1 unidade no mesmo período, relacionado a uma captura não estressada. A redução do pH do peixe no *post mortem* tem um efeito sobre as propriedades físicas do músculo. Quando o pH reduz, há uma desnaturação parcial das proteínas com a diminuição da capacidade de absorção de água.

Somente a ATP não supre a necessidade energética exigida para a contração muscular. Esta contração é controlada por íons  $\text{Ca}^{+2}$  e por algumas enzimas, como as ATPases que podem ser encontradas em muitas células musculares. Quando o valor da concentração dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  intramuscular é maior que  $1\mu\text{mol}$ , estes íons ativam as ATPases, reduzindo o conteúdo de ATP livre no músculo, resultando em uma interação entre as proteínas actina e miosina, causando a contração. Isto tem como resultado, o encurtamento das fibras com posterior rigidez muscular (FAO, 1995).

A passagem pelo estado de *rigor mortis* é uma operação rápida, resultando no relaxamento do tecido muscular, causado pela ativação de uma ou mais enzimas tissulares que digerem componentes complexos de forma contínua. A flacidez muscular após o *rigor mortis* e, eventualmente a deterioração, coincide com as variações autolíticas. Entre as transformações metabólicas que se desenvolvem após a morte, uma das primeiras a serem reconhecidas foi a degradação da ATP para a formar adenosina di - fosfato (ADP), adenosina mono - fosfato (AMP), inosina mono - fosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx). O catabolismo da ATP se processa da mesma maneira para todos os peixes, mas a velocidade individual de cada reação, de um catabólito para outro, varia entre as espécies e esta progressão coincide com as características da deterioração. De acordo com a FAO (1995), o frescor do peixe, baseado nestas mudanças autolíticas, pode ser definido pela expressão:



$$K (\%) = \frac{[\text{Ino}] + [\text{Hx}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{Ino}] + [\text{Hx}]} \times 100$$

Assim que, [ATP], [ADP], [AMP], [IMP], [Ino] e [Hx] representam a concentração média destes compostos no músculo do peixe, medida em vários tempos no período de conservação. O valor K ou índice de frescor tem por base as trocas autolíticas que acontecem no *post mortem* durante a estocagem do músculo. Um alto valor de K significa um baixo frescor. A degradação de nucleotídeos é apenas coincidente com as trocas percebidas em relação ao frescor e não necessariamente relatam a causa da deterioração. Apenas a concentração de hipoxantina pode ser considerada como responsável, com efeito, na produção de odores do peixe deteriorado, assim como, é normalmente aceite que a inosina mono-fosfato é a responsável pelo desejável sabor presente nos produtos de boa qualidade.

SURETTE et al. (1988), citados pela FAO (1995), estudaram a autólise do bacalhau (*Gadus morhua*) submetido a uma operação de esterilização e a relacionaram com o catabólito ATP. As relações de formação e redução da IMP para ambas as amostras, esterilizadas ou não, indicam que a via catabólica para a degradação da adenosina tri – fosfato, através da inosina, é exclusivamente devido às enzimas autolíticas. A conversão da inosina para hipoxantina é acelerada, em mais ou menos 2 dias para as amostras não esterilizadas, sugerindo que a enzima bacteriana nucleotídeo fosforilase é a maior responsável pela produção de hipoxantina no *post mortem*, da amostra refrigerada. Existe uma variação na degradação dos vários nucleotídeos entre as espécies de pescado, indicando uma variação no conteúdo de hipoxantina. Entretanto, a determinação de hipoxantina não apresenta valores iguais para espécies semelhantes.

### 2.2.3 Enzimas proteolíticas

Muitas proteases têm sido isoladas dos músculos de várias espécies de peixes e os efeitos proteolíticos relatados estão sempre relacionados com a flacidez dos tecidos. Um dos exemplos mais notáveis de proteólise autolítica é a incidência do abdome rompido em espécies pelágicas, como o arenque (*Clupea harengus*). Este tipo de flacidez muscular é predominante nos meses de verão quando estas espécies se alimentam melhor, particularmente acima do normal. O baixo peso molecular dos peptídios e a produção de aminoácidos pela autólise de proteínas, não somente reduz a aceitação comercial dos pelágicos, mas também acelera o crescimento de bactérias deteriorantes. A deterioração bacteriana através da autólise resulta na descarboxilação de aminoácidos com produção de aminas biogênicas, reduzindo o valor nutritivo (FAO, 1995).

BOTTA et al. (1992), sugere que a autólise da cavidade visceral está mais relacionada com as práticas inadequadas de manipulação do que com os fatores biológicos como; o tamanho do peixe, presença do conteúdo estomacal ou espécies ovadas.

#### 2.2.3.1 Catepsinas

Várias enzimas proteolíticas estão presentes nos músculos dos peixes e percebe-se que as catepsinas são mencionadas como as mais importantes com relação aos seus efeitos (LINDEN e LORIENT, 1994). As catepsinas são usualmente consideradas como proteases ácidas, encontradas no interior das células, nas microscópicas organelas (lisossomos). Nos tecidos vivos, as proteases lisossomais são responsáveis pela quebra das proteínas em situações de injúria. Estas enzimas se mostram inativas nos tecidos vivos, mas são liberadas nos sucos celulares pelo abuso físico, como em situações de congelamento e descongelamento do músculo no *post mortem*.

De acordo com HUSTIN (1991), as catepsinas D e L são as mais relacionadas com a degradação autolítica dos tecidos musculares.

YAMASHITA e KONOGAYA (1990), citados pela FAO (1995), mostraram que a catepsina L tem implicações com a flacidez muscular do salmão (*Salmo salar*)

durante a migração para a desova. Foram as enzimas (catepsinas L) que mais contribuíram para a autólise do músculo, acelerando a digestão das proteínas miofibrilares do tecido conectivo. A evidencia da implicação das catepsinas L, ficou demonstrado através da eletroforese das miofibrilas tratadas com esta enzima; elas apresentaram padrões idênticos àsquelas encontradas no músculo do salmão durante a desova. A atividade da catepsina L tem relação com a textura muscular. A habilidade autolítica determinada por medição da atividade desta enzima, sempre foi mais elevada nos tecidos que sofreram congelamento e posterior descongelamento, do que no peixe fresco. O congelamento com posterior descongelamento tem efeito na diminuição da resistência das membranas celulares, permitindo uma maior atividade autolítica através de reações enzimáticas com os substratos naturais. Por um outro lado, as catepsinas podem ser induzidas intencionalmente para promoverem trocas autolíticas, como em determinadas operações utilizadas para a obtenção de alimentos fermentados. No Japão, produtos fermentados de lulas (*Omnastrephes sp.*) e carpas (*Mylopharyngodon piceus*) têm as catepsinas como responsáveis pelas alterações na textura destes alimentos.

### **2.2.3.2 Calpaínas**

Segundo HUSTIN (1991), as calpaínas fazem parte do segundo grupo das proteases intracelulares denominadas *fator - cálcio - ativado* (FCA) associadas com a autólise muscular e encontradas em músculos, barbatanas ou nadadeiras de peixes e em determinados crustáceos.

A maior parte das calpaínas é ativada pelo pH fisiológico que, por decorrência, influenciam a flacidez do pescado durante a conservação sob refrigeração. As calpaínas dos músculos dos vertebrados são conhecidas pela suas especificidades, como: digestão da troponina - T, desmina, titina e nebulina, mas com fraca atividade sobre a actina e a miosina. Contrastando, as calpaínas do pescado digerem a miosina e, em especial a miosina de cadeia longa para formar fragmentos com peso molecular equivalente a 150.000 D (FAO, 1995). Mais ativas na baixa temperatura (em comparação com as calpaínas dos mamíferos), elas apresentam reações de clivagem (fragmentação), específicas para cada espécie de pescado, com elevada atividade sobre a miosina que possui baixa estabilidade.

Peixes adaptados em ambientes aquáticos com baixas temperaturas são mais suscetíveis à autólise do que aqueles oriundos de águas tropicais.

### 2.2.3.3 Colagenases

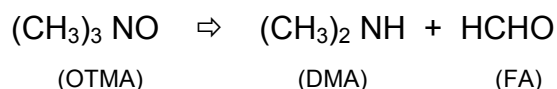
Segundo WHEATON e LAWSON (1985), os músculos dos teleósteos estão divididos em blocos de células musculares, separados em miotomos (miômeros) e isolados pelo tecido conectivo conhecido por miocomata. Os miotomos se caracterizam por lamínulas de miofibrilas com comprimento igual ou inferior a 3 cm. E, cada fibra, é envolvida com tecido conectivo que se liga a miocomata através de terminais celulares por meio de fibrilas colagenosas.

Trabalhando com determinadas espécies, BREMNER e HALLETT (1985) determinaram que durante a estocagem resfriada, estas fibrilas se deterioram. Outros pesquisadores (LINDEN e LORIENT, 1994), estudando o colágeno de determinadas espécies de peixes e identificaram que, a proporção deste componente é menor no músculo do pescado do que no dos mamíferos e, apresenta uma débil resistência, com efeito, de gelatinização a partir de temperaturas entre 35 e 40 °C. O colágeno bovino gelatiniza somente em temperaturas próximas de 60 °C.

Baseado nestas considerações, SATO et al. (1991), citados pela FAO (1995), comprovaram a diminuição da textura do músculo de algumas espécies de peixes à medida que o conteúdo de colágeno (tipo V) se reduzia por solubilização. Presuntivamente, ambos os efeitos resultaram da ação autolítica das enzimas colagenases. São elas, as causadoras do *gaping*, promovendo o rompimento dos miotomas durante a estocagem prolongada do peixe resfriado ou durante as curtas estocagens a altas temperaturas. Para o bacalhau do Atlântico (*Microgadus tomcod*), a manutenção em uma temperatura acima de 17 °C induz a formação do *gaping*, devido a degradação do tecido conectivo e do rápido encurtamento das fibras musculares. A origem destas enzimas colagenosas é sempre o hepatopâncreas (órgão de digestão).

### 2.2.4 Redução do OTMA

HUSTIN (1991) descreveu que, a redução do óxido de trimetilamina (OTMA), um composto osmoregulador presente nos teleósteos marinhos é usualmente devido a ação bacteriana, mas se algumas enzimas estiverem presentes, poderá haver uma ativação para a redução do OTMA em dimetilamina (DMA) e formaldeído (FA):



É importante observar que o conteúdo de FA produzido é equivalente ao conteúdo de DMA formado. O formaldeído induz a formação de pontes cruzadas entre as proteínas musculares, aumentando a rigidez muscular e reduzindo a capacidade de absorção de água. As enzimas responsáveis pela formação do FA são chamadas de OTMA - ases ou OTMA dimetilases, regularmente encontradas nos gadídeos. Os músculos escuros ou vermelhos possuem uma atividade enzimática maior do que os músculos mais claros, entretanto outros tecidos como o baço, bexiga e vesícula biliar, possuem uma quantidade significativa destas enzimas, as OTMA - ases, precursoras na formação do formaldeído. É importante que a carne cominutada ou o *minced fish* esteja completamente livre do tecido destes órgãos no momento do congelamento para evitar possíveis contaminações e o desencadeamento desta atividade metabólica. O aumento do teor de formaldeído é sempre decorrência da falta das Boas Práticas de Manipulação (BPM) durante a captura, da excessiva demora no resfriamento e das flutuações da temperatura de estocagem. Na prática, várias medidas evitam a autólise para a produção do formaldeído, como a conservação do peixe a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a minimização das variações de temperatura durante a estocagem, o cuidado com a pressão durante o congelamento e o excesso de manipulação. O mais importante dos fatores que originam a autólise é o rompimento físico das células musculares (BREMNER e HALLETT, 1985).

As atividades autolíticas que afetam a estabilidade do peixe fresco estão resumidas na Quadro 2. Comparando os compostos químicos que se desenvolvem naturalmente na deterioração do pescado, podemos observar que a maioria é volátil, produzidos por bactérias (Quadro 3). Estes compostos incluem: trimetilamina,

sulfurados voláteis, aldeídos, cetonas, ésteres e hipoxantina. Os substratos para a produção destes voláteis são: carboidratos, nucleotídeos (IMP e Ino) e aminoácidos (KORHONEN e LANIER, 1990; HUSTIN, 1991).

Quadro 2: Atividades autolíticas relacionadas com a estabilidade do peixe fresco

Enzima	Substrato	Reação	Prevenção
Glicolíticas	Glicogênio	- Produção ác.lático → baixo pH (tecidos) → reduz retenção de água  - Temperatura alta no <i>rigor</i> → <i>gaping</i>	- Temperatura de 0 °C ( <i>rigor mortis</i> )  - Estresse ( <i>pré-rigor</i> )
Autolíticas sobre os nucleotídeos	ATP ADP AMP IMP	- Perda de sabor do peixe fresco → amargor → formação de Hx	- Estresse - BPM - Compressão muscular
Catepsinas	Proteínas e peptídeos	- Flacidez dos tecidos → dificuldade operacional	- BPM
Tripsinas, carboxi-peptidases	Proteínas e peptídeos	- Autólise (cavidade visceral) p/pelágicos	- Cong. → desc. - Estocagem
Calpaínas	Proteínas miofibrilares	- Flacidez (crustáceos)	- Remover Ca?
Colagenases	Tecido conectivo	- <i>Gaping</i>	- Degradação do tecido conjuntivo relacionado c/ tempo x temperatura de estocagem
OTMA - dimetilases	OTMA	- Formaldeído → rigidez (gadídeos congelados)	- Estocagem a - 30 °C - Não cong. x desc. - >FA → >rigidez

Fonte: FAO, 1995.

O desenvolvimento inicial dos microrganismos na superfície do peixe se processa de forma aeróbica, utilizando substratos como os carboidratos e o oxigênio (receptor de elétrons), com produção de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. O grande consumo de oxigênio pelos microrganismos resulta na formação de nichos anaeróbicos ou microaerófilos, indicando a existência de concentrações de contaminantes. Porém, este processo necessariamente não favorece o crescimento de bactérias anaeróbicas (HUSTIN, 1991).

De acordo com LISTON (1980), a melhor conservação do peixe proveniente de águas tropicais, seria devido a presença de uma microbiota tipicamente mesofílica, pouco adaptada às temperaturas de refrigeração. Além disso, esta microbiota teria atividade metabólica diversa da psicrotrófica, com menor produção de compostos de degradação. Em climas tropicais há sempre uma considerável lavagem da superfície do peixe pelo degelo durante a armazenagem sob refrigeração com gelo em escamas.

De acordo com a FAO (1995), o teor de trimetilamina encontrado no peixe fresco que poderia ser rejeitado pela análise sensorial é variável entre as espécies e é fixado entre 10 e 15 mg TMA - N/100 g músculo (estocagem aeróbica).

Com relação à atividade microbiana, a redução do OTMA pode ser associada a vários microrganismos, típicos do meio, como: *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* e *Shewanella putrefaciens*. Vários estudos (RINGO et al., 1984; GIBSON, 1991) sobre os processos fermentativos, relacionam a redução do OTMA por bactérias anaeróbicas facultativas como a *E. coli*, *Proteus* sp. e espécies não fermentativas como *Shewanella putrefaciens*. O OTMA é um composto característico dos peixes marinhos, mas pode ser encontrado em conteúdos elevados em determinadas espécies de água doce.

Nos gadídeos, a trimetilamina faz parte das bases voláteis totais (BVT) que surge com a deterioração do pescado. Quando o suprimento de OTMA é decomposto e a TMA alcança o máximo valor, as bases voláteis podem originar a formação de amônia. Em espécies que não apresentam OTMA ou quando a deterioração é devida à microbiota não redutora do OTMA, mesmo assim, durante a estocagem poderá haver a formação de uma pequena quantidade de BVT, provavelmente resultante da desaminação de aminoácidos (FAO, 1995). Os voláteis sulfurados são típicos compostos da deterioração e muitas bactérias identificadas como deterioradoras específicas, podem produzir um ou vários destes compostos. *S. putrefaciens* e algumas *Vibrionaceae*s produzem gás sulfídrico a partir de aminoácidos contendo enxofre na molécula, como a L - cisteína. Contrariamente, *Pseudomonas* e *P. phosphoreum* não são capazes de produzir quantidades significativas deste gás. Outros compostos como as metilmercaptanas e os dimetilsulfetos também são produzidos a partir de aminoácidos contendo enxofre na molécula, como a metionina (Quadro 3). Os compostos sulfurados voláteis produzem

odores desagradáveis e podem ser detectados em nível de partes por bilhão (ppb). Mínimas quantidades podem afetar consideravelmente a qualidade do pescado (STENSTROEN e MOLIN, 1990).

Quadro 3: Substratos e compostos responsáveis por odores e sabores relacionados com a deterioração microbiana

Substrato	Metabólitos
OTMA	TMA
Cisteína	H <sub>2</sub> S
Metionina	CH <sub>3</sub> SH, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S
Carboidratos e lactatos	Acetato, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
IMP, Ino	Hx
Aminoácidos (glicina, serina, leucina)	Ésteres, aldeídos, cetonas
Aminoácidos, uréia	NH <sub>3</sub>

Fonte: FAO, 1995.

Quadro 4: Compostos resultantes da deterioração do pescado na estocagem; resfriado (aeróbica), resfriado (embalada) e à temperatura ambiente

Microrganismos	Metabólitos
<i>Shewanella putrefaciens</i>	TMA, H <sub>2</sub> S, CH <sub>3</sub> SH, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S, Hx
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	TMA, Hx
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cetonas, aldeídos, ésteres, sulfitos
<i>Vibrionaceae</i>	TMA, H <sub>2</sub> S
Deterioradores anaeróbios	NH <sub>3</sub> , ác. acético, butírico, propiônico

Fonte: FAO, 1995.

Segundo EDWARDS et al. (1987), a decomposição de carnes resfriadas por *Pseudomonas* sp. também pode produzir sabores e odores sulfidrílicos com



formação de aldeídos, cetonas, ésteres e sulfitos voláteis a partir da decomposição de aminoácidos monoamínicos ou monocarboxílicos. Para LISTON (1980), outros compostos ainda podem ser formados, como etilmercaptanas, diacetil, propionaldeídos, metanol, butanol e metilbutanol. O Quadro 4 caracteriza os compostos resultantes da deterioração do pescado por vários microrganismos.

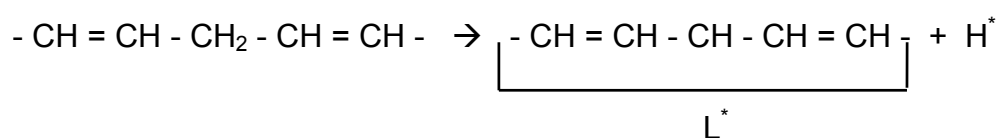
### **2.2.5 Oxidação de lipídios**

A deterioração biológica de aminoácidos pode seguir diferentes vias: desaminação oxidativa ou redutora, produção de gás sulfídrico, formação de indol a partir do triptofano e redução do OTMA. Segundo BRAVERMAN (1976), a desaminação redutora é realizada por microrganismos estritamente anaeróbios, que produzem amônia e ácidos carboxílicos não substituídos (ácidos graxos). A produção de ácidos graxos voláteis de baixo peso molecular como o ácido fórmico, acético, propiônico e valérico, indicam a deterioração do pescado.

Para outros pesquisadores, como KAI e MORAIS (1988), durante a estocagem resfriada das espécies gordurosas, as reações sobre as frações lipídicas são causadas quase que exclusivamente por oxidação química, mostrando que o metabolismo bacteriano contribui muito pouco para a deterioração. As duas reações (independentes) mais importantes envolvendo os lipídios, relacionadas com a perda de qualidade são: a oxidação e a hidrólise, resultando na produção de uma variada quantidade de substâncias que apresentam um desagradável aroma e sabor a ranço. As várias reações envolvidas podem ser de natureza não - enzimáticas ou catalisadas por enzimas microbianas intracelulares ou digestivas da própria espécie. A relativa significância destas reações dependerá sempre da espécie e da temperatura de conservação (FAO, 1995).

As gorduras são particularmente suscetíveis à degradação e podem afetar a qualidade do peixe durante a estocagem, mesmo em temperaturas inferiores a 0 °C. Os lipídios presentes nos teleósteos podem ser divididos em dois grandes grupos: os fosfolipídios e os triglicerídios. Os fosfolipídios são aqueles que integram a estrutura das membranas celulares, também chamados de lipídios estruturais. Juntamente com os fosfolipídios, as membranas possuem frações de colesterol e, nos peixes magros, estas frações correspondem a aproximadamente 6 % do total

dos lipídios, semelhante aos mamíferos. Os triglicerídios são as reservas energéticas situadas nos depósitos de gorduras. Estas células gordurosas são circundadas naturalmente por membranas de fosfolipídios e por uma frágil rede colagenosa. O músculo claro de um peixe magro contém cerca de 1% de lipídios e, deste, 90% são fosfolipídios. A fração fosfolipídica nos músculos dos peixes magros é quase sempre constituída por 69% de fosfatidilcolina, 19% de fosfatidiletanolamina e 5% de fosfatidil-serina (FAO, 1995). Um grande conteúdo de ácidos graxos polinsaturados encontrados nos lipídios dos peixes são altamente suscetíveis à oxidação por meio de mecanismos autocatalíticos, como mostra a Figura 4. Com relação a autooxidação, o processo inicia com a perda de um átomo de hidrogênio do carbono central da estrutura pentadieno, encontrada na maioria das cadeias de ácidos graxos com mais de uma liga dupla. Considerando a molécula inicial, por efeito contrário, o radical lipídico ( $L^*$ ) reage com o oxigênio atmosférico ( $O_2$ ) formando um radical peróxido ( $LOO^*$ ), que agora pode receber um átomo de hidrogênio ( $H^*$ ) de uma outra cadeia, resultando em um hidroperóxido ( $LOOH$ ) e um novo radical ( $L^*$ ). Esta propagação continua até que um dos radicais seja removido através de um antioxidante ( $AH$ ), resultando num radical ( $A^*$ ), que é muito menos reativo. O radical lipídico  $L^*$  é definido pela expressão:



Os hidroperóxidos produzidos são insípidos e surpreendentemente são utilizados como referenciais de qualidade, representado por um “índice de peróxido” relacionado pobremente com as propriedades sensoriais. Os hidroperóxidos são facilmente decompostos por autooxidação catalisada por íons metálicos, produzindo aldeídos, cetonas, álcoois ou ácidos carboxílicos com formação de odores e mudanças na coloração. A maioria dos aldeídos pode ser determinada analiticamente por reações com o ácido tiobarbitúrico. Os hidroperóxidos também podem ser produzidos por processos enzimáticos catalizados por enzimas lipoxigenases, presentes nas guelras e na pele, em quantidades variáveis com a espécie. Devido a fraca estabilidade, a enzima é importante apenas para a oxidação lipídica do peixe fresco. O simples cozimento ou o congelamento com posterior

descongelamento, anula esta atividade. As células possuem mecanismos protetores direcionados para a oxidação lipídica, como a enzima glutathiona peroxidase. Semelhantemente, as membranas contêm o composto fenólico  $\alpha$  - tocoferol (Vitamina E), considerado o mais importante antioxidante natural. O tocoferol pode doar um átomo de hidrogênio para o radical ( $L^*$ ) ou ( $LOO^*$ ), funcionando como a molécula (AH), conforme a Figura 4. A reação entre o radical tocoferol com o ácido ascórbico (Vitamina C) na interface lipídio/água, regenera uma molécula de tocoferol. Outros compostos, como os carotenóides e os fenóis, também possuem a função antioxidante (FAO, 1995).

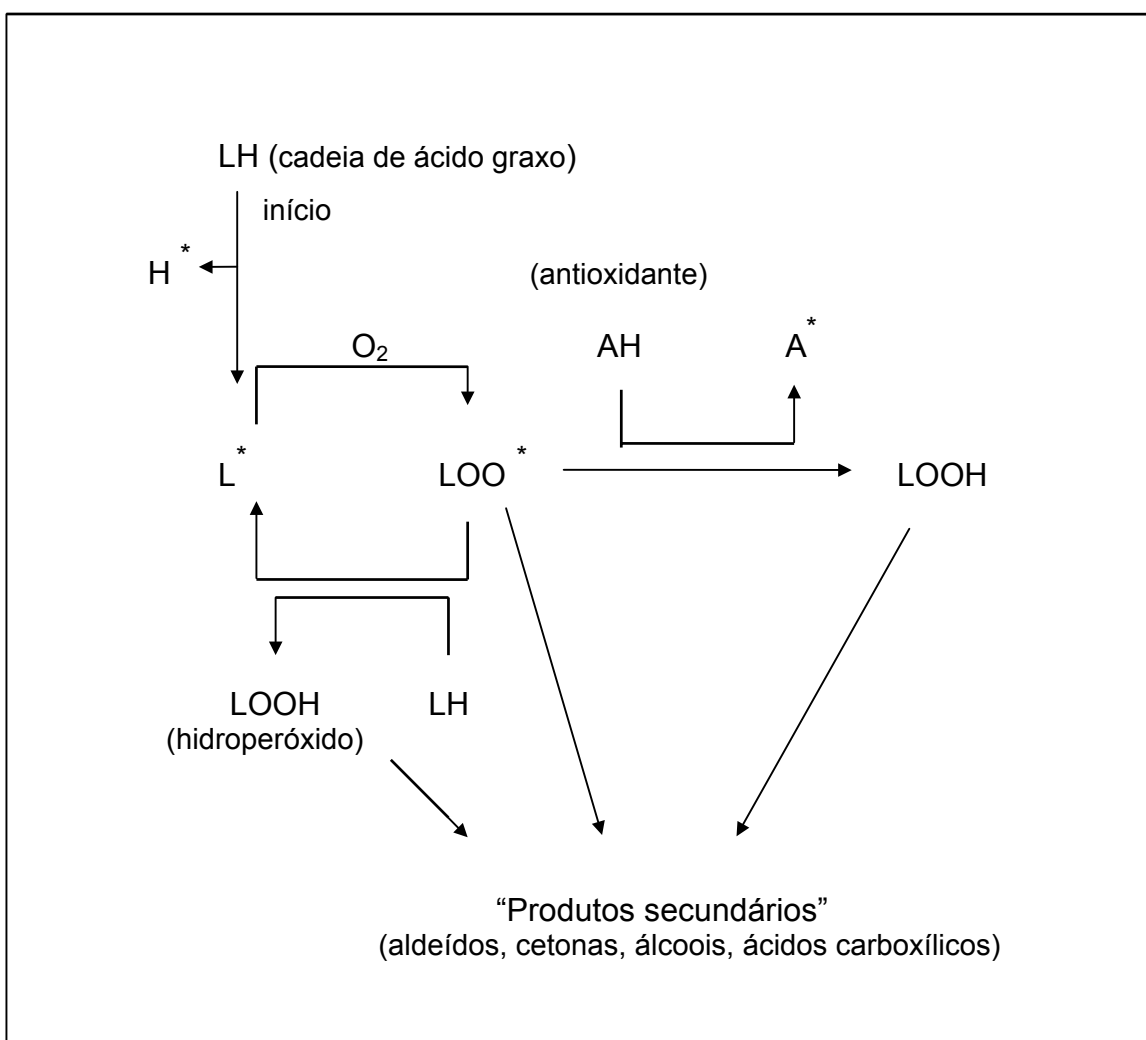


Figura 1: Autooxidação de lipídios polinsaturados

Fonte: FAO, 1995.

## 2.3 Sardinha

O parque industrial pesqueiro é composto por aproximadamente 300 empresas que trabalham, sobretudo, com os recursos que apresentam uma maior produção ou valor na pauta de exportação e com diversas linhas de processamento. Dos peixes frescos, resfriados ou congelados, os principais produtos exportados, tanto em quantidade quanto em valor, são oriundos das mais variadas espécies de atuns (*Katsuwonus pelamis*, *Thunnus obesus*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus albacares*, *Xiphias gladius*) vindo em seguida a piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*), a sardinha (*Sardinella brasiliensis*), o pargo - rosa (*Lutjanus purpureus*), a corvina (*Micropogonia furnieri*) e a castanha (*Umbrina canosai*), isto no tocante às quantidades. Quanto ao valor comercial, a segunda espécie é o pargo - rosa (*Lutjanus purpureus*) (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS-IBAMA, 1994).

Um aspecto curioso a se registrar no processo de produção, comercialização e distribuição da produção nacional de pescado marinho do Brasil é que, a região Nordeste é pobre em recursos com biomassa individual elevada, destacando-se, entretanto, por possuir produtos nobres, com elevado preço no mercado internacional, como a lagosta e o pargo - rosa. Já no Sul/Sudeste (com maior renda *per capita*), encontram-se cardumes com biomassa individual elevada, como a sardinha com baixo preço de mercado, mais acessível à população do Nordeste. Este ponto ilustra, em parte, o fluxo de mercado de alguns dos produtos pesqueiros (NETO e DORNELES, 1996). Nas regiões Norte e Nordeste predominam a linha de congelados destinados ao mercado externo, beneficiando, majoritariamente o camarão, a piramutaba, a lagosta e o pargo. Nas regiões Sudeste e Sul, as indústrias apresentam uma infra - estrutura direcionada para a produção de conservas de sardinha e bonito, e produtos resfriados/congelados voltados em sua maior parte para o mercado interno. Esse parque possui uma estrutura de beneficiamento superdimensionada em função do restrito potencial das espécies ora capturadas ou do potencial produtivo da área de abrangência e, atualmente, vem operando com elevado nível de ociosidade. O segmento industrial ainda apresenta significativos índices de desperdícios, especialmente em decorrência do inadequado manuseio do pescado. Como exemplos, podem ser citados os impróprios

acondiçõamentos a bordo nas capturas de sardinha, resultando em perdas de 20% da produção total, e o ainda insignificante aproveitamento da chamada “fauna acompanhante” da pesca de arrasto do camarão da costa Norte. A frota dos chamados barcos industriais compõe-se de cerca de 1.600 embarcações, em geral, obsoletas ou com tecnologia de captura defasada, à exceção da maior parte da frota camaroeira da região Norte, de parte das traineiras (cerqueiros para sardinha) de Santa Catarina e parte dos barcos de pesca de bonito com isca-viva (NETO e DORNELLES, 1996).

A sardinha - verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (STEIDACHNER, 1879), ocorre em uma área situada entre os estados do Rio de Janeiro (Cabo de São Tomé - 22 °S) e Santa Catarina (ao sul do Cabo de Santa Marta Grande - 28 °S), com as capturas restritas a estas áreas e na profundidade de até 70 metros, havendo, no entanto, registro de ocorrência em profundidade de 100 metros (SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DA PESCA - SUDEPE, 1985).

Sua disponibilidade à pesca, como a dos demais clupeídeos em todo o mundo, caracteriza-se por grandes flutuações. As capturas são diferentes de ano para ano e, particularmente, de mês para mês, não obedecendo a um padrão definido de comportamento. Este fato está relacionado, principalmente, às oscilações verificadas na estrutura oceanográfica que podem determinar pronunciados deslocamentos dos cardumes, mantendo - os ou não, disponíveis à pesca, bem como às oscilações na estrutura da população, determinada por uma boa ou má desova e, em conseqüência, por um bom ou mau recrutamento (NETO e DORNELLES, 1996).

Segundo a SUDEPE (1985), não há registro quanto ao início da exploração de sardinha no Brasil, em nível artesanal; sabe-se apenas que é bastante antiga. Em termos industriais, começou a se desenvolver nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, na década de 40, com a mecanização da frota pesqueira e, posteriormente em 1964 em Santa Catarina. A pesca artesanal é executada com tarrafa em Paranaguá, Antonina e baía de Guaratuba (Paraná) e por cerco flutuante nas regiões de Florianópolis, Porto Belo e Camboriú (Santa Catarina) e Ubatuba (São Paulo). Nos últimos anos, vem sendo ampliada a pesca de sardinha jovem por traineiras de pequeno porte, para servir de isca viva na captura do bonito (tunídeos) no Rio de Janeiro e Santa Catarina. A pesca industrial de sardinha é realizada através de rede de cerco (traineira) retangular, de comprimento entre 700 e 900

metros, altura entre 70 e 90 metros (esticada) e 50 a 60 metros em operação e malha de 12 mm, nó a nó, em toda a rede (VALENTINI e CARDOSO, 1991).

Historicamente, a frota sardinheira sempre teve um comportamento ascendente, chegando a contar com cerca de 500 barcos em meados da década de 80, apesar de a partir de 1976, o esforço de pesca ter sido limitado às embarcações então existentes (cerca de 200 barcos). Em 1990, esse número baixou para 404 embarcações e em 1991, a frota esteve composta de 352 barcos. Nesse ano as embarcações eram distribuídas da seguinte forma: 37% no Rio de Janeiro, 33% em São Paulo e 30% em Santa Catarina. Se considerarmos a tonelagem bruta de arqueação (TBA) dessa frota, essa distribuição fica alterada, pois 43% daquela de maior porte estava sediada em Santa Catarina; 33% em São Paulo e apenas 24% no Rio de Janeiro. Em 1992 operavam 200 embarcações (IBAMA, 1992). Em face dos baixos rendimentos registrados nesta pescaria, nos últimos anos, somente as embarcações de maior porte e, melhor equipadas, predominantemente de Santa Catarina, mantêm-se em atividade. Os barcos de porte médio e sem equipamentos auxiliares estão, em número significativo, sendo desativados ou desviados para outras atividades (inclusive recreio). Suas tripulações estão saindo da pesca ou sendo absorvidas na pesca de arrasto com parelha e na captura de cações. Esta parece ser também a modalidade adotada pelas unidades menores da frota de sardinha, notadamente em São Paulo. É importante ressaltar que a saída momentânea desses barcos pode significar a existência de um esforço potencial que deve ser desativado, principalmente considerando que, em se percebendo uma recuperação do rendimento da pesca, voltará a atuar como antes, anulando todo um trabalho dirigido à recuperação do recurso. Cabe evidenciar que, a sardinha sustenta historicamente a pescaria mais importante, no tocante ao volume de produção, a qual se destina, na sua quase totalidade, ao mercado interno e com preços acessíveis à população de baixa renda, na forma de resfriada/congelada e enlatada (NETO e DORNELLES, 1996).

Segundo NETO e MESQUITA (1988), citados por NETO e DORNELES (1996), até 1982 o estoque de sardinha já havia passado por várias avaliações, sempre através de modelos de produção, as quais indicavam uma captura máxima sustentável (CMS) entre 170.000 e 200.000 toneladas, pressupondo-se o estoque em situação de equilíbrio. A série histórica de produção, de 31 anos, correspondendo ao período de 1964 a 1994 (Tabela 2), mostra que os

desembarques totais de sardinha apresentaram uma tendência ascendente até 1973, quando se registrou a produção máxima de 229.000 toneladas, obtidas por uma frota de cerca de 200 barcos. A partir desse ano, a produção declinou de forma alternada, contudo sempre apresentando patamares decrescentes de recuperação dos desembarques totais, chegando a ponto de, em 1990, a produção ter sido de apenas 32.000 toneladas. Cabe evidenciar que as recuperações das produções comprovadas pelos patamares observados nos períodos 77/80, 83/86 e 91/94, respectivamente em torno de 145.000, 125.000 e 60.000 toneladas, dependeram, na maioria das vezes, da tomada de medidas enérgicas de regulamentação da pescaria, associada a um maior rigor da fiscalização nas suas implementações, com destaque para o tamanho mínimo e o defeso de reprodução e de recrutamento, especialmente após 1990. Infelizmente, este reforço foi abandonado ao primeiro sinal de recuperação do recurso, o que, associado ao descontrole do tamanho da frota que continuou crescendo chegando a atingir cerca de 500 barcos em 1989.

Tabela 2: Capturas anuais (em toneladas) de sardinha na costa brasileira

Ano	Sardinha	Ano	Sardinha	Ano	Sardinha	Ano	Sardinha
1964	38.772	1972	170.076	1980	146.272	1988	65.139
1965	50.777	1973	228.037	1981	116.279	1989	78.107
1966	59.553	1974	177.069	1982	98.873	1990	32.080
1967	80.413	1975	136.104	1983	139.377	1991	64.294
1968	75.721	1976	105.276	1984	134.221	1992	64.842
1969	113.768	1977	145.576	1985	123.961	1993	53.365
1970	135.400	1978	144.685	1986	126.180	1994	75.039
1971	161.027	1979	149.542	1987	91.797		

Fonte: IBAMA E INSTITUTO DE PESCA/SP, citados por NETO e DORNELLES (1996).

Cumprir registrar que esta foi uma das pescarias pioneiras no tocante à adoção de medidas de regulamentação, ainda na década de setenta, tais medidas eram relativas ao controle do esforço de pesca, que deveria ter-se limitado aos atuais níveis. Posteriormente, adotou - se o tamanho mínimo de captura e, por fim, o estabelecimento de defesos. A fragilidade do poder público e a falta de visão ou de consciência do setor produtivo, no seu conjunto, concorreram para constantes modificações e desrespeito a essas medidas, não permitindo que os resultados almejados fossem atingidos, não obstante os sempre significativos alertas sobre a gravidade da situação, principalmente a que culminou com a grave crise de 1990. Do exposto, fica fácil antever que o setor empresarial ou produtivo, excluídos os enlatadores que não atuam no segmento de captura, vem enfrentando graves problemas de sobrevivência econômica, com significativos danos sociais aos que dependem da pesca da sardinha. A exceção, para os enlatadores advém o fato de que estes, nos anos de baixas produções e, inclusive nos períodos dos defesos, importam sardinha de outros países produtores, mantendo suas atividades com certa tranqüilidade (NETO e DORNELLES, 1996).

## **2.4 Bactérias lácticas**

### **2.4.1 Metabólitos**

As bactérias lácticas são microrganismos relacionados geneticamente, possuidores de um número de características fisiológicas e ecológicas comuns, porém, taxionomicamente indefinidas. Estas bactérias ocorrem naturalmente em uma quantidade muito grande de matérias - primas alimentares, mas em algumas circunstâncias podem causar a deterioração do alimento. Deliberadamente incluídas na elaboração dos processos fermentativos, elas podem conferir características sensoriais desejáveis, promovendo o aumento da qualidade e a segurança sanitária destes alimentos (GOLBERG e WILLIAMS, 1991). Vários fatores contribuem para a atividade antimicrobiana das bactérias ácido lácticas (Quadro 5), que têm sido objeto de numerosos estudos (LINDGREN e DOBROGOSZ, 1990; RAY e DAESCHEL,



1992; DAVIDSON e HOOVER, 1993; HOLZAPFEL et al., 1995), citados por ADAMS e NICOLAIDES (1997). Estes pesquisadores confirmam que o principal efeito, considerado antimicrobiano, se deve às atividades metabólicas comuns a todas as cepas. Esta apropriada e invariável atuação nos processos fermentativos não se caracteriza somente pela geração de energia celular, mas também exerce uma atividade para produzir ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático com um conseqüente decréscimo do pH do meio.

Quadro 5: Fatores antimicrobianos associados as  
bactérias lácticas

Baixo pH
Ácidos orgânicos
Bacteriocinas
CO <sub>2</sub>
Peróxido de hidrogênio
Etanol
Diacetil
Baixo potencial de oxi - redução
Esgotamento de nutrientes
Carga microbiana

Fonte: LINDGREN e DOBROGOSZ, 1990; RAY e DAESCHEL, 1992; DAVIDSON e HOOVER, 1993; HOLZAPFEL *et al.*, 1995, citados por ADAMS e NICOLAIDES, 1997.

A concentração de ácido lático pode exceder a 1% (p/v) para alguns alimentos fermentados e dependendo da capacidade tampão do meio, o valor final do pH poderá atingir até 4,2. As bactérias lácticas são bastante resistentes às condições de acidez, podendo tolerar um baixo pH intracelular, ao contrário da maioria dos microrganismos. Esta propriedade, entretanto, não é uniforme para todas as bactérias lácticas. A sensibilidade em função da acidez pode variar e isto é observado em vários processamentos de alimentos fermentados que utilizam espécies com uma maior característica ácido - tolerante, como na produção de iogurte e na fermentação do repolho na fabricação do chucrute (DAESCHEL, 1989).

Apesar da acidificação ser considerada como o mais importante agente inibidor, outros fatores antimicrobianos não podem ser ignorados. Em muitos casos, estas contribuições individuais são desprezadas ou não existem, mas em algumas situações, a predominância da concentração das bactérias lácticas é crítica em função da seqüência operacional de fermentação. As bactérias lácticas compreendem os gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus* (grupo N estreptococos), *Leuconostoc* e *Pediococcus* e, não apenas estão envolvidas na preservação de alimentos, como também são responsáveis por uma identidade específica e atributos sensoriais de difícil obtenção por outros métodos de processamento. Conforme WOOD (1985), citado por DAESCHEL (1989), a grande variedade de alimentos crus preservados por fermentações lácticas, inclui o leite, as carnes, as frutas e os vegetais e, esta conservação teve como origem o efeito acidificante pela conversão de açúcares em ácidos orgânicos.

A redução do pH e a eliminação dos carboidratos por fermentação são as primeiras ações preservativas que estas bactérias ocasionam no alimento processado por fermentação. Entretanto, se reconhece que as bactérias lácticas possuem a capacidade para produzir outras substâncias inibidoras além de ácidos orgânicos que são antagônicas a determinados microrganismos. Estas substâncias são produzidas em pequenas quantidades e incluem: peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas e produtos de reações secundárias como os hipotiocianatos obtidos pela ação da lacto-peroxidase sobre o peróxido de hidrogênio e os tiocianatos (DAESCHEL, 1989).

#### **2.4.1.1 Ácidos orgânicos e pH**

O efeito antimicrobiano das condições ácidas não depende somente do pH, mas do tipo de ácido presente. Podemos considerar três fatores relacionados com a inibição ácida: pH, grau de dissociação do ácido e o correspondente efeito tóxico. O crescimento bacteriano geralmente ocorre nos valores ótimos de pH, entre 6 e 7. Valores inferiores a estes limites resultam na morte microbiana e será mais acentuada quanto maior for a temperatura. O limite crítico de pH para a multiplicação de microrganismos deterioradores pode ser exemplificado através da sobrevivência

de *Salmonella* spp. Em determinadas condições, quando o pH decresce de 7 para 4, o efeito inibitório é detectado somente quando o pH atinge valores inferiores a 5. Com relação ao *Campylobacter jejuni*, este microrganismo apresenta uma menor resistência; não se multiplica em temperaturas inferiores a 30 °C e não sobrevive quando o pH é reduzido de 7 para 4,5. Em determinados sistemas experimentais, quando o pH do meio precisa ser ajustado para determinar o limite de crescimento ou sobrevivência de uma cultura, este efeito é mantido com a utilização de acidulantes inorgânicos como o ácido clorídrico e fosfórico, ou através de ácidos orgânicos como o láctico e o acético (ADAMS e NICOLAIDES, 1997).

Pesquisadores (BRACKETT, 1987; SORRELS et al., 1989), citados por ADAMS e NICOLAIDES (1997), comprovaram a eficácia da acidificação do meio na inibição microbiana relacionando outras bactérias como: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp. e *Yersinia enterocolitica*. Estes autores confirmam que as bactérias lácticas heterofermentativas podem produzir misturas de ácido láctico e acético, em determinadas circunstâncias. Entretanto, em comparação com as homofermentativas, elas produzem uma acidificação menor como nas fermentações naturais de vegetais em que elas são mais importantes no início do processo inibindo a multiplicação de microrganismos contaminantes e, permitindo com isso, a seqüência da fermentação. Para que a produção de ácido seja suficiente para favorecer a inibição das bactérias patogênicas, um grande número de bactérias lácticas deve estar presente. Os microrganismos patogênicos se multiplicam lentamente no início da fermentação e as bactérias lácticas estando em maior número e, se desenvolvendo rapidamente, ocasionam uma redução imediata do pH. O efeito antimicrobiano ocasionado pela redução do pH deve ser visto como um coadjuvante nos processos fermentativos e não como um substituto das boas práticas de manipulação.

#### **2.4.1.2 Peróxido de hidrogênio**

Em presença do oxigênio, as bactérias lácticas produzem peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como resultado da atividade das oxidases.

Pesquisadores como ADAMS e NICOLAIDES (1997), constataram que os lactobacilos produzem  $H_2O_2$  durante o metabolismo através de diferentes mecanismos e, com isso, ocorre uma acumulação deste composto durante a multiplicação porque estes microrganismos não possuem a enzima catalase. Baseados nesta atividade, comprovaram que as bactérias lácticas apresentam uma maior resistência aos efeitos do peróxido de hidrogênio do que a maioria dos microrganismos. A formação e a acumulação do peróxido de hidrogênio pelos lactobacilos em crescimento, com um subsequente efeito antagônico pôde ser exaustivamente comprovado com *S. aureus* e *Pseudomonas* sp. através de pesquisas desenvolvidas por PRICE e LEE (1970).

De acordo com COLLINS e ARAMICK (1980), a produção de  $H_2O_2$  é maior nas baixas temperaturas quando a solubilidade do oxigênio é elevada ou quando as culturas usadas são mantidas em constante agitação. Quando determinadas operações não permitem a oxigenação, o conteúdo de  $H_2O_2$  que se acumula é muito reduzido.

O peróxido de hidrogênio também pode reagir com outros componentes para formar substâncias inibidoras. No leite cru, o peróxido de hidrogênio produzido por bactérias ácido lácticas reage com o tiocianato endógeno que, posteriormente, poderá ser catalisado pela lactoperoxidase para formar produtos de oxidação intermediária, com propriedades inibidoras de microrganismos. Este processo, chamado de “sistema lactoperoxidase antibacteriano”, pode aumentar a vida-de-prateleira do leite cru sem refrigeração (HÄRNULV et al., 1984; BANKS et al., 1986), citados por DAESCHEL (1989).

### **2.4.1.3 Diacetil**

O diacetil (2,3 - butanodieno) é um produto final do metabolismo produzido pelas bactérias lácticas ou sintetizado a partir do piruvato, um metabólico intermediário. Algumas espécies de bactérias lácticas possuem esta habilidade para a síntese. O diacetil é bastante conhecido pela ação antimicrobiana e pelo aroma amanteigado que confere aos produtos fermentados de leite (JAY, 1982).

Nas pesquisas realizadas, JAY (1982) mostrou que o diacetil foi inibidor na relação de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  para leveduras e bactérias Gram - negativas e de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  para bactérias não - lácticas Gram - positivas. As bactérias lácticas não são inibidas em concentrações inferiores a  $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O diacetil tem eficiência limitada pela quantidade elevada que deve ser usada para a obtenção do efeito desejado como preservativo, além do que, um forte aroma o impede de ser utilizado na maioria dos produtos alimentícios.

A atividade antibacteriana do diacetil foi amplamente estudada em um grande número de microrganismos, como: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *Y. enterocolitica* (JAY, 1982; MOTLAGH et al., 1991, citados por ADAMS e NICOLAIDES, 1997).

Algumas bactérias possuem capacidade para degradar o diacetil quando presente em baixas concentrações. As Gram - negativas normalmente mostram grande sensibilidade.

Outros estudos (ARCHER, 1994; ARCHER et al., 1996), também citados por ADAMS e NICOLAIDES (1997), sugerem que concentrações reduzidas de acetil podem ser bastante eficientes quando se utilizam baixas temperaturas operacionais.

#### **2.4.1.4 Dióxido de carbono**

A fermentação de açúcares com produção de  $\text{CO}_2$ , por bactérias lácticas heterofermentativas, contribui para a inibição de microrganismos através de dois fatores:

- a respiração dos tecidos (alimentos) que, pelas condições anaeróbicas formadas inibe microrganismos aeróbios obrigatórios (mofos);
- aumento da pressão parcial do dióxido de carbono, inibindo de forma parcial, determinado tipo de microrganismo.

A sensibilidade ao  $\text{CO}_2$  não é comum a todos os microrganismos. Mofos e bactérias Gram - negativas são mais suscetíveis, enquanto que, lactobacilos e algumas leveduras possuem alta tolerância. O mecanismo de inibição é complexo e envolve uma combinação de efeitos, como a redução do pH intracelular, a inibição de reações enzimáticas e a interação com a membrana celular impedindo o

transporte de solutos. A inibição de microrganismos por CO<sub>2</sub> pode ser comprovada atualmente com a utilização em escala comercial de embalagens para produtos alimentícios utilizando atmosfera modificada. Produtos de pescado com elevado teor de gordura elaborados em condições atmosféricas normais e estocados sob refrigeração a 4 °C, podem manter níveis adequados de qualidade até duas semanas após a captura. Se produzidos em atmosfera modificada e utilizando altas concentrações de CO<sub>2</sub> (25 - 100%), a vida - de - prateleira pode atingir até três semanas nas mesmas condições de refrigeração (FAO, 1995).

#### **2.4.1.5 Reuterina**

A reuterina, conhecida como agente antimicrobiano, é produzida por espécies heterofermentativas como o *Lactobacillus reuterii*. Apresenta baixo peso molecular, solubilidade elevada e pH neutro. Descrita por AXELSSON et al. (1988), citado por DAESCHEL (1989), é um agente antimicrobiano de grande espectro para algumas bactérias Gram - negativas, grande número de Gram - positivas, leveduras e bolores. Os microrganismos mais importantes inibidos pela reuterina incluem espécies como: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Candida* e *Trypanosoma*. A reuterina ou os lactobacilos que a produzem, tem aplicações em alimentos de natureza animal para a redução de patógenos e inibição de coliformes em carnes cozidas resfriadas, tipo *Ground Beef*.

#### **2.4.1.6 Bacteriocinas**

As bacteriocinas são potentes polipeptídios antimicrobianos produzidos por uma grande e diversa microbiota bacteriana. É recente o crescimento de publicações e pesquisas identificando novas bacteriocinas, suscetibilidade e o modo de atuação destes agentes. A mais importante aplicação tem sido a inibição da esporulação de células vegetativas Gram - positivas de patogênicos deterioradores (COVENTRY et al., 1997).

Coletivamente, as bacteriocinas formam um grupo heterogêneo que atuam no metabolismo bacteriano, e nas propriedades químicas dos produtos alimentícios.

Talvez, a mais importante do grupo seja a colicina (*E. coli*), pela característica de ação, determinantes genéticos e função ecológica. A bacteriocinogenicidade das bactérias lácticas é reconhecida e tem sido caracterizada de *Lactobacillus fermentum* (KLERK e SMIT, 1967), *L. helveticus* (UPRETI e HINDSDILL, 1975; JOERGER e KLAENHAMMER, 1986), *L. acidophilus* (BAREFOOT e KLAENHAMMER, 1983; MURIANA e KLAENHAMMER, 1987) e *L. plantarum* (DAESCHEL et al., 1986; WEST e WARNER, 1988), citados por DAESCHEL (1989).

Cepas de pediococos, usadas como cultura *starter* em fermentações de vegetais e carnes, têm sido objeto de pesquisas pela habilidade em produzir bacteriocinas, principalmente *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* (DAESCHEL e KLAENHAMMER, 1985). A característica mais comum destas bacteriocinas é a atividade sobre as espécies Gram - positivas. Inibem a maioria dos patogênicos contaminantes de alimentos, incluindo *Listeria monocytogenes*. O gênero *Leuconostoc*, importante para produtos vegetais, laticínios e fermentações de vinhos, não tem sido examinado exaustivamente quanto à sua habilidade de preservação.

ORBERG e SANDINE (1984), citados por DAESCHEL (1989), identificaram três cepas de *L. dextranicum* e outras duas espécies de *Leuconostoc* que produzem substâncias com atividade antibacteriana contra outras bactérias lácticas.

Quanto à bioquímica e genética, entre as bacteriocinas mais pesquisadas encontram-se a nisina e a diplococina, pertencentes ao grupo N *Streptococcus* (CUTTER e SIRAGUSA, 1994).

A nisina, cujo nome é derivado do grupo N de substâncias inibidoras, é correntemente utilizada na preservação de alimentos em vários países. Conforme DAESCHEL (1989), a nisina foi primeiramente estudada por ROGERS e WHITTIER (1928) e posteriormente caracterizada e registrada definitivamente por MATTICK e HIRSCH (1944). Industrialmente, a aplicação de nisina foi primeiramente avaliada no queijo suíço quando efetivamente se evitou a formação de gases atribuído ao crescimento de clostrídios. Mais tarde, a nisina foi usada como preservativo em vários produtos de pescado e determinados alimentos processados, incluindo o suco de tomate, carne moída e cerveja. A nisina foi usada na Europa durante 25 anos e, somente em 1988 foi caracterizada pelos Estados Unidos como agente antimicrobiano capaz de inibir a esporulação do *C. botulinum* e a formação de toxinas em queijos pasteurizados. Esta ação confirmou também que a nisina não é

tóxica, não provoca alergia e possui um efeito antimicrobiano de grande segurança sanitária em relação a bactérias Gram - positivas (DAESCHEL, 1989). Outros pesquisadores (CUTTER e SIRAGUSA, 1995; SHEFET et al., 1995), citados por ADAMS e NICOLAIDES (1997), descreveram a habilidade da nisina, na forma concentrada e purificada, para a redução do número de *Salmonella* sp. e *E. coli* em carnes vermelhas. Segundo Delves e Broughton (1990), citados por ADAMS e NICOLAIDES (1997), apenas a nisina é permitida como preservativo alimentar.

## 2.4.2 Efeito dos nutrientes

A multiplicação das células bacterianas depende não apenas do efeito dos agentes inibidores, mas também de espaço suficiente e de nutrientes adequados. A limitação destes fatores caracteriza os mais diferentes produtos alimentícios determinando a sua estabilidade microbiológica. As bactérias lácticas têm merecido maior atenção por restringirem o crescimento de outros microrganismos, devido a rapidez de multiplicação, ocupação física do meio em que atuam e facilidade para a assimilação de nutrientes. Porém, a contribuição individual destes fatores é relativamente insignificante, comparada à produção de ácidos que ocorre durante os processos fermentativos. Assim que, a estabilidade dos alimentos fermentados depende da combinação dos efeitos antibacterianos das bactérias lácticas, do teor salino e da atividade de água na prevenção da sobrevivência dos patógenos que, em muitos casos, declinam durante a estocagem. Recentemente tem merecido maior atenção a capacidade de algumas bactérias patogênicas como, *E. coli* e *L. monocytogenes* de desenvolverem mecanismos de tolerância a componentes ácidos em resposta à exposição a estes meios (DAVIS et al., 1996).

Na prática, merece uma particular importância *E. coli* 0157:H7, que apresenta resistência a ácidos e, por isso, tem sido responsável por deteriorações associadas a embutidos fermentados e sucos de frutas (CONNER e KOTROLA, 1995), citados por ADAMS e NICOLAIDES (1997). O Quadro 6 apresenta alguns exemplos de inibição por bactérias lácticas sobre alguns microrganismos patogênicos associados a produtos alimentícios.



Quadro 6: Inibição de microrganismos patogênicos por bactérias lácticas

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
<b>SALMONELLA</b>				
• Salsicha de peixe				
<i>S. typhimurium</i>	-Limita o crescimento nas primeiras 12h - Presente no produto final	<i>P. acidilactici</i> Inoculação inicial > 10 <sup>7</sup> UFC g <sup>-1</sup>		ARYANTA et al., 1991
<i>S. sofia</i>	- Não observado crescimento			
• Peixe c/mandioca				
<i>S. typhimurium</i> ATCC 1311	- Rápida inibição durante a fermentação (30 °C)	BAL - Lactostart (Chr. Hansen Lab.)		TWIDDY et al., 1987
• Grãos de cereais				
<i>S. typhimurium</i> 18375	- Não detectado no grão após 48h c/adição do <i>starter</i>	BAL		KINGAMKONO et al., 1994
<i>S. typhimurium</i>	- Não detectado no <i>ogi</i> após 6h inoculação - Preparado c/ <i>starter</i> Dogik	<i>L. acidophilus</i> DK77 <i>L. pentoseus</i> DK99		OLUKOYA et al., 1994
<i>S. typhimurium</i>	- Redução do pH após hidratação e preparação - Inibição de patógenos em pH ≤ 4,16	BAL		NOUT et al., 1989
• Alimento infantil (base de arroz)				
<i>S. typhimurium</i> USCC 18375	- Inibição (24h) apenas quando a carga bact. lácticas foi superior aos patógenos	<i>L. lactis</i> NCIB 497 <i>L. plantarum</i> coleção de culturas University of Surrey	alimento = 0,23-0,26% (96% a.l.)	YUSOF et al., 1993
• Laticínios				
<i>S. typhimurium</i> NRRLB 4420	- Não detectado após 30 dias (queijo) - Não detectado na salmoura c/presença do <i>starter</i>	BAL específico p/ queijo americano - tipo <i>Cheddar</i> Chr. Hansen Laboratory Inc.		ABDALLA et al., 1993
<i>S. enteritidis</i> <i>S. typhimurium</i>	- BAL (leite azedado) inibiram crescimento de patógenos 48/60h - Produto normalmente consumido em 24h - Detectado <i>Salmonella</i> sp. O produto é seguro após 72h		0,7%	ASHENAFI, 1993

Quadro 6 continuação

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
• Carne				
<i>S. dublin</i> <i>S. typhimurium</i>	- Inativação pelo <i>starter</i>	BAL		SMITH et al., 1975
<i>Salmonella</i> sp.	- Nível de patógenos não variou durante a produção de salsichas fermentadas	BAL		ALFORD e PALUMBO, 1969
• Meio laboratorial	- Não detectado na cultura em pH 3,8	<i>L. acidophilus</i>		CIEPLINSKA e ZYCHOWICZ, 1974
<b>CAMPYLOBACTER</b>				
• Grãos de cereais				
<i>C. jejuni</i>	- Inibido após 28h de fermentação	BAL		KINGAMKONO et al., 1994
<i>C. jejuni</i>	- Não detectado no tradicional <i>ögi</i> após 6h de preparação	<i>L. acidophilus</i> DK77 <i>L. pentoseus</i> DK99		OLUKOYA et al., 1994
<b>YERSINIA ENTEROCOLITICA</b>				
• Grãos de cereais				
<i>Y. enterocolitica</i>	- Não detectado no tradicional <i>ögi</i> após 6h de preparação	<i>L. acidophilus</i> DK77 <i>L. pentoseus</i> DK99		OLUKOYA et al., 1994
• Meio laboratorial				
<i>Y. enterocolitica</i>	- Efeito antagônico na maioria das cepas - Patogênico não detectado após 4 dias inoculado c/ LKE5 e 6 dias c/ V6	<i>Leuconostoc</i> sp. V6 <i>L. plantarum</i> LKE5		JEPPESEN e HUSS, 1993
<b>E. COLI</b>				
• Salsicha de peixe				
<i>E. coli</i> (cepa 1)	- Limitado crescimento durante 12h - Presente no produto final	<i>P. acidilactici</i> inoculação inicial >10 <sup>7</sup> UFC .g <sup>-1</sup>		ARYANTA et al., 1991
<i>E. coli</i> (cepa 2)	- Sem crescimento			ARYANTA et al., 1991
• Peixe c/mandioca				
<i>E. coli</i> ATCC 11775	- Rápida inibição na fermentação a 30 °C	BAL- "Lacto starter" Chr. Hansen Laboratory Inc.		TWIDDY et al., 1987

Quadro 6 continuação

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
• Grãos de cereais				
<i>E. coli</i> ETEC 28662 (enterotoxigênica)	- Redução para limites indetectáveis após 32h	BAL		KINGAMKONO et al., 1994
<i>E. coli</i> (enteropatogênica) <i>E. coli</i> (enterotoxigênica)	- Não detectado no tradicional <i>ögi</i> após 6h preparação			OLUKOYA et al., 1994
• Alimentos (base de arroz)				
<i>E. coli</i> ATCC25922	- Inibição ocorreu quando a conc. bact. lácticas foi superior aos patógenos - Patógenos não cresceram (24h) alimentos pré-fermentados	<i>L. lactis</i> NCIB 497 <i>L. plantarum</i>		YUSOF et al., 1993
• Leite				
<i>E. coli</i> OFC 491	- Crescimento inibido pela presença das BAL	<i>L. lactis</i> , sp. <i>lactis</i> MOS 11		ISONO et al., 1994
<i>E. coli</i> O157:H7		<i>L. confusus</i> NGB 82		
• Laticínios				
Queijo <i>Cheddar</i>				
<i>E. coli</i> O157:H7 (cepa 3A - isolada de humano; 4A - isolada de bezerro e 4F - isolada de <i>E. coli</i> presente em humanos Centro de referência: Universidade da Pennsylvania, PA)	- O queijo produzido do leite c/ $10^3$ UFC ml <sup>-1</sup> mostrou uma redução de 2 unidades log após 60 dias - O patógeno foi detectado em 25 g de queijo após 158 dias - O queijo preparado com leite mostrou uma redução da <i>E. coli</i> para 1 UFC g <sup>-1</sup> em 60 dias. - Não foi detectado <i>E. coli</i> em 25 g do queijo c/ 158 dias de fabricação	Culturas REDI - SET™ Chr. Hansen Laboratory Inc., Milwaukee, WI		REITSMA e HENNING, 1996
• Queijo <i>Cottage</i>				
<i>E. coli</i> O157:H7 (cepa 043 - A.B.C. - Comp. Gainesville, Florida; 1215 e 931 - Universidade da Georgia)	- O patogênico sobreviveu ao baixo pH e a alta acidez (a morte só ocorreu a 57 °C)	Culturas <i>starters</i> : 11, 61, 71 e 115 Nordica International - Elkhart.IN	0,8%	Arocha et al., 1992

Quadro 6 continuação

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
• Carnes				
<i>E. coli</i> 0157:H7 (cepa 932 - clinicamente isolada e 933 - isolada de carne moída, obtidas em Atlanta, Georgia; 505B - isolada de carne moída, Inst. Pesq. Alimentares; 204P - isolada de suínos e C7927 - isolada de suco de maçã, U. Georgia	- As células se adaptaram a acidez, inoculadas no nível de $2 \times 10^4$ UFC $g^{-1}$ , demonstrando resistência ao ácido láctico - A resistência foi menor na fermentação de salsichas do que no salame fermentado	BAL		LEYER et al., 1995
Mistura de 5 cepas: <i>E. coli</i> 0157:H7 (932), <i>E. coli</i> 0157:H7 (CL8), <i>E. coli</i> 933, EC 204P e EC 505B	- Não foi observado crescimento de patógenos durante a elaboração da salsicha fermentada (nível inicial de $10^4$ UFC $g^{-1}$ ) - As bacteriocinas mostraram pouca ou nenhuma atividade c/ bact. Gram - negativas A inativação da <i>E. coli</i> 0157:H7 no produto se deve principalmente a acidez e desidratação	Lactacel 115 <i>Pediococcus acidilactici</i> Adicionado c/ $10^7$ UFC $g^{-1}$ (c/cepa)		GLASS et al., 1992
<i>E. coli</i> 0111	- O patógeno foi isolado de um tipo de salame fermentado mal cozido (METTWURST)	BAL		SHAY e SOUNESS, 1995
<b>SHIGELLA</b>				
• Grãos de cereais				
<i>S. sonnei</i> <i>S. flexineri</i>	- Não detectada no tradicional <i>ögi</i> após 6 h de fabricação	<i>L. acidophilus</i> DK77 <i>L. pentosus</i> DK99		OLUKOYA et al., 1994
<i>S. flexineri</i>	- Não detectado após 48 h de fermentação dos grãos na presença do <i>starter</i>	BAL		KINGAMKONO et al., 1994
• Pão de milho fermentado				
<i>S. flexineri</i> (20 cepas)	- 14 cepas mostraram completa inibição 6 cepas apresentaram inibição parcial	BAL		MENSAH et al., 1991

Quadro 6 continuação

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
• Alimentos (base de arroz)				
<i>S. sonnei</i> USCC 2006	- A inibição ocorreu quando a concentração de BAL foi superior aos patogênicos	<i>L. lactis</i> NCIB 497 <i>L. plantarum</i> Depart. Microb. Univ. Surrey		YUSOF et al., 1993
• Meio laboratorial	- Não detectado em meio laboratorial c/ mistura de culturas (pH 3,8)	<i>L. acidophilus</i>		CIEPLINSKA e ZYCHOWICZ, 1974
<b>VIBRIO SP.</b>				
• Salsicha de peixe				
<i>V. Cholerae</i>	- Não detectado no tradicional <i>ögi</i> , após 6 h da adição da cultura <i>starter</i>	<i>L. acidophilus</i> DK77		OLUKOYA et al., 1994
<i>V. parahaemolyticus</i>	- Não observado crescimento	<i>L. pentosus</i> DK99 <i>P. acidilacti</i> Inoculação inicial >10 <sup>7</sup> UFC g <sup>-1</sup>		ARYANTA et al., 1991
<b>S. AUREUS</b>				
• Salsicha de peixe				
<i>S. aureus</i>	- Crescimento limitado nas primeiras 12h - presente no produto final	<i>P. acidilacti</i> , isolado de "lactocel plus" LP 13184 Inoculação inicial >10 <sup>7</sup> UFC g <sup>-1</sup>		ARYANTA et al., 1991
• Peixe c/mandioca				
<i>S. aureus</i> ATCC 9144	- Rápida inativação durante a fermentação (30 °C)	BAL - Lactostart LP 13184 Chr Hansen Lab.		TWIDDY et al., 1987
• Grãos de cereais				
<i>S. aureus</i>	- Redução do pH (caldo) após a preparação - Redução dos patógenos observado em pH ≤ 4,16	BAL		NOUT et al., 1989
• Alimentos (base de arroz)				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Inibição (24h) ocorreu quando a concentração BAL foi superior aos patogênicos	<i>L. lactis</i> NCIB 479 <i>L. plantarum</i> Depart. Microb. Univ. Surrey		YUSOF et al., 1993

Quadro 6 continuação

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
• Salada de repolho				
<i>S. aureus</i>	- Gradual redução após 7h (c/mudança da temperatura de 42 °C para 7 °C) - Após 2h (7 °C), foi observado uma rápida redução	<i>L. plantarum</i> 9 <i>L. plantarum</i> 20	1,75 g.kg <sup>-1</sup> (salada) e 2,2 g.kg <sup>-1</sup> (salada produzida após 7h), 3,0 g.kg <sup>-1</sup> (salada) e 3,5 g.kg <sup>-1</sup> (salada a 7 °C)	BONESTROO et al., 1993
<i>S. aureus</i>	- Aumento acima de 1 ciclo log (redução após 100h) - Similar redução quando a temperatura de incubação atingiu 7 °C	<i>L. plantarum</i> P4	1,5 g kg <sup>-1</sup> (salada produzida após 7h), 2,7 g kg <sup>-1</sup> (salada após 1,5h a 7 °C)	
• Laticínios				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	- Crescimento dos patogênicos inibido pelas BAL	<i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> MOS 11 <i>L. confusus</i> NGB 82	0,9%	ISONO et al., 1994
<i>S. aureus</i> NRRLB 4420	- Não detectado após 30 dias em cura e 20 dias em salmoura	BL específicas p/ queijo <i>Cheddar</i> Chr. Hansen Lab. Inc.		ABDALLA et al., 1993
• Carnes				
<i>S. aureus</i>	- Crescimento e produção de toxina pelo <i>S. aureus</i> é maior a 25 °C do que a 30 °C	<i>L. lactis</i>		HAINES e HARMON, 1973
<i>S. aureus</i>	- BAL reduziram o pH e inibiram produção da enterotoxina	BAL		BARBER e DEIBEL, 1972
<i>S. aureus</i>	- BAL reduziram o pH e inibiram o crescimento do patogênico	BAL		PETERSON et al., 1964; DALY et al., 1973
<i>S. aureus</i>	- A inibição foi maior quando a carga de BAL foi superior aos patógenos	<i>L. lactis</i> <i>P. cerevisiae</i>		PETERSON et al., 1964; TROLLER e FRAZIER, 1963; HAINES e HARMON, 1973

Quadro 6 continuação

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>				
• Pescado (alimentos)				
<i>L. monocytogenes</i>	- Boa atividade antagônica	<i>Leuconostoc</i> sp.		JEPPESEN e HUSS, 1993
<i>L. monocytogenes</i>	- Redução da carga no camarão em salmoura em 3 ciclos log ( $10^6$ - $10^3$ UFC $g^{-1}$ ) após 2,5h (5 °C)	<i>L. plantarum</i>		
<i>L. monocytogenes</i>	- Boa inibição	Enterococo isolado do filé de bacalhau		
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	- BAL apresentaram bom efeito antagônico	<i>Leuconostoc</i> sp. V6 <i>L. plantarum</i> LKE5		JEPPESEN e HUSS, 1993
• Molhos fermentados				
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	- Houve crescimento na fermentação - Os níveis de inibição não foram detectados	<i>Lactobacillus</i> sp.		BONESTROO et al., 1993
<i>L. monocytogenes</i> Cepas: WS 2300, 2301, 2302	- Carga de patógenos ficou reduzida em níveis indetectáveis após 48h de fermentação	BAL		ASHENAFI, 1994
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	- Não foi detectada após a adição do <i>starter</i>	BAL específicas p/ queijo <i>Cheddar</i> Chr. Hansen Lab. Inc.		ABDALLA et al., 1993
<i>L. monocytogenes</i> V7	- Crescimento inibido mas não significativamente reduzido	<i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i>		EL-GAZZAR et al., 1993
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	- Eventual decréscimo no nível de patógenos na presença do <i>starter</i>	BAL		ABDALLA et al., 1993

Quadro 6 continuação

Microrganismo	Nível de inibição	Bactéria láctica	Conc. ácido láctico	Referência
• Carnes				
<i>L. monocytogenes</i> SSICA 38, 150	- Starter inibiu o patogênico, entretanto foi detectado uma baixa carga durante a fermentação - <i>L. monocytogenes</i> não foi isolada no produto final	<i>L. plantarum</i> MCS <i>L. plantarum</i> MCS 1		CAMPANINI et al., 1993
<i>L. monocytogenes</i>	- houve inibição de patógenos	<i>L. plantarum</i> <i>L. curvatus</i> <i>Leuconostoc</i> sp.		GIRAFFA et al., 1994
<i>L. monocytogenes</i>	- Houve sobrevivência na produção de salsicha fermentada	BAL		BUNCIC et al., 1991
<i>L. monocytogenes</i>	- Patogênico inibido durante a fermentação e secagem	BAL		GLASS e DOYLE, 1989
<b>B. CEREUS</b>				
• Peixes				
<i>B. cereus</i> 10781	- Foi detectado células não viáveis após 24h (pastas)	BAL		KINGAMKONO et al., 1994
<i>B. cereus</i>	- Não detectado em saladas	<i>Lactobacillus</i> sp.		BONESTROO et al., 1993
<i>B. cereus</i>	- Não detectado após 24h	<i>P. acidilactici</i> isolado do "lactocel plus" (LP13184)		ARYANTA et al., 1991
<b>CLOSTRIDIUM SP.</b>				
• Peixes				
<i>C. perfringens</i>	- Não observado crescimento	<i>P. acidilactici</i> isolado do "lactocel plus" LP13184		ARYANTA et al., 1991
<i>C. perfringens</i>	- Patogênicos inibidos	enterococos isolados de filés de bacalhau		JEPPESEN, 1993
<i>C. botulinum</i>	- Patogênicos inibidos			
<i>C. sporogenes</i> ATCC 7955	- Desapareceram rapidamente durante a fermentação a 30 °C	BAL - Lactostart Chr. Hansen's Lab.		TWDDY et al., 1987

Fonte: ADAMS e NICOLAIDES, 1997.



### 2.4.3 *Lactobacillus sakei*

#### 2.4.3.1 Taxionomia, fisiologia e bioquímica

As bactérias lácticas pertencem a família *Lactobacillaceae*. São caracterizadas por células imóveis, de forma bacilar ou esférica, unidas por uma incomum variedade de metabólitos e propriedades nutricionais (Quadro 7). Todas são anaeróbias ou aerotolerantes, podendo apresentar crescimento em superfícies (alimentos) expostas ao ar. Estes microrganismos apresentam reação tintorial positiva (coloração diferencial de Gram), não formam esporos e são eficientes produtores de ácido láctico pela fermentação de carboidratos (STANIER et al., 1995).

Quadro 7: Subdivisão taxionômica das bactérias lácticas

Gênero	Forma e arranjos celulares	Fermentação da glicose	* Configuração do ácido láctico
<i>Streptococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativa	L
<i>Leuconostoc</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativa	De
<i>Pediococcus</i>	Cocos em tetraedros	Homofermentativa	DL
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos, usualmente em cadeias	Variável	Variável

\* L- levógero, De- destrógero, DL- destrógero/levógero,

Fonte: STANIER et al. 1995.

Segundo SIQUEIRA (1995), fazendo parte do gênero *Lactobacillus*, encontram-se espécies homofermentativas com capacidade para produzir somente ácido láctico. Outras espécies, além do ácido láctico (menos de 85% dos produtos metabólitos), produzem ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub>. Assim que, pode-se encontrar estufamento ou produção de gás em alimentos embalados, decorrente desta atividade. *Lactobacillus sakei* caracteriza-se por células bacilares, de ocorrência isolada ou em pequenas cadeias, com dimensões variáveis entre 0,6-0,8/2-3 µm,

geralmente com extremidades arredondadas especialmente durante a fase estacionária de crescimento. Não se multiplica a 45 °C mas, pode crescer até 2 °C. A maioria das cepas produz ácido láctico L (+) em caldo DE Man, Rogosa e Sharpe (Anexo 1) e ácido láctico DL em suco de repolho prensado. Este meio de enriquecimento (MRS) também permite o crescimento de *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Suplementado com 0,5% de frutose, pode ser utilizado para a enumeração de lactobacilos deteriorantes de maioneses e outras coberturas ácidas (SILVA et al. 1997). As características bioquímicas e fisiológicas do *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 são apresentadas no Quadro 8 e 9, respectivamente.

Quadro 8: Fermentação de carboidratos por *L. sakei* ATCC 15521

Carboidrato	Reação
Celobiose	+
Frutose	+
Galactose	+
Glicose	+
Lactose	+
Maltose	+
Manitol	-
Manose	+
Ribose	+
Sorbitol	-
Sacarose	+
Xilose	-

(+): reação positiva, (-): reação negativa.

Fonte: SNEATH, 1986.

Quadro 9: Características fisiológicas e bioquímicas do *L. sakei* ATCC 15521

Tipo de peptidoglicano	Lis - D asp
Ácido teicóico	Não
Isômero do ácido láctico	* DL
Crescimento a 15 °C	+
Degradação da arginina (formação de NH <sub>3</sub> )	-

\* DL: destrógero/levógero, (+): reação positiva, (-): reação negativa.  
Fonte: SNEATH, 1986.

Considerando a Norma 12c do *International Code of Nomenclature of Bacteria*, TRÜPER e CLARI (1997), realizaram correções de epítetos específicos (nomes substantivos) de alguns lactobacilos e, entre eles o *Lactobacillus sakei*. Assim que, *Lactobacillus kefir* (nome turco latinizado) foi corrigido para *L. kefir* (genitivo de kefirum), *Lactobacillus sanfrancisco* (“da cidade de San Francisco”) para *L. sanfranciscensis* (adjetivo: “de San Francisco”) e *Lactobacillus sake* para *L. sakei* (genitivo de sakeum), em troca do sake (nome japonês latinizado).

#### 2.4.4 Bactérias lácticas em produtos cárneos

Em carne *in natura*, as bactérias lácticas (BL) apresentam uma fraca atividade de fermentação, não conseguindo produzir mudanças significativas nas características sensoriais devido ao baixo conteúdo de carboidratos e a elevada capacidade tampão; característica das carnes (GRIS et al., 2002).

Em produtos fermentados de carne, é evidente a capacidade inibidora destas bactérias com relação aos microrganismos patogênicos, através de cepas, como: *Leuconostoc carnosum* e *L. gelidum* (SHAW e HARDING, 1984), *Lactobacillus sakei* (SCHILLINGER e LÜCKE, 1989), *Carnobacterium piscicola* (MC MULLEN e STILES, 1993), *Lactobacillus plantarum* e *L. curvatus* (GARVER e MURIANA, 1994), citados por AYMERICH et al., (1998). Vários pesquisadores (HAMMES et al. 1990; STILES e HASTINGS, 1991; HUGAS et al. 1993), também associaram as bactérias

láticas com a fermentação de carnes e, entre elas: *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*. Mais recentemente, algumas cepas de *Lactobacillus brevis* (BENOIT et al., 1994), *Lactococcus lactis* (RODRÍGUES et al., 1995) e *Enterococcus faecium* (AYMERICH et al., 1998) também foram associadas com a fermentação de carnes.

Como as carnes não podem ser pasteurizadas para posteriormente serem inoculadas com o cultivo iniciador, as culturas para a fermentação e biopreservação precisam competir com a microbiota natural. É importante a produção de compostos antagônicos, com efeito, bacteriocinogênico contra estes microrganismos patogênicos. Vários cultivos iniciadores têm sido associados com a capacidade de inibição da *Listeria monocytogenes* em carne *in natura* (NIELSEN et al. 1990; WINKOWSKI et al. 1993), embutidos fermentados tipo - americano (BERRY et al., 1990; SKYTTA et al., 1991; MATTILA SANDHOLM et al., 1991; FOEGEDING et al., 1992), tipo - alemão (SCHILLINGER et al. 1991), tipo - turco (LUCHANESKY et al., 1992), tipo - espanhol (HUGAS et al., 1995), frankfurter (BERRY et al., 1991), salames italianos (CAMPANINI et al., 1993), produtos cárnicos embalados a vácuo (YOUSEF et al., 1991; DEGNAN et al., 1992) e em atmosfera modificada (PAGÉS et al., 1997), citados por AYMERICH et al. (1998). Dos produtos cárnicos, os embutidos curados são os mais importantes. Eles podem ser definidos como uma carne cominutada com adição de gordura e homogeneizada com cloreto de sódio, sacarose, condimentos, nitrato e nitrito. Embutidos em tripas são submetidos a uma fermentação e secagem por tempo determinado. O produto final deverá apresentar uma certa estabilidade (vida-de-prateleira) pela inibição bacteriana, principalmente sobre microrganismos patogênicos. Na fermentação dos produtos cárnicos, as bactérias láticas derivam da matéria - prima *in natura* ou da contaminação por manipulação e, sua atividade resulta na produção de ácido lático pela utilização de carboidratos (adicionados), ocasionando a redução do pH (5,9 - 4,6). Como consequência, as proteínas musculares coagulam, resultando um produto com características próprias de fatiabilidade, textura e coesividade. Neste tipo de processamento, a fermentação é favorecida quando o valor do pH aproxima - se do ponto isoelétrico da proteína. Devemos considerar que, a operação de cura (condições ácidas) favorece o desenvolvimento da cor quando o óxido nítrico produzido a partir do nitrito reage com a mioglobina.

Finalmente, há a inibição de microrganismos patogênicos pelo ácido láctico formado e outros compostos, como: ácido acético e fórmico, etanol, peróxido de hidrogênio, acetaldeído, e bacteriocinas. Atualmente, a indústria cárnica procura a melhoria da qualidade, através da redução de variáveis que possam influenciar as características organolépticas, principalmente na produção de embutidos, o que não era possível quando os métodos de fermentação eram realizados na ausência da adição de cultivos iniciadores. Várias culturas bacterianas têm sido desenvolvidas para reduzir o tempo de fermentação, assegurar o baixo nitrito residual e estabilizar as características organolépticas do produto final. Considerando a importância destes efeitos obtidos por microrganismos, a maioria destes ativadores é compreendida por misturas de cepas de bactérias lácticas, como *Staphylococcus* e *Micrococcus*. O uso de *starters* para a produção de embutidos frescos com nitrito de sódio como agente de cura, normalmente segrega apenas bactérias lácticas e *Staphylococcus*. Entretanto, na produção de embutidos com nitrato, há a inclusão de bactérias lácticas, *Staphylococcus* e *Micrococcus*, que possuem atividade nitrato redutase. Um estudo desenvolvido por BUCKENHÜSKES (1994), citado por HUGAS e MONFORT (1997), mostra que, cultivos iniciadores das massas cruas de embutidos podem ser divididas em duas categorias: as culturas de bactérias lácticas originárias dos equipamentos, superfícies operacionais e instalações industriais (*L. plantarum*, *P. pentosaceus*) e aquelas provenientes da própria carne, que se adaptaram ao novo meio, decorrente do processo de fermentação. A identificação de 254 cepas de lactobacilos, isoladas de embutidos fermentados (15 produtores espanhóis), mostra que o *L. sakei* compreende o maior número (55%), seguido por *L. curvatus* (26%), *L. bavaricus* (11%) e *L. plantarum* (8%), conforme HUGAS et al. (1993).

As bactérias lácticas, como *Lactobacillus sakei* e *L. curvatus* são as mais utilizadas na geração de cultivos iniciadores e, os resultados mostram que elas regulam completamente a fermentação e o desenvolvimento da operação, inibindo inclusive crescimento de outras bactérias lácticas. Esta característica é muito importante porque através do conhecimento do cultivo iniciador que inicia a operação de fermentação, é possível induzir o processamento para a obtenção de propriedades sensoriais preestabelecidas. Entretanto, os microrganismos não - lácticos, também contribuem para as qualidades organolépticas dos produtos fermentados por meio de algumas enzimas como: nitrato redutase, nitrito redutase,

catalase e lipase. Membros do gênero *Staphylococcus* são particularmente responsáveis pela lipólise em presença das lipases tissulares. TALON et al. (1992) e REUTER (1971), citados por HUGAS e MONFORT (1997), mostraram que estes microrganismos contribuem muito mais para a liberação dos ácidos graxos livres no processamento dos embutidos do que *Micrococcus varians* que não apresenta atividade lipolítica. Cepas de *Lactobacillus sakei* e *L. curvatus*, exibem atividade lipolítica somente em escala laboratorial. O potencial dos lactobacilos presentes nos produtos cárnicos, relacionado com a produção de compostos antagônicos, também foi pesquisado por BERRY et al. (1991), citados por HUGAS e MONFORT (1997), e detectado em cepas de *Lactobacillus curvatus*, *L. sakei*, *L. bavaricus* e *L. plantarum*.

HUGAS e MONFORT (1997) pesquisaram a atividade *in situ* do efeito das bacteriocinas e seu relacionamento com a patogenicidade da *Listeria monocytogenes* e a utilização de cepas bacteriocinogênicas de *Pediococcus acidilactici*, um cultivo iniciador utilizado em carnes fermentadas. Estes pesquisadores observaram que, com carne *in natura*, houve apenas uma sensível redução da *Listeria monocytogenes* nos lotes inoculados com as cepas de *P. acidilactici*. Trabalhando com carne moída, mostraram que a carga de *Listeria monocytogenes* se mantém invariável após 14 dias de inoculação, comparado ao controle em que o crescimento do patógeno aumentou exponencialmente.

Algumas pesquisas realizadas com embutidos de procedência americana, também revelam a redução da *L. monocytogenes* quando cepas de *P. acidilactici* JDI-23 foram inoculadas e comparadas com o lote controle (BERRY et al., 1991).

Existem vários estudos sobre a utilização da bacteriocinogenicidade dos lactobacilos em salames fermentados produzidos na Europa. Pesquisadores (SCHILLINGER et al., 1991) utilizaram a bacteriocinogenicidade do *L. sakei* em produtos fermentados europeus na avaliação da inibição da *L. monocytogenes*. Com relação a estes trabalhos, ficou evidente que, as bacteriocinas produzidas pelo *L. sakei* Lb706 apresentam uma atividade mais baixa em alimentos do que nos sistemas desenvolvidos em laboratórios, comprovando que, a utilização destes bioprotetores possui maior ou menor potencialidade em função do tipo de alimento processado e meio de cultivo.

VOGEL et al. (1993), citados por HUGAS e MONFORT (1997), pesquisaram a sensibilidade da cepa do *L. curvatus* LTH1174, comparado com outros trabalhos que utilizavam diretamente a bacteriocina e, comprovaram a superioridade do cultivo

iniciador comercial. Entretanto, o resultado mostrou que, o *L. curvatus* LTH1174 se adapta ao meio cárnico em função do tipo de processamento. A produção de bacteriocinas aumentou a resistência e a competitividade da cepa original, resultando cargas microbianas que variavam entre 97 e 80% do total de microrganismos, após as inoculações entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>. Durante a avaliação da atividade antimicrobiana do *Lactobacillus plantarum* MSC e *L. plantarum* MSC1 em salame italiano, CAMPANINI et al. (1993) mostraram que não há diferença significativa entre estes lactobacilos com relação a inibição de cepas de *L. monocytogenes*. Por outro lado, a inativação da *Listeria monocytogenes* sempre foi menor em produtos cárnicos do que em meios laboratoriais, na presença de contaminações elevadas.

Conforme HUGAS e MONFORT (1997), a inibição de *L. monocytogenes* pelo *L. sakei* CTC494, artificialmente inoculada em embutidos fermentados foi resultado da formação e inibição da bacteriocina sakacina K. A carga de *Listeria* foi reduzida de  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup> (durante a fase inicial) para 3 UFC g<sup>-1</sup> no final do processo. O resultado mostra a eficácia da atividade da sakacina K na atividade inibidora da *Listeria* nestes produtos.

São conhecidas várias bacteriocinas originárias de culturas de *Lactobacillus*. Algumas têm sido identificadas e purificadas, como: sakacina A produzida pelo *Lactobacillus sakei* Lb706, sakacina K pelo *L. sakei* CTC494, sakacina P pelo *L. sakei* LTH673, curvacina A pelo *L. curvatus* LTH1174 e bavaricina A produzida pelo *L. bivaricus* MI401 (TICHACZEK et al., 1992; LARSEN et al., 1993; AXELSSON et al., 1993; REMIGER et al., 1996, citados por HUGAS e MONFORT, 1997).

Sob certas condições, uma bacteriocina produzida em laboratório, muitas vezes não apresenta o efeito desejado quando aplicada em uma determinada operação para a obtenção de um produto. Quando se avalia uma cultura produtora de bacteriocinas diante de uma determinada fermentação, temos que considerar que este processamento compreende um sistema complexo com vários fatores que influenciam a atividade microbiana, como: temperatura, pH e, os coadjuvantes de cura, nitrato e nitrito de sódio. Basicamente, dois grandes fatores influenciam a atividade destes *starters*: a formulação e a tecnologia utilizada na elaboração do produto. HUGAS et al. (1996), citados por HUGAS e MONFORT (1997), pesquisaram duas diferentes tecnologias de cura: a fermentação com nitrato e nitrito de sódio e somente com nitrito. O experimento envolveu cinco diferentes cepas

bacteriocinogênicas, com a característica de que duas possuíam atividade inibitória sobre o crescimento da *Listeria monocytogenes*. No tratamento com a adição de nitrato e nitrito de sódio, o crescimento da *L. monocytogenes*, em todas as amostras de embutidos (inoculação com cepas bacteriocinogênicas) foi inferior ao controle e, as maiores inibições aconteceram com cepas de *Lactobacillus ivanovii* LTH3097, *L. curvatus* LTH1174 e *L. sakei* CTC494. No tratamento (30 dias) utilizando somente o nitrato, as amostras de embutidos inoculadas com *L. curvatus* LTH1174 e *L. sakei* Lb706 apresentaram uma redução na carga de *Listeria monocytogenes* de  $1,6 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> para  $1,3 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>. Não foi observado nenhuma diferença significativa na variação da carga de *Listeria*, em relação ao cultivo iniciador padrão e o restante das culturas. Houve, porém, um maior efeito da bacteriocina sobre as amostras com o nitrito, ocasionando uma acentuada redução na carga de *Listeria monocytogenes*. Devemos considerar a redução do pH para 5,5 como um dos fatores mais importantes relacionados com a atividade antagônica (fermentação de embutidos), apesar de que, a efetiva inibição da *Listeria* se deve à produção da bacteriocinas pelo cultivo iniciador (HUGAS e MONFORT, 1997).

YOUSEF et al. (1991), citados por HUGAS e MONFORT (1997), também investigaram a presença de *L. monocytogenes* em embutidos e produtos cozidos fermentados de carne. Após a inoculação de cepas *Pediococcus acidilactici* ou da própria pediocina purificada, estes pesquisadores comprovaram a eliminação dos patógenos, incluindo a *Listeria monocytogenes*, com maior efeito sobre as carnes cozidas estocadas sob refrigeração. Com carne *in natura*, testaram a atividade antimicrobiana da pediocina produzida pelo *P. acidilactici* para reduzir a carga de *L. monocytogenes* em carcaças bovinas e, ainda, permanecer viável para inibir a posterior contaminação durante o processamento. Os resultados revelaram que esta bacteriocina em presença de carnes vermelhas possui um grande efeito inibidor sobre a *L. monocytogenes*.

Peito de frango *in natura*, acondicionado a vácuo ou em embalagens microaerófilas foram previamente contaminados com *L. monocytogenes* e, posteriormente (aspersão) com inóculos de *L. sakei* CT494, produtores de sakacina K. Os produtos embalados sob vácuo e com uma contaminação inicial associada a *Listeria monocytogenes* de 230 UFC cm<sup>-2</sup> apresentaram a ausência deste microrganismo após 13 dias de estocagem refrigerada. Porém, a carga deste microrganismo no lote controle (acondicionamento sob vácuo e sem a adição da



cultura biopreservativa), apresentou valores médios de 440 UFC cm<sup>-2</sup>, durante o mesmo período de estocagem. Em geral, as bacteriocinas produzidas por bactérias láticas possuem atividade sobre microrganismos Gram - positivos, como a *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* e *Brochothrix thermosphacta* (HUGAS, 1995; DAVIS et al., 1996). Porém, em determinadas condições, algumas bacteriocinas também podem inibir as bactérias Gram - negativas, como: *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* e *Escherichia coli* (BHUNIA et al., 1991).

#### **2.4.4.1 Manipulação genética**

O desenvolvimento e a otimização de um cultivo iniciador poderão ser aperfeiçoados através da engenharia genética. Esta técnica poderá ser utilizada para a introdução de genes, codificados com determinadas propriedades que estão presentes em outros microrganismos, como por exemplo, em um determinado cultivo iniciador competitivo.

A genética dos lactobacilos presentes nas carnes está sendo recentemente pesquisada e, alguns métodos para a introdução do DNA têm sido adaptados com resultados bastante satisfatórios, principalmente para as cepas de *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. bavaricus* e *L. plantarum*. Diferentes genes de lactobacilos têm sido clonados, como: gene *B - galactosidase*, *catalase* e genes formadores de bacteriocinas. Estes genes clonados são utilizados na produção de novos vetores ou no aperfeiçoamento das qualidades metabólicas de novas cepas (AYMERICH et al., 1993).

A clonagem do gene *lisostafina* do *S. staphylolyticus* em um cultivo iniciador composto por lactobacilos utilizado em produtos cárnicos, proporcionou a inibição de *S. aureus*, melhorando a segurança alimentar destes alimentos (HUGAS e MONFORT, 1997).

#### **2.4.5 Bacteriocinas de bactérias láticas**

Com relação a caracterização das bacteriocinas, assim como se usa *ase* em enzimologia, o sufixo *cin* caracteriza a atividade bacteriocinogênica. Este sufixo está

ligado ao gênero ou a espécie, conforme a especificação. A seqüência ordenada de letras, usada após o nome da bacteriocina, identifica a sua descoberta, especificando a cepa e a espécie. Assim que, a lactacina F é a sexta bacteriocina relacionada com a espécie *Lactobacillus*. É geralmente aceito que a estrutura dos genes que codificam as bactérias Gram - positivas estão presentes e associadas com operações ou caracterizações, como: imunidade, processamento e maturação. As bacteriocinas utilizam a nomenclatura usada pelos lantibióticos e neste sentido, o gene estrutural é designado por "A". Se mais de um componente peptídico é requerido para a função, ele pode ser identificado por "A1", "A2" e assim por diante. Para outros genes, são usadas designações que podem caracterizar propriedades, como: imunidade - I; transporte - T, E, F, G; protease - P; modificação - M, B, C, D, e regulação - R, K, G. Cientificamente, as bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas são classificadas em três classes: I - lantibióticos, II - não - lantibióticos com baixa estabilidade ao aquecimento e III - bacteriocinas (maioria) com grande estabilidade ao calor. Cada bacteriocina não é completamente pura e a sua sobrevivência é baseada e dependente da sua atividade. As classes I e II são as mais estudadas pela sua quantidade representativamente maior e pela provável utilização nos processamentos industriais (AYMERICH et al., 1998). As bacteriocinas pertencentes a terceira classe não são encontradas entre as cepas isoladas nos produtos cárneos (Quadro 10).

#### **2.4.5.1 Cepas bacteriocinogênicas da classe I (lantibióticos)**

Nesta classe se situam as bacteriocinas com cadeias de aminoácidos modificadas.

A nisina é a mais estudada e compreendem as bacteriocinas produzidas por algumas espécies de *Lactobacillus lactis*, isolada de produtos lácteos, vegetais e cárneos. Outra bacteriocina, pertencente a esta classe é a lactocina S.

Quadro 10: Características das bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas associadas aos produtos cárneos

Cepa	Bacteriocina	Peso molecular (D)
<b>Lantibióticos</b>		
<i>Lactobacillus sakei</i> L45, 148, V10	Lactocina S	3.777
<i>Lactococcus lactis</i> BB24 <i>L. lactis</i> , sub - espécie <i>lactis</i> (cepas para laticínios)	Nisina	3.353
<b>Bacteriocinas (<math>\cong</math> pediocina)</b>		
<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0, JD, H, E, F, M <i>P. pentosaceus</i> Z102 <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92	Pediocina PA-1 ( $\cong$ pediocina Ach ou JD)	4.600
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb706, CT494 <i>L. curvatus</i> LTH1174	Sakacina A ( $\cong$ sakacina K ou curvacina A)	4.300
<i>Lactobacillus sakei</i> LTH673, Lb674 <i>L. bavaricus</i> MI401	Sakacina P	-
<i>Lactobacillus sakei</i> MN	Bavaricina MN	4.769
<i>Enterococcus faecium</i> CTC492, DPC1146	Enterocina A	4.829
<i>Leuconostoc gelidum</i> A - UAL187 <i>L. mesenteroides</i> TA33a	Leucocina A - UAL	3.930
<i>Carnobacterium maltaromicus</i> KLV17B		
<i>C. piscicola</i> V1	Carnobacteriocina B1	4.524
<i>Carnobacterium piscicola</i> KLV17B	Carnobacteriocina B2	4.969
<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	Piscicolina 126	4.416
<b>Bacteriocinas (<math>\neq</math> pediocina)</b>		
<i>Lactobacillus curvatus</i> FS47	Curvaticina FS47	4.000
<i>Lactobacillus brevis</i> SB27	Brevicina 27	5.200
<i>Pediococcus acidilactici</i> L50	Pediocina L50	5.250
<i>Enterococcus faecium</i> CTC492	Enterocina B	5.479
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A, LV61	Carnobacteriocina ( $\cong$ piscicolina 61)	5.049
<i>Carnobacterium divergens</i> 750	Divergicina 750	3.447
<i>Lactobacillus plantarum</i> CT305, C11	Plantaricina A	-
<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	Divergicina A	4.224

Fonte: AYMERICH et al., 1998.

Alguns *Lactobacilos* testados em produtos alimentícios, como *L. sakei* L45, isolados de embutidos dessecados noruegueses e, *L. sakei* V18 e 148, isolados de embutidos fermentados espanhóis, produzem a lactocina S. Entretanto, pesquisadores, como RODRÍGUES et al. (1995), caracterizaram as bacteriocinas produzidas pela última cepa, como sakacina M. A lactocina S contém uma seqüência

preestabelecida de peptídios. Esta bacteriocina tem sido purificada e homogeneizada por precipitação com sulfato de amônio e, modificações em cátions e ânions através de interações hidrofóbicas e filtrações específicas (gel). O peso molecular determinado por espectrofotômetro de massa, é da ordem de 3.778 D.

A grande quantidade de cepas que produzem lactocina S mostra uma especial importância para os fermentados de carnes produzidos nas mais diferentes regiões climáticas, principalmente Espanha e Noruega. *Lactobacillus lactis* BB24, característico em embutidos fermentados, possui a capacidade de produzir nisina no meio em que atua (HARRIS et al., 1992).

A nisina, produzida por cepas encontradas em produtos lácteos é a bacteriocina mais estudada na prática; tanto bioquimicamente, como geneticamente. Apresenta estrutura pentacíclica e possui peso molecular equivalente a 3.353 D. Nos produtos lácteos é comprovado o efeito inibidor da nisina relacionada com a atividade do *C. botulinum*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. ao se usar quantidades entre 3,75 e 12,50 mg kg<sup>-1</sup> (150 - 500 U.I. g<sup>-1</sup>). Em produtos cárneos, a nisina não tem sido muito utilizada devido a vários fatores: baixa solubilidade, dificuldade de distribuição e pouca estabilidade. Na maioria dos casos, a utilização para efeito inibidor, é antieconômico (CHIU et al., 1989; FOWLER e GASSON, 1991, citados por AYMERICH et al., 1998). A nisina na forma de aspersão parece ser uma alternativa na descontaminação da superfície de carnes (CUTTER et al., 1994) e a combinação com nitrito de sódio (1.000 - 10.000 U.I. g<sup>-1</sup> de nisina) é bastante efetiva na inibição do *Clostridium* e de outros patógenos como a *Listeria* e *Staphylococcus* em embutidos, em produtos suínos e carnes *in natura* ( CHUNG et al., 1989).

#### **2.4.5.2 Cepas bacteriocinogênicas da classe II**

Esta classe compreende as bacteriocinas com peso molecular inferior a 10 KD, resistentes a tratamentos térmicos e com modificações na cadeia de aminoácidos. As mais estudadas são as bacteriocinas ( $\cong$  pediocina) com atividade antagônica contra *Listeria* spp.. Este grupo tem sido chamado de família - pediocina porque foi a primeira bacteriocina a ser identificada e a mais extensivamente estudada. As cepas que produzem este tipo de bacteriocina são encontradas em

muitas espécies de bactérias lácticas: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* (AYMERICH et al., 1998).

Os cultivos iniciadores como *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, JD, H, E, F e M, isolados de embutidos tipo - americano, *P. pentosaceus* Z102, isolado de embutidos tipo - espanhol, *P. parvulus*, isolado de produtos vegetais e *Lactobacillus plantarum* WHE92, isolado de queijos, produzem a bacteriocina pediocina PA - 1 (BHUNIA et al., 1991; HARRIS et al., 1989). Esta bacteriocina inibe a multiplicação de *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* e *S. aureus*.

A pediocina PA - 1, com peso molecular de 4.600 D, foi primeiramente caracterizada a partir de cepas de *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 e, posteriormente de *P. acidilactici* H, com mudança de denominação para pediocina Ach. Em determinados experimentos *in situ*, com diferentes produtos alimentícios, como: queijos, carne *in natura* e embutidos fermentados, a bacteriocina é capaz de reduzir ou estabilizar as cepas de origem (NIELSEN et al., 1990).

Três diferentes cepas de *Lactobacillus*: *L. sakei* Lb706, *L. curvatus* LTH1174 e *L. sakei* CTC494, isoladas de embutidos fermentados por diferentes processos, produzem a mesma bacteriocina. Entretanto, elas diferem nominalmente e, são caracterizadas como: sakacina A, curvacina A e sakacina K, respectivamente (HAMMES et al., 1990; SCHILLINGER et al., 1991; HUGAS et al., 1993). Esta bacteriocina possui peso molecular equivalente a 4.300 D e alta estabilidade térmica. Estas três cepas têm sido pesquisadas em vários experimentos *in situ*, com comprovada atividade inibidora sobre a *Listeria*.

Em embutidos fermentados, *Lactobacillus sakei* CTC494, *L. sakei* Lb706 e *L. curvatus* LTH1174 são capazes de reduzir a carga listerial com maior efeito do que outros cultivos iniciadores não produtores de bacteriocinas (HAMMES et al., 1990).

*Lactobacillus sakei* LTH673 e *L. sakei* Lb674 isolados de carnes e *L. bavaricus* MI401 isolado de massa azeda de panificação produzem a mesma bacteriocina, respectivamente chamadas de sakacina K, sakacina 674 e bavaricina A (TICHACZEK et al., 1994). A bacteriocina possui atividade sobre *Lactobacillus*, *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecium*, mas não tem efeito sobre *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram - negativas.

Em embutidos, *Lactobacillus sakei* LTH673 e *L. bavaricus* MI401, inoculados como cultivos iniciadores, não aumentaram a velocidade de fermentação, mas

inibiram acentuadamente a multiplicação da *Listeria* quando comparada com a cultura não-bacteriocinogênica de *L. sakei* LTH2799 (HUGAS et al., 1996, citados por AYMERICH et al., 1998).

*Lactobacillus sakei* MN (comumente chamado de *L. bavaricus* MN) produz bavaricina MN, com peso molecular equivalente a 4.769 D (LEWUS et al., 1991).

Trabalhos de pesquisas testaram a habilidade do *Lactobacillus bavaricus* na inibição do crescimento de três cepas de *L. monocytogenes* (tratamento com refrigeração a 4 e 10 °C), em cubos de carnes embaladas a vácuo, com molho de cobertura e, com molho e adição de glicose. A 4 °C, a *Listeria* foi inibida ou exterminada, dependendo da carga inicial do *L. bavaricus*. A 10 °C, a inibição aconteceu lentamente, mas não se verificou a inativação da *Listeria* nas amostras que apresentavam cubos de carnes com molho. Na mais baixa temperatura de refrigeração (4 °C), as amostras com a adição de glicose e elevada carga inoculada de *L. bavaricus* apresentaram os maiores efeitos com relação a inibição da *Listeria monocytogenes* (WINKOWSKI et al., 1993).

*Enterococcus faecium* CT492, isolado de embutidos fermentados e dessecados, tipo espanhol (AYMERICH et al., 1996) e *E. faecium* DPC1146, isolado de produtos lácteos (PARENTE e HILL, 1992) produzem a mesma bacteriocina; a enterocina A (peso molecular equivalente a 4.829 D) e a enterocina 1146, respectivamente. *E. faecium* CTC492 tem efeito antagônico para outras espécies de *Lactobacillus*, *L. monocytogenes*, *Carnobacterium divergens*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium perfringens*.

*E. faecium* DPC1146 é conhecido pela sua atividade sobre *Listeria* e *Lactobacillus sakei* WCFB2714. No leite, a bacteriocina mostrou boa atividade, reduzindo a contagem (até 34% da carga inicial) de *Listeria* na temperatura entre 6 e 30 °C (PARENTE e HILL, 1992).

A produção da enterocina A é inibida pela presença da pimenta e pelo cloreto de sódio em embutidos fermentados. Em vários ensaios, esta bacteriocina é capaz de inibir a multiplicação da *Listeria* em embutidos condimentados e fermentados, carne moída, presunto cozido, patê suíno e queijo (HUGAS et al., 1996, citados por AYMERICH et al., 1998).

*Leuconostoc gelidum* A - UAL187 (HARDING e SHAW, 1990) e *L. mesenteroides* TA33a (PAPATHANASOPOULOS et al., 1995, citados por AYMERICH et al., 1998), isolados de carnes embaladas a vácuo e mantidas sob

refrigeração, produzem as bacteriocinas conhecidas como leucocina A - UAL e TA33a, respectivamente. Estas bacteriocinas inibem a multiplicação de bactérias lácticas, como: *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecium*. São resistentes a ácidos e estáveis ao calor. *Leuconostoc carnosum* B - TA11a, isolado de carnes embaladas a vácuo, produz a bacteriocina B - Ta11a, similar a leucocina A - UAL.

A cepa *Carnobacterium piscicola* KLV17B, isolada de produtos cárnicos embalados a vácuo, produz duas bacteriocinas conhecidas por carnobacteriocina B1 e B2. A carnobacteriocina B1 é também produzida pela cepa multibacteriocinogênica *Carnobacterium piscicola* V1, isolada de peixes e conhecida por piscicocina V1a. Estas bacteriocinas possuem atividades de inibição sobre outras carnobactérias, como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Listeria* e *Enterococcus*. A carnobacteriocina B1 tem peso molecular equivalente a 4.525 D e a B2, 4.970 D. A *Carnobacterium piscicola* JG126, isolada do presunto, produz a bacteriocina piscicolina 126 com grande atividade antilisterial. Seu peso molecular corresponde a 4.416 D. A adição de piscicolina JG126 em massa de presunto condimentada com pimenta inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes* por até 14 dias, mostrando atividade superior a nisina (JACK et al., 1996, citados por AYMERICH et al., 1998).

Pertencente a classe II, determinadas cepas têm sido caracterizadas no grupo não - pediocina. As bacteriocinas que pertencem a este grupo mostram características físico-químicas semelhantes ao grupo pediocina como hidrofobicidade e alta estabilidade ao calor. Entretanto, possuem uma seqüência diferenciada de aminoácidos e não apresentam eficiente atividade contra *Listeria*. Seis diferentes bacteriocinas, isoladas de cepas presentes em carnes têm sido associadas a este grupo. A mutante *Carnobacterium piscicola* LV17A e a *Carnobacterium piscicola* LV61 produzem bacteriocinas com características do grupo, conhecidas como: carnobacteriocina A e piscicolina 61 (peso molecular equivalente a 5.049 D). *Lactobacillus curvatus* FS47, isolado de produtos de carne moída, produz a curvaticina FS47, com atividade de inibição sobre *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Bacillus*. *Lactobacillus brevis* SB27, isolado de salsichas fermentadas, produz a brevicina 27 (peso molecular equivalente a 5.200 D), bastante ativa contra outros lactobacilos e pediococos (BENOIT et al., 1994).

*Pediococcus acidilactici* L50, isolado de salsichas fermentadas espanholas, produz a pediocina L50 (peso molecular equivalente a de 5.250 D). O espectro antibacteriano abrange *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*,

*Enterococcus*, *Propionibacteria*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, mas não possui atividade sobre bactérias Gram – negativas. *Carnobacterium divergens* 750, isolada de carnes embaladas a vácuo, produz a divergicina 750. A bacteriocina é hábil na inibição de crescimento de *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Listeria monocitogenes* e *Clostridium perfringens* (AYMERICH et al., 1998).

#### **2.4.5.3 Cepas bacteriocinogênicas da classe IIb**

As bacteriocinas desta classe possuem as características físico-químicas da classe II, mas requerem uma atividade complementar de dois peptídios para a bacteriocinogenicidade. Apenas uma cepa de origem cárnica está associada a esta classificação; *Lactobacillus plantarum* CTC305. Isolada de embutidos (espanhóis) fermentados, produz um peptídio que é idêntico a plantaricina A, do *Lactobacillus plantarum* C11, isolado do pepino fermentado (AYMERICH et al., 1998).

#### **2.4.5.4 Cepas bacteriocinogênicas da classe IIc**

As bacteriocinas pertencentes a esta classe possuem uma baixa resistência ao calor. *Carnobacterium divergens* LV13 (WOROBO et al., 1995, citados por AYMERICH et al., 1998), originária de carnes embaladas a vácuo, produz a bacteriocina chamada divergicina A, com atividade antagônica muito reduzida.

#### **2.4.6 Modo de ação das bacteriocinas**

A atividade inibidora das bacteriocinas é sobre as bactérias Gram - positivas e, a inibição das bactérias Gram - negativas não é efetivada. A membrana citoplasmática, que limita o citoplasma e o meio externo, possui ao redor uma camada de peptídeoglicanos, que é significativamente mais estreita nas bactérias Gram - negativas. Estas bactérias possuem uma camada adicional, que também



pode ser chamada de membrana externa e é composta de fosfolipídios, proteínas e lipopolisacarídeos (LPS) e, esta membrana é impermeável para a maioria das moléculas. Assim que, a presença de poros nesta camada pode permitir a livre difusão de moléculas com peso molecular inferior a 600 D. As menores bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas possuem aproximadamente 3 KD e elas são demasiadamente grandes para alcançar o objetivo, a membrana citoplasmática (KLAENHAMMER, 1993; STILES e HASTINGS, 1991).

Considerando a atividade da nisina A com potencial de inibição de crescimento de muitas bactérias Gram - positivas, a estrutura molecular desta bacteriocina é similar a outras 3 bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* (lactacina 481), *Lactobacillus sakei* (lactocina S - 3,7 KD, 33 aminoácidos) e *Carnobacterium piscicola* (carnocina U149 - 4,6 KD, 37 aminoácidos); todas formando a classe I das bacteriocinas originárias das bactérias lácticas (KLAENHAMMER, 1993).

Nas bactérias Gram - positivas, é conhecida sua atuação sobre a membrana energizada para neutralizar a força iônica dos prótons, inibindo a fixação de aminoácidos e com isso, causando a liberação de aminoácidos acumulados (JUNG e SAHL, 1991, citados por ABEE et al., 1994).

A nisina Z é uma variante natural da nisina, isolada do *Lactococcus lactis*, subsp. *Lactis*, cepa NIZO 22186. O gene para este lantibiótico, designado nisZ foi clonado e a seqüência de nucleotídeos foi caracterizada para ser idêntica à precursora nisina, por uma simples mutação, resultando na substituição da His<sup>27</sup> por Asn<sup>27</sup> na matriz polipeptídica (MULDER et al., 1991). A exposição da *Listeria monocytogenes* a nisina Z resulta em:

- imediata perda de íons potássicos (K<sup>+</sup>) celulares,
- despolarização da membrana citoplasmática e,
- hidrólise e efluxo parcial da ATP celular (ABEE et al., 1994).

Com isto fica demonstrado que o principal objetivo para a nisina Z é a membrana citoplasmática.

Recentemente, MORTVEDT-ABILDGAARD et al. (1995), mostraram que a produção e a atividade bactericida da lactocina S (*Lactobacillus sakei*) são maiores em pH ácido.

### 2.4.6.1 Formação de poros pela nisina

A membrana citoplasmática da célula bacteriana é o objetivo principal para a atividade da nisina. Nisina A e Z mostram aumento da atividade em valores de pH ácido e são capazes de permeabilizar estas membranas (ABEE et al., 1994). A nisina A pode formar transitoriamente poros com diâmetros variando entre 0,2 e 1,2 nm em membranas lipídicas. E, cada poro permite a passagem de solutos hidrofílicos com peso molecular acima de 0,5 KD. A nisina A e Z por consequência, provoca o vazamento da ATP das células (ABEE et al., 1994).

Recentemente, DRIESSEN et al. (1995), mencionaram que o modo de ação da nisina pode ser determinado pela composição fosfolipídica da membrana. A ação da nisina sobre as membranas contendo fosfolipídeos aniônicos, como fosfatidilglicerol, envolve uma perturbação localizada (estrutura de dupla camada), que influenciará uma maior ou menor inserção da nisina na membrana. Entretanto, este mecanismo sugere que a interação eletrostática entre moléculas de nisina e fosfolipídeos, pode conduzir grupos lipídicos para dentro dos poros. A nisina também apresenta ação contra esporos de *Clostridium* e *Bacillus*, mas neste caso, o exato mecanismo, ainda não está completamente elucidado.

### 2.4.6.2 Ação da pediocina PA -1

Os pediococos são bastante aplicados na fermentação de carnes e vegetais. A mais estudada bacteriocina produzida por este gênero é a pediocina PA - 1 do *Pediococcus acidilactici*, recentemente caracterizada como idêntica a pediocina Ach (KLAENHAMMER, 1993). A bacteriocina possui frações seqüenciais similares a importantes bacteriocinas antilisteriais (Sakacina A e P, Leucocina A e Carnobacteriocina BM1 e B2), produzida por bactérias ácido lácticas associadas a carnes. Estes peptídeos são ativos contra uma grande faixa de bactérias Gram - positivas, incluindo *Listeria monocytogenes*.

A pediocina PA - 1 é altamente hidrofóbica; atua sobre a membrana citoplasmática, dissipando íons e inibindo o transporte de aminoácidos nas células sensíveis. A pediocina PA - 1 contém duas ligações dissulfetos entre os resíduos de cisteína nas posições 24 e 44 que é essencial para a atividade. Estudos preliminares

sobre os efeitos da permeabilização da membrana indicam que a sakacina A e P (CHIKINDAS et al., 1993), leucocina e carnobacteriocina B2 e BM1 possuem a uma atividade semelhante a pediocina PA - 1. A pediocina PA - 1 forma poros hidrofílicos na membrana citoplasmática, análogo à ação da lactococina A, a bacteriocina produzida pelo *L. lactis*. A lactococina A é um pequeno peptídeo hidrofóbico com 54 aminoácidos, que especificamente inibe o crescimento de outras subesp. *L. lactis*. O efeito da Lactococina A purificada sobre a célula do lactococo e, sobre a membrana, mostra que a bacteriocina aumenta a permeabilidade da membrana citoplasmática do sensível lactococo. A especificidade da Lactococina A para o lactococo, alerta para o fato de que a bacteriocina reconhece a proteína receptora da membrana específica do *Lactococcus*.

### 2.4.6.3 Biopreservação do peixe

A aplicação de nisina A na preservação de produtos de pescado foi avaliado por TAYLOR et al. (1990). Ficou demonstrado que o tratamento da bacteriocina sobre filé de bacalhau defumado, inoculado com esporos de *Clostridium botulinum*, retardou a produção de toxinas durante 5 dias a 10 °C e por 12 horas a 26 °C. O tratamento com nisina, entretanto, não interferiu no crescimento de bactérias não-patogênicas e, em todas as amostras, a toxina botulínica foi formada antes da deterioração se tornar evidente.

O efeito da nisina Z, carnocina U149 e bavaricina A sobre o crescimento bacteriano e a vida-de-prateleira do camarão em salmoura foi recentemente avaliado e comparado com uma solução de benzoato - sorbato e com um controle adicionado de preservativos. Especificamente, este produto contém de 3 a 6% de cloreto de sódio, ácido sórbico e benzóico em concentração de 0,05 a 1%, pH entre 5 e 6 e, é estocado a uma temperatura entre 0 e 6 °C. A solução de benzoato - sorbato preserva o camarão em salmoura por um razoável período de estocagem (59 dias). Com relação ao teste efetuado com este produto, a vida-de-prateleira na ausência do preservativo não ultrapassou 10 dias. A bacteriocina Carnocina U149, de um modo geral, não influenciou no aumento da vida-de-prateleira; entretanto, bavaricina A (sobrenadante de células, livres de *L. bavaricus* MI 401) estendeu a vida-de-

prateleira para 16 dias. Significativamente, quando a nisina Z, isolada e purificada, foi aplicada na mesma amostra, a vida-de-prateleira se estendeu para 31 dias. Estes resultados dão bons indicativos para a biopreservação de certos produtos de peixe com nisina Z (EINERSSON e LAUZON, 1995).

## **2.4.7 Potencialidade das bacteriocinas**

### **2.4.7.1 Fatores intrínsecos dos alimentos**

A ação das bacteriocinas contra microrganismos sensíveis é influenciada por um grande número de fatores: pH, concentração celular, conteúdo de lipídios, enzimas proteolíticas e pelo sistema líquido x sólido. A eficiência da nisina Z contra células de *Listeria monocytogenes* é reduzida significativamente na presença de cátions bivalentes, como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , que podem interagir com as cargas negativas dos fosfolipídeos, presentes na membrana citoplasmática. Isto pode resultar na inibição da interação eletrostática entre as cargas positivas das bacteriocinas e as cargas negativas dos grupos das moléculas de fosfolipídeos e/ou neutralização destas cargas negativas destes grupos, induzindo a condensação destes lipídios, obtendo como resultado, uma membrana mais rígida (ABEE et al., 1994). A presença destes íons bivalentes nos alimentos pode reduzir potencialmente a eficiência da ação da nisina contra bactérias deterioradoras Gram - positivas patogênicas.

### **2.4.7.2 Efeito da temperatura**

A ação da nisina é também dependente da temperatura. A relação da nisina Z com a indução do efluxo de íons  $K^+$  das células de *L. monocytogenes* cresce a 30 °C, mas mostra uma severa redução a temperaturas decrescentes. O arranjo das cadeias hidrocarbônicas dos lipídios, que ocorre a baixas temperaturas resulta em um decréscimo da fluidez da membrana e é provavelmente responsável pela redução da eficiência da nisina Z (ABEE et al., 1994). A nisina Z necessita de uma

adaptação em nível de membrana citoplasmática para crescimento a baixas temperaturas, de maneira que possa atuar eficientemente contra um espectro de bactérias sensíveis, acima de uma determinada faixa de temperatura (ABEE et al., 1995).

#### **2.4.7.3 Resistência a bacteriocinas**

Muitas bactérias Gram - positivas mostram uma resistência a nisina, devido a habilidade em sintetizar a enzima nisinase, capaz de inativar a nisina. Esta enzima, em diversas pesquisas, foi isolada de algumas espécies de *Bacillus* spp. Um outro mecanismo de resistência envolve a adaptação das células a altas concentrações de bacteriocinas. MING et al. (1997) avaliando a resistência da nisina frente a patogênicos de origem alimentar e bactérias deterioradoras, caracterizaram um fenotipo derivado da *L. monocytogenes* Scott A, altamente resistente em níveis bastante elevados de nisina.

#### **2.4.8 Legislação**

O uso de bactérias lácticas bacteriocinogênicas em produtos de carne é considerado como uma alternativa para a produção de bacteriocinas e, o efeito no processamento de alimentos dependerá da capacidade de produção destes biopreservativos e do antagonismo com outras bactérias. Neste sentido, é importante a utilização de cepas do próprio meio, melhor adaptadas e mais competitiva. Entretanto, nem sempre é possível utilizar um cultivo iniciador com uma abrangência antimicrobiana adequada, sem que se promova efeito indesejáveis de sabor ou aparência, principalmente quando se usa uma carga microbiana elevada na produção destes inibidores. Recombinando o DNA, poderemos ter a possibilidade de transferir genes para outros biopreservativos e/ou culturas e/ou criar cepas recombinadas produtoras de diferentes bacteriocinas, aumentando-se o espectro de atividade. Algumas clonagens e experiências mostram esta tendência para uma aplicação futura através da recombinação de cepas. Primeiramente, a pediocina PA -1 foi clonada na *Escherichia coli* (MARUGG et al., 1992), seguida pela acidocina B

em *Lactobacillus plantarum* 80 (POUWELS e LEER, 1993, citados por AYMERICH et al., 1998), lactococina A em *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 e pediocina PA - 1 em *Lactococcus lactis* LI108 (CHIKINDAS et al., 1995, citados por AYMERICH et al., 1998).

Posteriormente, leucocina A em *Lactococcus lactis* IL1403, lactacina F em *Carnibacterium piscicola* LV17 (ALLISON et al., 1995), divergicina A em *Carnibacterium piscicola* LV17C, *Lactococcus lactis* IL403 e em *L. lactis* MG1363 (WOROBO et al., 1995, citados por AYMERICH et al., 1998).

A diretiva (1990) da *Comissão da Comunidade Européia*, revisada pela decisão de 1996, classifica os microrganismos geneticamente modificados em dois grupos: o primeiro, contém microrganismos de risco virtual zero e o segundo compreende o restante dos microrganismos com alto grau de risco. Os microrganismos do primeiro grupo para serem aplicados e, especialmente em processos industriais, precisam ser notificados e aceitos pelas autoridades sanitárias oficiais. O *Regulamento da Comunidade Européia*, que se refere à habilitação para a utilização destes microrganismos geneticamente modificados, condiciona o uso às seguintes exigências: conhecimento da origem da cepa, volume das culturas, sistema de utilização da carga microbiana, função ou intenção do material genético envolvido na manipulação, proposta de utilização com inclusão das expectativas de resultados e resumo dos prováveis riscos à saúde pública. A exemplo dos aditivos alimentares, a utilização industrial das bacteriocinas (totalmente ou parcialmente purificadas) em produtos de carnes, deve prever: desenvolvimento da microflora e a resistência ao inibidor, efeito da inatividade por enzimas, atividade proteolítica e lipolítica, identidade, propriedades físicas e químicas da bacteriocina, descrição do processo de fabricação, metodologia analítica para controle, eficácia e previsão dos resultados, avaliação da segurança e teste de toxidez. De acordo com AYMERICH et al. (1998), a nisina foi aprovada pela *Food and Agriculture Organization* e *World Health Organization* (FAO/WHO) em 1969, *European Community* (EC) em 1983 e *Food and Drug Administration* (FDA) em 1987.

No Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL), através da Portaria 06/1990, que inclui este conservante na Tabela I da Resolução nº 04/1988 – CNS/MS para ser utilizado em queijos fundidos e preparados à base de queijos fundidos na dose máxima de 12,5 mg kg<sup>-1</sup>. Esta dosagem foi também liberada pelo Departamento de Técnicas Normativas do

Ministério da Saúde (DETEN/MS), através da Portaria nº 34/1992, estendendo o uso do aditivo com função conservante para requeijão e queijo pasteurizado (Portaria nº 29/1996) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA ALIMENTAÇÃO - ABIA, 1996 e BATISTA et al., 2001).

A utilização da nisina é permitida em muitos países, para ser usada em uma variedade de alimentos, incluindo: queijos, produtos enlatados, peixe fresco, produtos de panificação, leite pasteurizado e cerveja. Sua biopreservação está baseada na inativação de bactérias formadoras de esporos Gram - positivas, como *Clostridium* e *Bacillus*. Outras bacteriocinas (pediocina PA - 1, enterocina A e sakacina K) com atividades antimicrobianas específicas para utilização em vários produtos alimentícios ainda estão em processo de avaliação (HUGAS et al., 1993; HUGAS e MONFORT, 1997).

Um estudo conduzido por LEE e SALMINEN (1995), citados por HUGAS e MONFORT (1997), mostra que novos efeitos probióticos poderiam ser utilizados na produção de alimentos formulados para crianças, sucos de frutas fermentados, produtos de soja, alimentos fermentados à base de cereais e novos produtos cárneos. Uma cepa probiótica pode viabilizar a formação de ácidos, ao mesmo tempo em que é capaz de colonizar o trato intestinal humano, mesmo que temporariamente, através de mecanismos de aderência ou aglutinação com as células intestinais. Os mecanismos de agregação ou fixação no trato intestinal e a mudança ou controle das características genéticas das bactérias ácido lácticas tem sido o maior desafio no estudo das qualidades probióticas destes microrganismos. Como exemplo, determinados lactobacilos, utilizados na produção de bebidas lácteas fermentadas, passam pelo trato gastrointestinal em estado viável; possuem habilidade em se multiplicar neste meio intestinal, produzir ácidos orgânicos e outros compostos biologicamente ativos *in situ* e, com isso, controlar o ambiente microbiano. Qualidades tais como: especificidade com o hospedeiro, compatibilidade e interações ecológicas com outras espécies pertencentes a microflobiota intestinal, são importantes e, devem ser consideradas na utilização da flora láctica pelos processos industriais na fabricação de alimentos fermentados (SABOYA et al., 1997).

Segundo HUGAS e MONFORT (1997), as bacteriocinas ou bactérias lácticas bacteriocinogênicas são promissores biopreservativos. Contudo, boas práticas de higiene e novas tecnologias aplicadas à embalagem poderão estender a vida - de -

prateleira, reduzindo a multiplicação de microrganismos e aumentando a segurança higiênica através da prevenção de intoxicações microbianas de origem alimentar.

#### 2.4.9 Detecção e quantificação de bacteriocinas

Existem muitas técnicas para detectar a produção de bacteriocinas. As metodologias utilizadas são, na maioria, derivadas daquelas utilizadas na análise de antibióticos. A maioria está baseada na difusão das bacteriocinas em um meio de cultura sólido ou semi - sólido que inibe o crescimento de um microrganismo sensível. Os métodos mais desenvolvidos e habitualmente utilizados são conhecidos como: *flip streak*, *spot on the lawn* e *well diffusion*. No método do ágar invertido, ou *flip streak*, a cepa produtora da bacteriocina é estriada em meio semi - sólido com posterior incubação e o microrganismo sensível a bacteriocina é estriado perpendicularmente no reverso do ágar (KEKESY e PIGUET, 1970).

Na “técnica em gota” ou método *spot on the lawn*, a cepa produtora de bacteriocina é inoculada sobre ágar, incubada e, após, a cepa indicadora é inoculada numa sobrecamada de ágar (HARRIS et al., 1989).

O ensaio mais direto é o teste conhecido como: “difusão em poços” (HARRIS et al., 1989). Neste método, um volume do sobrenadante da cepa produtora de bacteriocina é transferido para poços perfurados, em ágar inoculado com o microrganismo sensível a bacteriocina.

LEWUS e MONTVILLE (1991), compararam o Agar MRS para *Lactobacillus* (Merck 10660) e o Agar-peptona de farinha de soja (Trypticase Soy Agar-BBL 11043) suplementado com 0,6% de extrato de levedura, para determinar qual o mais adequado para a detecção da produção de bacteriocinas entre as 22 bactérias ácido lácticas isoladas e, para identificar a cultura com maior sensibilidade. Entre as bactérias lácticas, encontrava-se o *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *L. sakei* Lb 796 e *L. sakei* Lb 706. Quando o MRS Agar foi utilizado, uma grande zona de inibição circundou as colônias de todas as cepas devido a grande produção de ácido láctico oriundo da fermentação da glicose presente no meio. O uso do TSAYE eliminou esta inibição ácida. Entretanto, em muitos casos, o resultado foi de difícil leitura porque as estrias da cultura produtora se difundiram no ágar. As zonas de inibição no método



da “técnica em gota” foram mais bem visualizadas. Enquanto determinadas cepas foram ativas somente contra uma ou duas espécies, *L. sakei* 15521 foi a mais sensível indicadora de produção de bacteriocinas. *L. sakei* Lb706 foi também inibido pela maioria dos produtores de bacteriocinas. Poucas cepas testadas e confirmadas como positivas usando a “técnica em gota” tiveram resultados positivos no método por “difusão em poços”. Efeitos de agregação, bacteriocinas não difundidas, inativação de proteases e problemas de concentração podem fornecer resultados falsos-negativos usando o método da “difusão em poços”. Os autores relataram que a “técnica em gota” para a detecção de bacteriocinas é melhor reprodutível e apresenta resultados mais rápidos e precisos do que o teste do “ágar invertido” ou “difusão em poços”.

A terminologia UA ou “unidades arbitrárias”, é a que representa a quantificação da atividade de uma bacteriocina. E, este valor é determinado através de diluições seqüenciais da amostra observando - se a relação 1:2. O inverso da mais alta diluição capaz de apresentar efeito inibitório é definido como o resultado que representa a quantificação. Este valor pode ser dividido pelo volume da amostra e, o resultado é expresso como UA mL<sup>-1</sup>. Apenas a nisina comercial possui uma unidade reconhecida. Assim que, 1 g de nisina comercial (Nisaplina) contém 25 mg de nisina pura, que corresponde a 10<sup>6</sup> UI. O uso de nisina (concentração conhecida), pode fornecer uma relação entre a UA e a equivalente UI (MONTVILLE e WINKOWSKI, 1997; BATISTA et al., 2001).

## **2.5 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* faz parte de um grupo de microrganismos contaminantes do ambiente, que tem sido isolada de águas doces e marinhas, assim como, de muitos produtos de pescado. Este microrganismo foi isolado de produtos pesqueiros processados, entre eles, os defumados, cozidos, congelados, produtos marinados e derivados do surimi. A espécie patogênica *Listeria monocytogenes*, possui uma certa resistência ao calor. Entretanto, se tem observado que a pasteurização comercial é suficiente para inativar este microrganismo. Esta espécie patogênica de origem alimentar afeta principalmente pessoas idosas e imunodeprimidas. Os sintomas da infecção, denominados de listeriose, incluem:

meningite, infecção do sistema nervoso central, aborto, parto prematuro e septicemia (CARVAJAL, 2000).

*Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram - positivo, anaeróbio facultativo, não esporogênico e com motilidade no intervalo de temperatura entre 20 e 25 °C, embora a temperatura ótima de crescimento esteja entre 30 e 37 °C. É um microrganismo patogênico, sendo um dos mais importantes veiculados por produtos comestíveis a partir da década de 80 (FUCHS e REILLY, 1992).

Os vegetais, o leite e os laticínios têm sido objeto de muita atenção, devido ao comprometimento nos surtos das infecções alimentares. Entretanto, aos produtos da pesca, é dada muito pouca atenção, apesar de uma epidemia de listeriose ter acontecido na Nova Zelândia a partir de 1980, sugerindo uma possível relação com o consumo de mariscos e peixe *in natura*. Este surto teve como resultado cinco mortes em vinte e dois casos. A *L. monocytogenes* é considerada um contaminante ambiental e, portanto, é muito provável que se encontre na água, *habitat* do pescado. Entre as fontes de isolamento, encontram-se as águas residuais tratadas ou não, águas superficiais de rios, lagos e arroios, efluentes de frigoríficos e plantas processadoras de frango. A presença deste microrganismo em ambiente marinho não é surpreendente, pois o microrganismo é muito tolerante ao cloreto de sódio (CARVAJAL, 2000).

### 2.5.1 Incidência em produtos pesqueiros

*Listeria monocytogenes* é freqüentemente encontrada em produtos pesqueiros. Nos resfriados, a incidência é maior nos crustáceos. Nos produtos congelados, é encontrada basicamente em filés de peixe e camarão descascado. Ao contrário, ainda não foi detectada a sua presença no pescado salgado-seco. Entre os produtos congelados, a presença de *L. monocytogenes* é significativa no camarão e na carne de siri cozida, nas caudas de lagostas, nos filés de peixes cartilagosos e nos produtos derivados do surimi. A presença de *L. monocytogenes* nos produtos pesqueiros congelados, reforça a idéia de que esta tecnologia não tem nenhum efeito significativo sobre este microrganismo. A sua presença em pescado cozido congelado demonstra a possibilidade da contaminação após a operação de cozimento. O alimento conhecido por *ceviche*, é um prato consumido sem cocção,

muito comum nos países latinoamericanos e Peru. Este prato é preparado com pescado submetido ao marinado com suco de limão, por um período de 15 minutos a 1 hora, agregado de vegetais como cebola e alho. O pH do produto final se encontra entre 4,2 e 5,1. O pH mínimo para o crescimento da *Listeria monocytogenes*, utilizando caldo nutritivo, é de 4,3 a 30 °C ou 5,0 a 4 °C. E, dependendo do acidulante utilizado, o pH mínimo poderá ser 5,2 a 30 °C e 7,0 a 4 °C. Uma avaliação sobre a incidência de *Listeria* spp. em *ceviches*, adquiridos nos mercados de Lima e Callao (Peru), apresentou uma elevada carga de *L. innocua* (75% das amostras examinadas). Entretanto, apenas 9% das amostras estavam relacionadas com a presença de *L. monocytogenes*. Este microrganismo sobrevive por pouco tempo ao marinado ácido. A capacidade da *L. monocytogenes* para tolerar um ambiente com pH baixo tem importância porque este microrganismo encontra este tipo de ambiente *in vivo*, durante sua passagem pelo trato intestinal. A tolerância à acidez também a protege de outros efeitos ambientais estressantes, como o calor e a osmose. *L. monocytogenes* tem sido detectada em 12,2% de produtos de pescado defumado e fermentado. Aproximadamente, 8% do pescado defumado a quente, 13,6% do defumado a frio e 25,8% do pescado fermentado, apresenta contaminação associada a este patógeno. Praticamente este microrganismo se converteu no maior problema dos produtos pesqueiros defumados. A bactéria foi detectada em 21% das amostras de pescado defumado comercializado no mercado de Newfoundland (Canadá). Além disso, este microrganismo tem a capacidade de contaminar superfícies inertes, incluindo o aço. Uma vez que a carga celular se estabelece na superfície, invariavelmente se multiplica, competindo com outras espécies já estabelecidas. *L. monocytogenes* tem sido isolada de todos os ambientes onde se processam alimentos e é capaz de aderir aos mais diversos tipos de superfícies. Isto cria problemas para os processadores de alimentos já que o microrganismo pode apresentar uma grande resistência aos agentes químicos ou antimicrobianos empregados para a higienização e sanificação. Quando as condições são favoráveis, essas células podem se multiplicar e, quando esta colonização é acompanhada da produção de polissacarídeos extracelulares, se formam películas vivas nas superfícies, criando problemas associados a uma redução de eficiência na transferência de calor através dos equipamentos (CARVAJAL, 2000).

## 2.5.2 Efeito dos inibidores

A nisina pode inibir o crescimento da *Listeria monocytogenes* e tem provado que é um agente antimicrobiano efetivo quando incorporada aos alimentos. Aprovada como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) - reconhecida como inócua - pode ser ingerido numa quantidade equivalente a  $3,3 \times 10^7$  U kg<sup>-1</sup> de peso corporal sem que ocorra efeitos adversos ou tóxicos. Uma quantidade equivalente a 100 U mL<sup>-1</sup> de nisina em um tampão fosfato com pH 6,6 pode reduzir a carga de *L. monocytogenes* de  $10^6$  para  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> em 24 horas. Assim como a nisina, o lactato de sódio, em concentrações entre 0,25 e 4M, também se mostra capaz de reduzir a carga desta bactéria em até 2,7 ciclos logarítmicos (CARVAJAL, 2000).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Matéria-prima

Foi utilizada uma amostra com 60 kg, parte de um lote (200 kg), de sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*).

Caracterizada como Sardinha Inteira Congelada, a matéria - prima foi acondicionada em sacos de polietileno na quantidade de 20 kg (bloco) e conservada a - 25 °C em câmara de estocagem para produtos congelados.

O pescado foi mantido congelado, segundo condições adequadas de conservação, até o momento de ser conduzido a usina - piloto de processamento de pescado do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina - CCA/UFSC. Na amostragem, não foi levado em consideração o sexo da espécie, fatores fisiológicos e diferenças anatômicas. Assim sendo, tomou-se o cuidado, somente, na escolha de peixes adultos.

#### 3.1.2 Starter bacteriocinogênico

O *starter* utilizado foi a cepa *Lactobacillus sakei* 2a, isolada de lingüiça frescal no laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF/USP (DE MARTINIS e FRANCO, 1998, *in press*).

Alíquotas de 1 mL da cultura foram mantidas a - 80 °C em caldo para *Lactobacillus* seg. DE MAN, ROGOSA e SHARPE - caldo MRS (MERCK - Art. Núm. 10661) (Anexo 1), formulado com 5% de glicose. Antes da utilização, as culturas foram reativadas em caldo MRS, com incubação a 30 °C por 18 horas.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Fermentação dos filés de sardinha**

A matéria - prima, conservada sob congelamento, com temperatura interna de - 18 °C, foi descongelada parcialmente (4 °C), pesada, acondicionada em monoblocos de polipropileno e encaminhada à mesa de manipulação onde foi realizada a operação de escamagem e filetagem por processo manual. Os filés foram produzidos com pele. Posteriormente, os filés foram lavados com água potável corrente e, em seguida, drenados. A seguir, os filés foram pesados e divididos em porções de 300 g. O experimento foi conduzido conforme os parâmetros de fermentação, correspondente às seguintes concentrações: 2, 4 e 6% (NaCl), 2 e 4% (glicose). Os tratamentos foram desenvolvidos de forma independente, variando apenas um dos parâmetros operacionais (concentração de cloreto de sódio ou glicose). Os filés foram salgados através de uma salga seca (4 °C por 24 horas) e posteriormente fermentados (salga úmida) a temperatura ambiente ( $\approx 23$  °C) durante 21 dias. A Figura 5 mostra o diagrama de fluxo correspondente ao processamento dos filés de sardinha fermentados.

### **3.2.2 *Lactobacillus sakei* 2a**

#### **3.2.2.1 Caracterização morfológica**

A morfologia em meio sólido foi realizada através da descrição visual da colônia isolada (esgotamento em estrias) em ágar MRS a 30 °C após 24 horas e, observação microscópica (morfologia celular) baseada na forma, arranjo e Coloração Diferencial de Gram (Anexo 2, 3, 4, 5), (SNEATH, 1986; APHA, 1992).

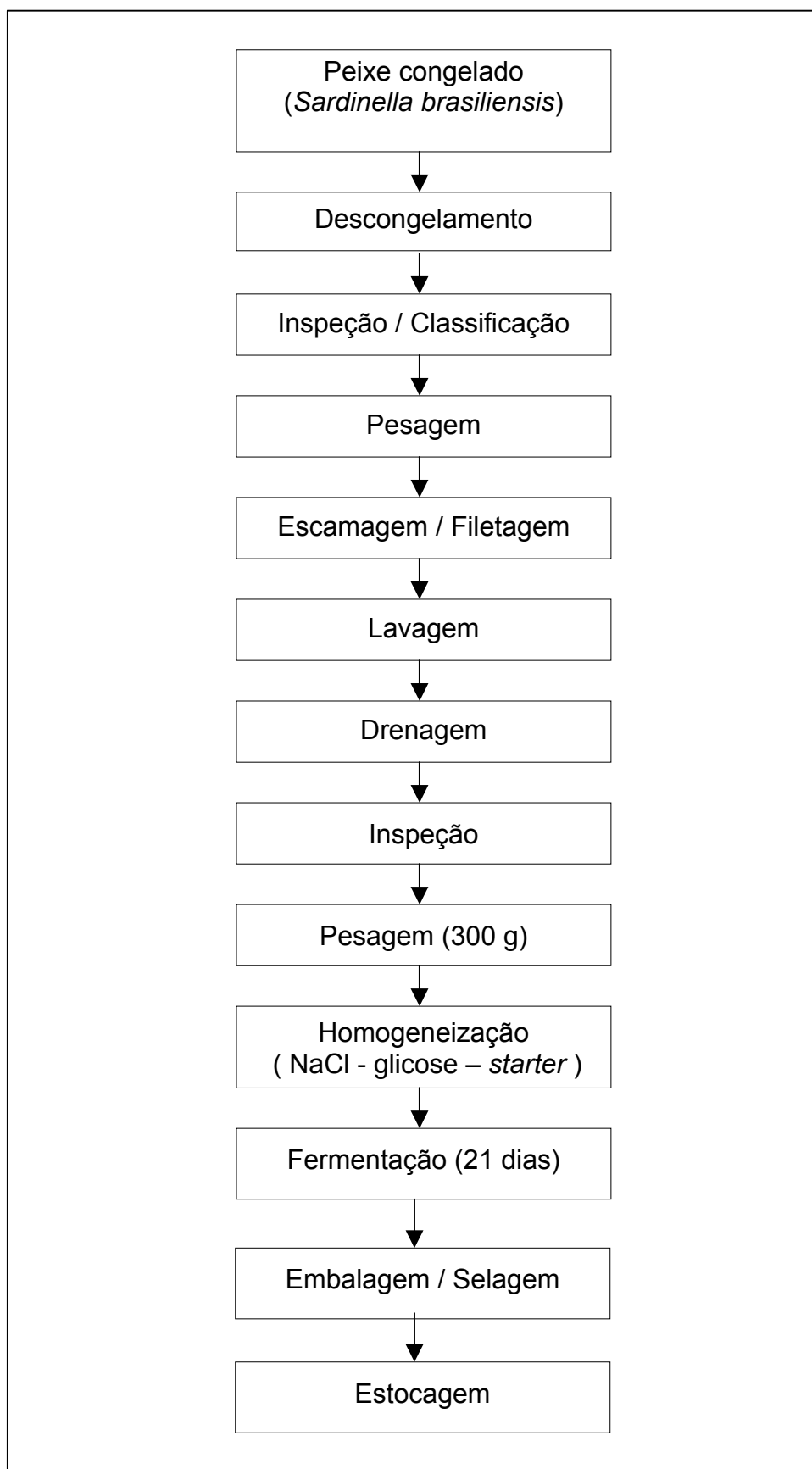


Figura 2: Diagrama do fluxo operacional da fermentação da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*).

### 3.2.2.2 Caracterização fisiológica

A caracterização fisiológica foi determinada através do crescimento em pH 3,9 a temperaturas diferenciadas (8, 15 e 45 °C) em caldo MRS (tempo máximo de incubação: 7 dias), halofilismo em distintas concentrações salinas (6, 5, 7 e 10% NaCl) em caldo MRS e hidrólise da gelatina, com leitura em até 7 dias (SNEATH, 1986; DE MARTINIS e FRANCO, 1997). Como testes complementares, foi determinado o requerimento de oxigênio e a motilidade em meio semi - sólido (SNEATH, 1986).

### 3.2.2.3 Caracterização bioquímica

A linhagem foi caracterizada bioquimicamente através dos seguintes ensaios: teste da catalase, produção de acetoina (teste de Voges - Proskauer) e prova do vermelho de metila em meio de Clark e Lubs (Anexo 6), produção de H<sub>2</sub>S através da atividade enzimática da cisteína dissulfidrilase em meio Sulfito Indol Motilidade - SIM Medium (MERCK - Art. Núm. 5470) (Anexo 7), produção de gás a partir da glicose, descarboxilação da lisina, produção de indol e fermentação de carboidratos (sacarose, glicose, arabinose, galactose, maltose, lactose, ramnose, trealose, sorbitol, rafinose e xilose) em caldo MRS formulado. Os testes foram incubados a uma temperatura ótima de crescimento de 30 °C e os resultados verificados em até 7 dias (SNEATH, 1986; APHA, 1992; SIQUEIRA, 1995). A produção de bacteriocinas foi detectada conforme a técnica da difusão em poços (*well - diffusion - assay*) (HARRIS et al., 1989; LEWUS e MONTVILLE, 1991; DE MARTINIS e FRANCO, 1997).

### 3.2.2.4 Ativação e preparação do inóculo

O inóculo foi obtido a partir da cepa ativada em caldo MRS (incubação a 30 °C durante 18 horas). Após a incubação, procedeu-se a ressuspensão de uma alíquota de 5 mL em 200 mL de caldo MRS com incubação a 30 °C por 12 horas.



Posteriormente, porções de 10 mL da cultura ativada, contendo uma carga celular de *L. sakei* 2a equivalente a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, foram transferidas para as cubas de fermentação, correspondente aos tratamentos preestabelecidos.

### **3.2.2.5 Espectrofotometria da biomassa**

A densidade ótica foi estimada por leitura espectrofotométrica a 600 nm. As alíquotas (1 mL) para as leituras de absorbância foram centrifugadas a  $9,77 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (células viáveis de *Lactobacillus sakei* 2a) resuspenso em 3 mL de solução de água peptonada 1% (Anexo 10), adicionada de 3 mL de solução de EDTA 1% e alcalinizada com NaOH 10 M (MAZO, 1999).

### **3.2.2.6 Avaliação do número de células viáveis no inóculo**

A enumeração das células viáveis de *Lactobacillus sakei* 2a foi realizada em ágar MRS através de alíquotas (1 mL) das correspondentes diluições, por plaqueamento em profundidade.

As sementeiras foram realizadas em duplicatas e, incubadas a 30 °C por 24 horas (MAZO, 1999).

### **3.2.2.7 Detecção de bacteriocinas pela técnica da difusão em poços**

A bacteriocina produzida pela cepa de *Lactobacillus sakei* 2a foi detectada pela aplicação da técnica conhecida como difusão em poços (*well – diffusion - assay*), preconizada por HARRIS et al. (1989) e LEWUS e MONTVILLE (1991), com modificações propostas por DE MARTINIS e FRANCO (1997). Poços de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram perfurados em placas com ágar BHI - Brain Heart Infusion (OXOID - CM 225) (Anexo 15) inoculado com a cultura indicadora (*Listeria monocytogenes* Scott A), previamente incubada em caldo BHI a 37 °C por 18 horas.

Nestes poços foram adicionados 40 µL do sobrenadante da cultura de *L. sakei* 2a, oriunda do caldo MRS (formulado com 0,5% glicose) incubado a 30 °C por 18 horas, centrifugado a 9,77 x g por 10 minutos, com regulagem de pH em 6,5 e esterilizado por filtração em membrana de éster de celulose (0,45µm, Millipore, Bedford, Ma, USA). Após incubação a 37 °C por 18 horas, o antagonismo foi detectado pela formação da zona de inibição caracterizada por um halo, representando a ausência de crescimento da cepa sensível, ao redor da cultura de *L. sakei* 2a, produtora de bacteriocina.

### **3.2.2.8 Produção de bacteriocinas relacionada com a curva de crescimento do *L. sakei* 2a**

A avaliação foi executada utilizando *L. sakei* 2a inoculado em 100 mL de caldo MRS e incubado a 30 °C por 24 horas. A cada hora, foi recolhida uma alíquota e determinada a absorbância a 600 nm e a produção de bacteriocinas pela técnica da difusão em poços, com a cepa indicadora *Listeria monocytogenes* Scott A.

### **3.2.3 *Listeria monocytogenes* Scott A**

A atividade inibitória foi realizada utilizando uma cepa indicadora de *Listeria monocytogenes* Scott A. Alíquotas de 1 mL do microrganismo indicador foram conservadas a - 80 °C em caldo tripticase de soja (Anexo 24) adicionado de 0,6% de extrato de levedura. A reativação da cepa foi realizada em caldo BHI a 37 °C por 18 horas (DE MARTINIS e FRANCO, 1997).

### **3.2.4 Análises microbiológicas dos filés de sardinha**

#### **3.2.4.1 Amostragem**

Foram retirados assepticamente 25 g de músculos (filés) e, realizadas diluições sucessivas em solução de água peptonada 0,1% (Anexo 9). Para a detecção de *Salmonella* sp., a amostragem foi de 25 g, adicionada diretamente ao caldo de pré - enriquecimento. Durante o desenvolvimento da fermentação, a cada 7 dias, foram realizadas análises correspondentes a enumeração total de bactérias aeróbias mesófilas e contagem total de bactérias ácido lácticas.

#### **3.2.4.2 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos**

A contagem foi realizada pelo método do plaqueamento em profundidade em Plate Count Agar - PCA (MERCK - Art. Núm. 5463) (Anexo 11). Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C por 48 horas (APHA, 1992).

#### **3.2.4.3 Contagem de bactérias lácticas**

A enumeração foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade em ágar MRS (MERCK - Art. Núm. 10.660) (Anexo 1). Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas a 30 °C por 24 horas (APHA, 1992).

#### **3.2.4.4 Enumeração de coliformes fecais**

Foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), indicada para a detecção de baixas concentrações de coliformes e por apresentar maior sensibilidade do que os métodos de plaqueamento. No teste presuntivo, foi avaliada a fermentação da lactose. Como meio de cultura seletivo, foi utilizado o Lauril Sulfate Broth - LSB (MERCK - Art. Núm. 10266) (Anexo 12). Este meio oferece como fonte de carbono apenas a lactose, a qual é fermentada com produção de ácido e gás, que é evidenciado no tubo de Durham. O meio contém ainda o reagente lauril sulfato, que inibe o crescimento da microbiota acompanhante. A incubação se

verificou a 37 °C por 48 horas. Para o teste confirmativo foi utilizado o meio seletivo EC Broth (MERCK - Art. Núm. 10765) (Anexo 13), com incubação a 44,5 °C por 24 horas (APHA, 1992).

#### **3.2.4.5 Contagem de *Staphylococcus aureus***

Como meio seletivo para a enumeração de estafilococos foi utilizado o Baird - Parker Agar (MERCK - Art. Núm. 5406) (Anexo 14). O meio combina o telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e o cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos e, a redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo, como características diferenciais. Adicionalmente, o meio contém 15% de piruvato de sódio como agente reparador de células injuriadas. A enumeração foi determinada por plaqueamento direto com espalhamento do inóculo com o auxílio da alça de Drigalsky, inversão e incubação das placas a 37 °C por 48 horas. Foram enumeradas todas as colônias de *Staphylococcus aureus* presuntivas (típicas e atípicas).

Posteriormente, 6 colônias características foram repicadas no caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion - BHI (OXOID - CM 225) (Anexo 15). O meio foi incubado a 37 °C por 24 horas. A confirmação das colônias típicas foi bioquimicamente comprovada através da produção de coagulase com plasma de coelho (incubação a 37 °C por 1 a 4 horas), DNase termorresistente (100 °C por 15 minutos) e presença da catalase pelo desdobramento do peróxido de hidrogênio. O cálculo dos resultados considerou como culturas de *S. aureus*, aquelas que apresentaram reações de coagulase, termonuclease e catalase, positivas (APHA, 1992).

#### **3.2.4.6 Contagem de *Enterococcus* spp**

Para a enumeração de *Enterococcus* spp, foram selecionadas três diluições e, posteriormente, inoculadas em placas com ágar KF *Streptococcus* (MERCK - Art. Núm.10707) (Anexo 16). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e as colônias típicas selecionadas para confirmação em caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion - BHI (OXOID - CM 225) (Anexo 15) através dos testes bioquímicos:

metabolismo na presença de bile e hidrólise da esculina, crescimento em NaCl 6,5%, multiplicação a 10 e 45 °C e teste de catalase (APHA, 1992).

### **3.2.4.7 Detecção de *Salmonella* sp.**

A técnica de análise consistiu do pré - enriquecimento de 25 g da amostra em 225 mL de Lactose Broth (MERCK - Art. Núm. 7661) (Anexo 17). O meio inoculado foi incubado a 37 °C por 24 horas.

A seguir, foi realizado o enriquecimento seletivo; alíquotas, correspondente a uma alçada, foram inoculadas em Selenite Cystine Broth - SC Broth (MERCK - Art. Núm. 7709) (Anexo 18) e em Tetrathionate Enrichment Broth - TTB (MERCK - Art. Núm. 5285) (Anexo 19). Os meios foram incubados a 42 °C em banho - maria por 24 horas.

À partir do enriquecimento seletivo foram feitas estrias com o auxílio de alça de Henly, no meio Hektoen Enteric Agar (MERCK - Art. Núm. 11681) (Anexo 20). Após incubação a 37 °C por 24 horas, colônias de coloração azul ou verde, com ou sem centro escuro, foram consideradas como *Salmonella* spp. Após o plaqueamento seletivo, foi feita uma identificação bioquímica das colônias em Triple Sugar Iron Agar - TSI Agar (MERCK - Art. Núm. 3915) (Anexo 21) e em Lysin Iron Agar - LIA (MERCK - Art. Núm. 11640) (Anexo 22) a 37 °C por 24 horas (APHA, 1992).

## **3.2.5 Análises físico-químicas**

### **3.2.5.1 Composição centesimal**

A determinação da composição centesimal da matéria - prima foi realizada segundo técnicas da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1995: umidade e cinzas por gravimetria (Técnicas Núm. 950.46 e 938.08); proteínas pelo método Kjeldahl (nitrogênio total x 6,25) (Técnica Núm. 940.25) e extrato etéreo (submersão) por extração com éter de petróleo (Técnica Núm. 991.36).

### **3.2.5.2 Nitrogênio protéico (NP) e nitrogênio solúvel total (NST)**

As soluções de fermentação tiveram seus conteúdos de nitrogênio solúvel total e nitrogênio protéico avaliados pelo método Kjeldahl (FAO, 1993).

### **3.2.5.3 pH**

Foram removidas amostras com 10 g das cubas de fermentação e homogeneizadas com água destilada (10 mL). O pH foi medido potenciométricamente (pH - meter SHOTT GERATE Mod. CG 818) (AOAC, 1995).

### **3.2.5.4 Acidez titulável total (ATT)**

Usando o mesmo homogeneizado preparado para a determinação do pH, a ATT foi determinada por titulação com NaOH 0,1N em presença de solução alcoólica de fenolftaleína 1%, com resultado expresso em ácido láctico (% p/p). O final da titulação foi verificado em pH 8,0 (Técnica Núm. 162.76) (AOAC, 1995).

### **3.2.5.5 Cloretos**

Para a determinação do teor de cloretos (como NaCl), foi utilizado o método volumétrico por titulação com  $\text{AgNO}_3$  0,1N (Técnica Núm. 937.09) (AOAC, 1995).

## **3.2.6 Análise sensorial**

### **3.2.6.1 Análise descritiva quantitativa (ADQ)**

A metodologia utilizada para a definição do perfil sensorial dos filés de sardinha fermentados, submetidos aos diferentes tratamentos, foi a análise

descritiva quantitativa – ADQ, de acordo com STONE e SIDEL (1993) e NBRs 14140 e 14141 (1998). Foi utilizada uma equipe com seis julgadores treinados do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

As análises organolépticas foram avaliadas através de quatro características (odor, cor, textura e sabor) de acordo com a escala estrutural mista de pontuação com valor variável entre 1 e 10. O maior valor na escala representa a melhor qualidade (GELMAN et al., 2001). Os julgadores que avaliaram as amostras foram selecionados entre aqueles com conhecimento e habilidade para descrever e discriminar os atributos sensoriais do produto. Os termos descritivos para cada atributo sensorial de interesse foram desenvolvidos por consenso em reuniões de discussão e, as escalas estabelecidas em sessões de treinamento. Antes de servir, as amostras foram escorridas em peneiras durante 10 minutos e o líquido excedente foi adicionalmente retirado com o uso de toalhas de papel descartáveis. Foi servido biscoito *cream-cracker* para limpar o palato e água mineral para lavar a boca entre uma amostra e outra.

A descrição dos atributos sensoriais foi definida da seguinte maneira:

I) qualidade elevada (9 – 10), odor característico de carne de peixe fermentada, sabor ácido, coloração rosada, textura elástica e succulenta,

II) boa qualidade (7 – 8), odor característico de carne de peixe fermentada, sabor levemente ácido, coloração levemente rosada, textura elástica,

III) qualidade satisfatória (5 – 6), odor e sabor neutro, coloração levemente castanha, textura levemente elástica,

IV) baixa qualidade (3 – 4), odor e sabor a ranço (desagradável), coloração castanha, textura rígida,

V) qualidade inaceitável (1 – 2), odor e sabor repulsivo (ranço acentuado), coloração castanho-escuro, textura esboroável.

O Anexo 36 representa o modelo de ficha utilizado para o teste analítico descritivo quantitativo.

### **3.2.7 Análise estatística**

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos completamente casualizados considerando as amostras como tratamentos e os julgadores como blocos. Os dados foram submetidos a análise de variância. As avaliações foram feitas individualmente utilizando-se o formulário de teste elaborado pela equipe treinada de julgadores. Os valores de cada atributo foram obtidos pela média da distância da extremidade esquerda da escala até a marca vertical assinalada pelo julgador. As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se o teste LSD – *Least Significant Difference* para comparação entre elas (médias), duas a duas, em nível de  $\alpha = 0,05$ , com o uso do programa estatístico *Statistica* (STATSOFT INC/Statistica for windows).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Matéria-prima

#### 4.1.2 Composição química

Na Tabela 3 são apresentados os valores da composição química (umidade, cinzas, lipídios e proteínas) dos filés de sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). As concentrações estão expressas em percentuais sobre o músculo com pele, após descongelamento controlado a 4 °C.

Tabela 3: Composição físico-química de amostras de filés da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)

	Filés de sardinha (com pele)				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$\bar{X}$	$\pm Dp$
Umidade (%)	72,9	73,5	73,7	73,4	( $\pm 0,39$ )
Lipídios (%)	2,0	3,0	4,2	3,1	( $\pm 0,89$ )
Proteínas (%)	19,7	19,6	17,7	19,0	( $\pm 0,88$ )
Cinzas (%)	2,0	1,9	1,9	1,9	( $\pm 0,01$ )

$\bar{X} \pm Dp$ : média  $\pm$  desvio padrão.

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Repetições.

A comparação dos resultados obtidos com aqueles já publicados por outros autores ficou em parte prejudicada pela não citação, em vários casos, do nome científico e sim do nome vulgar da espécie estudada.

Com relação à percentagem de umidade, a variação se situou na faixa correspondente aos peixes marinhos, de 66 a 84% (AQUARONE et al., 1983). Alguns autores mencionam teores entre 70 - 80% e 64 - 90% (LINDEN e LORIENT, 1994; BADOLATO et al., 1994). A estação do ano afeta o conteúdo de umidade do

pescado, o que, já foi constatado por outros autores (LINDEN e LORIENT, 1994), relacionando a época de captura com a composição centesimal. Na determinação da composição química de cinco espécies marinhas, incluindo a sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), BADOLATO et al. (1994) encontraram valores entre 77,2 e 83,8%, para capturas entre o inverno de 1992 a outubro de 1993 (Anexo 25).

O resultado referente ao teor de lipídios (Tabela 3), é coerente com a literatura, (BERTULLO, 1975; AQUARONE, 1983; OSCAR et al., 1989; PIGOTT e TUCKER, 1990). Com relação a lipídios, pesquisas (BERTULLO, 1975) mostram que; peixes de águas tropicais costumam apresentar teores bem inferiores àqueles do Hemisfério Norte, o que realmente foi constatado neste trabalho.

SHIMIZU et al., citados por LANIER e LEE (1992), estudando a variação do conteúdo de lipídios em função das variações sazonais para a sardinha capturada na região do oceano Pacífico, encontraram valores sempre superiores a 17%, para esta espécie. A importância da variação sazonal é complexa; as sardinhas (*Sardinella* sp.) podem apresentar 2% de lipídios na primavera e até 8,6% no outono e, as variações sazonais são atribuídas a espécies de plânctons, predominantes em certas épocas do ano. Há também a influência da idade do pescado: as sardinhas imaturas podem conter 3% lipídios e, aos 3 anos, na fase de reprodução, passam a ter entre 5 e 15%, conforme a estação do ano. É preciso considerar, ainda, que o depósito de lipídios se encontra no fígado e vísceras e, em função do processamento, os teores podem sofrer variações (AQUARONE, 1983).

Examinando os valores obtidos na Tabela 3 e, considerando o valor nutricional, pode-se dizer que; os resultados de lipídios e proteínas permitiram classificar esta matéria - prima na categoria de alimento com baixo teor de gordura (< 5%) e alto conteúdo protéico (15 a 20%).

A *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* - ICMSF (1985), baseada no teor de lipídios, classifica esta matéria - prima como semi - gordurosa. NUNES et al. (1992), estudando os efeitos da época de captura e estocagem da *Sardina pilchardus* sobre o teor protéico e lipídico, obtiveram resultados semelhantes aos mostrados na Tabela 3. Os valores ficaram entre 19,3 e 17,4% para o teor de proteínas e 8,2 e 3,4% para os lipídios. O sexo pode determinar variação na composição protéica devido ao estágio fisiológico; pois as espécies são mais ricas em proteínas no início do ciclo sexual que os machos, enquanto que, o inverso pode ser observado após a desova (AQUARONE, 1983).

Face aos teores de cinzas, onde estão contidos os minerais, a sardinha apresenta um expressivo conteúdo destes elementos se comparado com outras espécies, como mostra o trabalho de BADOLATO et al. (1994), quando avalia a composição centesimal de peixes marinhos capturados em diferentes estações do ano. O pescado é rico em minerais, possui o fósforo complexado com lipídios e, enxofre, ferro e cobre complexados com proteínas. Conforme PIGOTT e TUCKER (1990), nunca foi detectada deficiência de minerais em peixes marinhos, os quais mencionam ainda, que as concentrações destes componentes nos pescados (Anexo 26), são muito mais elevadas do que nas carnes.

#### **4.1.3 Tamanho e rendimento**

A Tabela 4 apresenta o rendimento dos filés (após lavagem e drenagem) e o tamanho médio da espécie processada. De acordo com BORGSTROM (1965), o rendimento dos filés varia não somente com o tamanho, sexo, idade e época de captura, mas, de fatores físico - químicos relacionados com o *pré - rigor*, *rigor* ou *post - rigor* e, físicos, relacionados com o tipo de manipulação. Pelos resultados obtidos, existe uma equivalência entre os rendimentos obtidos e, os referenciados no trabalho de BERTULLO (1975).

Apesar da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) poder alcançar cerca de 24 cm de comprimento (GODOY, 1987) e, com isso, proporcionar rendimentos maiores; os valores encontrados na Tabela 4 (47,2, 50 e 55,6%) são considerados normais em função do tipo de manipulação realizada.

#### **4.1.4 Microbiota**

Na Tabela 5 são mostrados os resultados da avaliação microbiológica da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), relacionados com microrganismos indicadores de higiene ou processamento, de contaminação fecal e patogênicos entéricos de veiculação hídrica. Devido ao tipo de pesca, o tempo decorrido entre a captura da sardinha e a sua descarga nos portos é menor que para as outras variedades de peixes. Assim sendo, é de se esperar que se obtenham cargas

bacterianas reduzidas que, segundo BRANDÃO e FURLANETTO (1984), devem ser da ordem de  $10^3 \text{ g}^{-1}$ .

Tabela 4: Tamanho da espécie e rendimento de amostras de filés (com pele) da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)

Amostra	Tamanho (cm)	Peso bruto	Peso dos filés* (g)	Rendimento (%)
R <sub>1</sub>	15-16-17-16 15-15-17-16-18	530	250	47,2
R <sub>2</sub>	16-18 -15 -15 -15-16 -18 -15	500	250	50
R <sub>3</sub>	15 - 15 - 16 - 17 - 18 -19 -16	450	250	55,6
	$\bar{X} = 17$	$\Sigma = 1480$	$\Sigma = 750$	$\bar{X} = 50,7$

X: média.

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Repetições.

\* Peso obtido após lavagem e drenagem.

Em relação a sardinha congelada, com base em vários trabalhos, as enumerações de bactérias mesófilas viáveis variaram entre  $10^3$  e  $10^4 \text{ g}^{-1}$  e, as médias das contagens,  $10^4 \text{ g}^{-1}$  em alguns casos e  $10^5 \text{ g}^{-1}$  em outros (BARROS e ROBBS, citados por BRANDÃO e FURLANETTO, 1984). Através dos dados experimentais (Tabela 5), a contagem padrão em placas (microbiota aeróbia viável), utilizada como indicador de higiene e/ou processamento, mostrou variações entre  $3,5 \times 10^2$  e  $1,1 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$ .

De acordo com o ICMSF (1990), os resultados indicam um pescado com a carga bacteriana normal para as espécies marinhas tropicais. Com relação a contaminação fecal, a Tabela 5 mostra resultados relacionados com o grupo dos coliformes totais e fecais, evidenciando práticas de higiene e sanificação adequadas conforme padrões requeridos para o processamento de alimentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - MA/ SVS, 1997). Utilizado como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanificação das superfícies operacionais, observa-se, pela enumeração de *Staphylococcus aureus* um número de células reduzidas (Tabela 5), sem restrições, de conformidade com a Portaria 451 - MS/SVS (1997), que estabelece critérios e padrões microbiológicos para alimentos.

Apesar da ausência de um limite máximo e de tolerância, relacionando a presença de *Enterococcus* em pescado, este índice fornece um indicativo de qualidade higiênico - sanitária associada à microbiota acompanhante da matéria - prima. Esta microbiota é típica de animais de sangue quente ou frio (SILVA et al., 1997). Os resultados encontrados (Tabela 5) são desprezíveis, indicando uma matéria-prima de qualidade aceitável.

Todos os lotes (A, B, C), apresentaram resultados negativos com relação a detecção de *Salmonella* sp.

Tabela 5: Avaliação microbiológica de amostras de filés de sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)

Microbiota	Sardinha - verdadeira <i>in natura</i>		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Microrganismos aeróbios mesófilos (UFC g <sup>-1</sup> )	3,5 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	4,4 x 10 <sup>3</sup>
Coliformes totais (NMP g <sup>-1</sup> )	< 3	< 3	< 3
Coliformes fecais (NMP g <sup>-1</sup> )	< 3	< 3	< 3
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC g <sup>-1</sup> )	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>
<i>Enterococcus</i> (UFC g <sup>-1</sup> )	3,5 x 10 <sup>2</sup>	3,5 x 10 <sup>2</sup>	3,5 x 10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i> sp.	ausência em 25 g	ausência em 25 g	ausência em 25 g

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Repetições.

#### 4.1.5 pH

Para o peixe, os fenômenos de aparecimento e resolução da rigidez cadavérica são rápidos, porém, o enrijecimento *post mortem* e a queda do pH são graduais. O pH se reduz, geralmente de 7 para 6 no pescado magro e, até 5,6 no músculo escuro do pescado gorduroso. É desejável que a conservação pelo frio se verifique o mais rápido possível e em pH reduzido, possibilitando o aumento da vida

- de - prateleira (FAO, 1995; LINDEN e LORIENT, 1994). De acordo com o observado na Tabela 6, o pH variou entre 5,9 e 6,1. Os resultados indicam um pescado em condições adequadas de conservação, com resultados inferiores àqueles apresentados no peixe deteriorado; pH superior a 6,8 (GIBSON, 1991; FRAZIER e WESTHOFF, 1993; LINDEN e LORIENT, 1994; FAO, 1995).

Tabela 6:- Variação do pH de amostras de filés de sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)

	Sardinha-verdadeira <i>in natura</i>			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$\bar{X} \pm Dp$
pH	6,1	5,9	6	6 ± 0,08

$\bar{X} \pm Dp$ : média  $\pm$  desvio padrão.

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Repetições.

## 4.2 *Lactobacillus sakei* 2a

### 4.2.1 Caracterização morfológica

Os resultados morfotinturiais decorrentes da observação microscópica dos isolados foram obtidos utilizando a metodologia por esgotamento em estrias em meio semi - sólido (Agar MRS), com incubação a temperatura de 30 °C por 24 horas. A linhagem apresentou-se como cocobacilos Gram - positivos regulares, isolados e em pares, com ausência de esporos. A colônia isolada mostrou uma coloração creme, com forma circular, superfície lisa, presença de brilho, com margem regular inteira, elevação convexa, consistência cremosa e tamanho 0,5 mm.

### 4.2.2 Caracterização fisiológica

A caracterização do cultivo após incubação a 30 °C e crescimento após 48 horas é mostrada na Tabela 7. Nos teste complementares, a linhagem apresentou-se como aerotolerante e não mostrou motilidade em meio semi – sólido sob incubação a 30 °C. *L. sakei* 2a é uma espécie homofermentativa, cresce a 8 e 15 °C, mas não se desenvolve a 45 °C. Conforme BROCK (1974), sua característica indica uma espécie pertencente ao subgênero *Streptobacterium*.

Tabela 7 - Caracterização fisiológica do *Lactobacillus sakei* 2a

pH	Halofilismo (% NaCl)			Crescimento (°C)			Hidrólise da gelatina
	3,9	6,5	7,0	10	8	15	
+	+	+	w	+	+	-	-

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo; (w) resultado positivo fraco.

Conforme SNEATH (1986), o gênero *Lactobacillus* raramente apresenta motilidade e, quando acontece, sempre é realizada através de flagelos peritríquios. Podem crescer em superfícies de meios semi - sólidos, em anaerobiose ou sobre pressão de oxigênio reduzida a 5 -10% CO<sub>2</sub>. São acidófilo, com crescimento em pH 5 ou menos e em temperaturas entre 2 e 53 °C. São incapazes de hidrolizar a gelatina.

GONZÁLEZ - FERNANDEZ et al. (1997), estudando a influência de cultivos (*starter*) relacionados com as propriedades sensoriais da lingüiça tipo frescal, complementaram suas pesquisas caracterizando 2 cepas de *Lactobacillus sakei* e uma de *Pediococcus* sp. As linhagens isoladas de *L. sakei* apresentaram crescimento em pH 3,9 e em concentrações de 7 e 10% NaCl.

#### 4.2.3 Caracterização bioquímica

A linhagem foi caracterizada através dos ensaios mostrados na Tabela 8.

Com relação a fermentação de carboidratos, GONZÁLEZ - FERNANDEZ et al. (1997) realizaram ensaios semelhantes utilizando, além dos açúcares mostrados na Tabela 8, a celobiose, ribose e a melibiose e observaram que testes com duas cepas de *L. sakei* não apresentaram atividade fermentativa sobre arabinose,

celobiose, maltose, ramnose e rafinose. Deve-se considerar que, estas linhagens não produziram catalase, acetoína, gás de glicose, H<sub>2</sub>S e bacteriocinas.

Tabela 8: Caracterização bioquímica do *Lactobacillus sakei* 2a

<b>Produção</b>	<b>Reação ou crescimento</b>
Catalase	–
Acetoína	+
Gás de glicose	–
H <sub>2</sub> S	–
Indol	–
Descarboxilação da lisina	+
Teste vermelho de metila	+
Bacteriocinas	+
<b>Fermentação</b>	
Lactose	–
Sacarose	+
Glicose	+
Ramnose	–
Xilose	–
Arabinose	+
Rafinose	–
Galactose	+
Maltose	–
Trealose	–
Sorbitol	–

A produção de bacteriocinas, através da técnica por difusão em poços, foi evidenciada pela formação de halos de clareamento em torno do inóculo do microrganismo produtor (*Lactobacillus sakei* 2a), com conseqüente inibição do



microrganismo indicador (*Listeria monocytogenes* Scott A), ficando constatado a sensibilidade da cepa testada através desta metodologia (antagonismo simultâneo).

SOBRINO et al. (1991), estudaram a atividade antibacteriana de *L. sake*, isolado de embutidos de carne, fermentados e dessecados. O microrganismo mostrou uma grande atividade inibidora, exibindo um efeito antagônico contra outros lactobacilos e microrganismos patogênicos de origem alimentar, como *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*. Estes pesquisadores confirmaram a falta de atividade contra bactérias Gram - negativas. A sensibilidade de *L. monocytogenes* não é surpresa, pois vários trabalhos (WILKINSON e JONES, 1977; SEELIGER e JONES, 1986; RUHLAND e FIEDLER, 1987, citados por SOBRINO et al., 1991) obtiveram a mesma comprovação.

φSTERGAARD et al. (1998), caracterizaram a atividade antagônica de bactérias lácticas sobre a *Listeria monocytogenes*. Estes microrganismos lácticos foram isolados do *thai*, um produto de fermentado de peixe produzido na Tailândia. Dos 4.150 microrganismos isolados em placas com ágar MRS, utilizando a técnica da dupla camada (*agar - overlay*), 1,4% foram identificadas com reação positiva. Quando a técnica da difusão em poços foi utilizada, de 44 microrganismos isolados, 43 apresentaram inibição contra *Listeria monocytogenes*. Todos os 44 microrganismos inibiram *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus* e, 37 foram inibidoras de bactérias mesofílicas (*Aeromonas* sp.) deterioradoras de pescado. O tratamento com catalase mostrou somente um efeito secundário sobre a atividade antagônica de algumas cepas, indicando também que, a produção de peróxido de hidrogênio não foi a maior causa da atividade antibacteriana. Se considerarmos a revisão desenvolvida por HUGAS (1998), sobre bactérias lácticas bacteriocinogênicas utilizadas para a biopreservação de embutidos cárnicos fatiados e acondicionados a vácuo, verificamos que a cepa *L. sakei* Lb674, produtora da sakacina P, apresenta elevada potencialidade para a inibição de *Listeria monocytogenes* em função da forma de aplicação. Neste mesmo trabalho, a bacteriocina isolada e adicionada no embutido não inibiu este patógeno.

Independente das pesquisas com *L. monocytogenes* (MING et al., 1997; DE MARTINIS e FRANCO, 1997; AYMERICH et al., 1998; φSTERGAARD et al., 1998; HAMMES e HERTEL, 1998; RINGφ e GATESOUBE, 1998; REID, 1999), o que podemos verificar é que a biopreservação em determinados sistemas alimentares

dependerão da formulação empregada, tecnologia utilizada e viabilidade da cultura para a produção da bacteriocinas, como também da adaptação das culturas aos meios (alimentares) específicos. Vários estudos (HUGAS e MONFORT, 1997; HAMMES e HERTEL, 1998), relacionados com culturas bacteriocinogênicas sobre patógenos alimentares nas condições de processamento de salames mostram os efeitos sobre *Listeria monocytogenes*. Também mostram que o efeito não é reprodutível quando se produz diferentes tipos de salames. Estes pesquisadores realizaram vários experimentos em que *Listeria monocytogenes* era inibida por meio de cinco cepas bacteriocinogênicas (quatro de *Lactobacillus sakei* e uma de *L. curvatus*). Durante a fermentação, a quantidade deste microrganismo (*Listeria monocytogenes*) foi reduzida em até 4 ciclos log. Duas cepas (*L. curvatus* LTH1174 e *L. sakei* CTC494) reduziram a quantidade de *Listeria monocytogenes* em até 2 ciclos abaixo do valor determinado no controle. A eficiência da sakacina P produzida pelo *L. sakei* depende do pH, concentração de NaCl, nitrito e nitrato de sódio. A atividade da bacteriocina aumentou sinergisticamente em pH reduzido e elevada concentração de cloreto de sódio; o efeito do nitrito foi desprezível.

#### **4.2.4 Relação entre o crescimento do *L. sakei* 2a e a produção de bacteriocinas**

A Figura 3 caracteriza o crescimento celular do *L. sakei* 2a em caldo MRS, com incubação a 30 °C por 24 horas, onde podemos observar que a carga microbiana aumentou até atingir o máximo valor em aproximadamente 19 horas.

A produção de bacteriocina iniciou somente após 4 horas de incubação (Figura 4), quando a massa celular atingiu 0,100 de absorbância a 600 nm, equivalente a  $9 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em função do diâmetro do halo de inibição formado, utilizando *Listeria monocytogenes* Scott A como microrganismo sensível, a produção de bacteriocina obteve seu valor máximo após 7 horas de incubação. A cultura nesse momento apresentou 1,625 de absorbância a 600 nm, equivalente a  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Após este tempo, não houve mais produção de bacteriocinas.

De acordo com HOOVER e HARLANDER (1993), a incubação por 24 horas é o tempo mínimo para se medir o halo formado pela zona de inibição, mas a sua

localização é fixada com poucas horas de incubação, para posteriormente haver o crescimento do microrganismo indicador e a visualização.

Comparando metodologias entre o tempo de incubação de antibióticos com bacteriocinas, deve-se considerar que, as bacteriocinas geralmente têm um grande peso molecular e sua relação de difusão pode ser mais lenta do que os tipos mais comuns de antibióticos. A literatura mostra resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, relacionados com a produção de bacteriocinas e a atividade de inibição contra bactérias Gram - positivas.

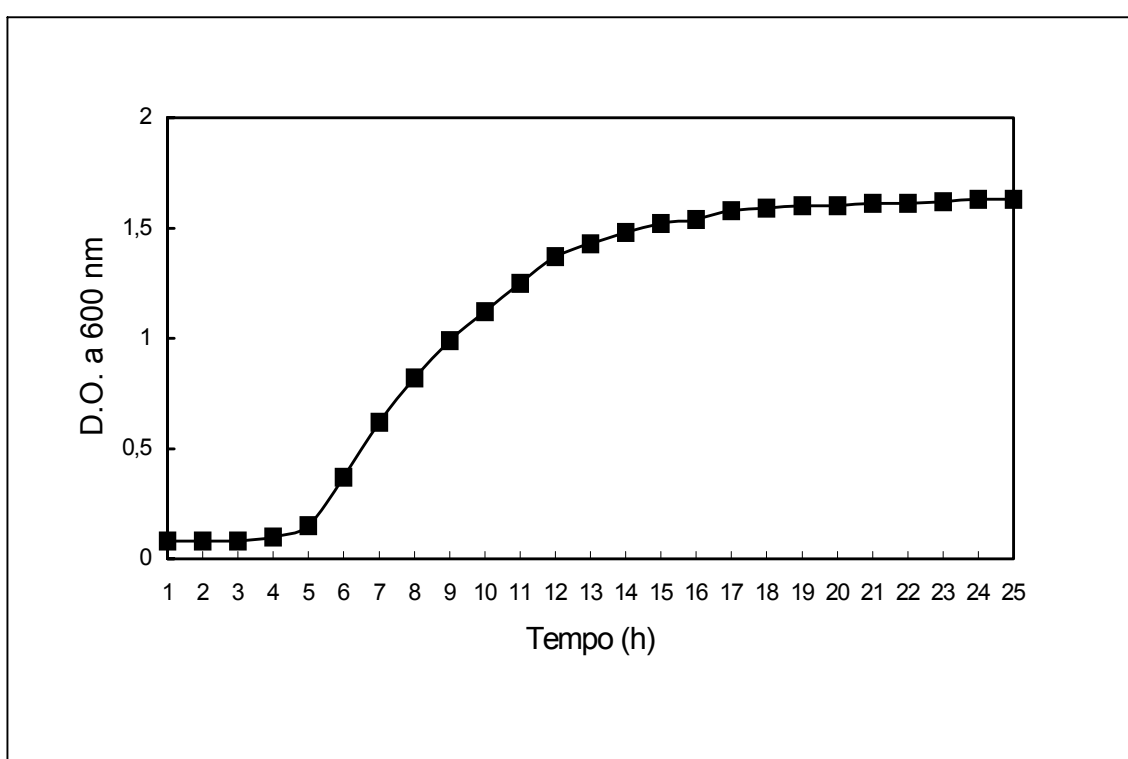


Figura 3: Crescimento do *Lactobacillus sakei* 2a em MRS, incubado a 30°C por 24 horas.

PARENTE et al. (1996) testaram a atividade da leucocina F10 (em unidades arbitrárias, UA mL<sup>-1</sup>), produzida por *Leuconostoc carnosum*, usando o *agar well diffusion assay* (AWDA), em presença da *Listeria innocua* BL86/26 como indicadora. A produção de bacteriocinas (LF10, UA mL<sup>-1</sup>) foi testada durante o crescimento de *L. carnosum* em caldo YGC (*yeast glucose citrate broth*) a 4, 25 e 30 °C e pH 5 - 5,5 - 6 - 6,5 e 7. A produção de LF10 a 4 °C foi extremamente baixa mas, após 5 dias,

foram obtidas  $570 \text{ UA mL}^{-1}$ . Considerando as temperaturas de incubação (25 e  $30^\circ\text{C}$ ), o aumento e a produção da LF10, em fermentações sem controle de pH, apresentaram melhores resultados a  $25^\circ\text{C}$  ( nas primeiras 9 horas, a biomassa e a atividade da LF10 foram:  $0,28 - 0,47 \text{ g L}^{-1}$  e  $231 - 346 \text{ UA mL}^{-1}$  a  $30$  e  $25^\circ\text{C}$ , respectivamente). Entretanto, a  $25^\circ\text{C}$ , a atividade da LF10 decresceu rapidamente até o final do crescimento bacteriano. Em pH 5,5 - 6 e 6,5, a produção de bacteriocina foi maior, se comparada com a fermentação sem controle de pH.

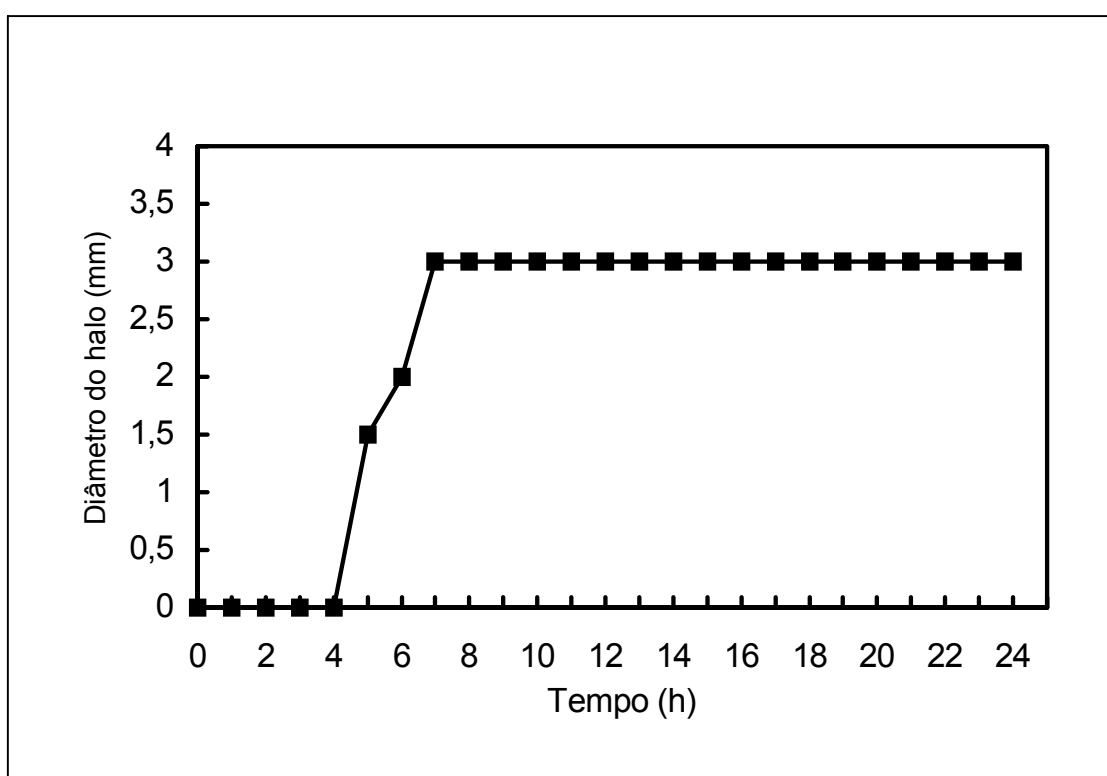


Figura 4: Produção de bacteriocinas por *Lactobacillus sakei* 2a em MRS, incubado a  $30^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Trabalhos similares, desenvolvidos por SCHILLINGER e LÜCKE (1989) mostram a atividade antibacteriana de *L. sakei* isolado de carne, onde foram avaliadas 19 cepas de *Lactobacillus sakei*, 3 cepas de *L. curvatus* e 1 cepa de *L. plantarum*, quanto ao potencial bacteriocinogênico para serem utilizadas como *starter* em produtos cárnicos. Com relação a *L. sakei*, 6 cepas apresentaram antagonismo contra *L. monocytogenes* em caldo MRS. Os sobrenadantes foram examinados quanto à produção de bacteriocinas e sua atividade inibidora em caldo

MRS formulado na forma convencional e com baixa concentração de glicose (0,2%). Foram utilizadas temperaturas de incubação de 7, 15 e 25 °C. Nenhuma atividade foi detectada durante as primeiras 8 horas de incubação. Entretanto, uma significativa atividade foi detectada após 23 horas a 25 °C e após 47 horas a 15°C, quando as bactérias estavam na fase intermediária ou final de crescimento (Log). A menor atividade (sobrenadante) foi observada após 47 horas a 25 °C.

MORTVEDT - ABILDGAARD et al. (1995) estudando a lactocina S produzida por *L. sakei* L45, detectaram que a maior formação desta bacteriocina ocorreu no início da fase estacionária do lactobacilo, com incubação a 30 °C em ágar MRS e, correspondeu a 3.000 UA mL<sup>-1</sup>.

COVENTRY et al. (1997) compararam a atividade antagônica de bactérias lácticas originárias de 40 espécies de pescado. Realizaram estudos de detecção de bacteriocinas e as compararam com nisina e pediocina, com avaliação através de unidades arbitrarias (UA), utilizando a diluição crítica para 2 meios de cultura: ágar e caldo MRS formulados. As culturas indicadoras mostraram diferentes sensibilidades às bacteriocinas. O estudo quantitativo deste efeito se baseou na comparação da atividade antagônica de diversas bacteriocinas, inoculadas em caldo e ágar, contra as culturas indicadoras (*Lactococcus curvatus*, *L. monocytogenes* e *L. seeligeri*). *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* foram mais sensíveis à ação das bacteriocinas em ágar do que em caldo. Entretanto, todas as bacteriocinas mostraram uma maior atividade contra *L. curvatus* inoculada em caldo MRS.

Recentemente (MORENO et al., 1999), efetuaram pesquisas relacionadas com a caracterização de várias cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e detecção de bacteriocinas pela técnica da difusão em poços e mostraram que 8,4% das culturas produziram substâncias inibidoras não associadas com ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio. A frequência de produção de bacteriocinas variou de 2% em *L. lactis* subsp. *cremoris* a 12% em *L. lactis* subsp. *lactis*. Nenhuma das linhagens de *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* produziram substâncias inibidoras.

### **4.3 Fermentação do pescado**

#### **4.3.1 Definição do experimento**

As cubas utilizadas no processamento e a evolução da fermentação são mostradas nas Figuras 5, 6, 7, 8 e 9. Este estudo se referiu aos parâmetros limitantes para a fermentação láctica; o processo envolvendo o peixe na forma de filé com pele, com composição da formulação definida é semelhante a determinados produtos como o *pla - ra* na Tailândia e o *burong - isda* nas Filipinas. Foram avaliadas as dificuldades associadas com a formulação em função da espécie de peixe (*Sardinella brasiliensis*). A adição de glicose foi necessária para promover uma adequada fermentação, pois o peixe apresenta um reduzido teor de carboidrato disponível.



Figura 5: Fermentação da sardinha - verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) utilizando *Lactobacillus sakei* 2a, NaCl e glicose como carboidrato fermentescível.

Os carboidratos se encontram fundamentalmente no músculo e fígado, representados por pequenas quantidades de polissacarídios glicogênicos. Os valores em glicogênio nos tecidos musculares variam entre 0,05 e 0,85% (FAO, 1995), o que o torna sem efeito nos processos fermentativos.

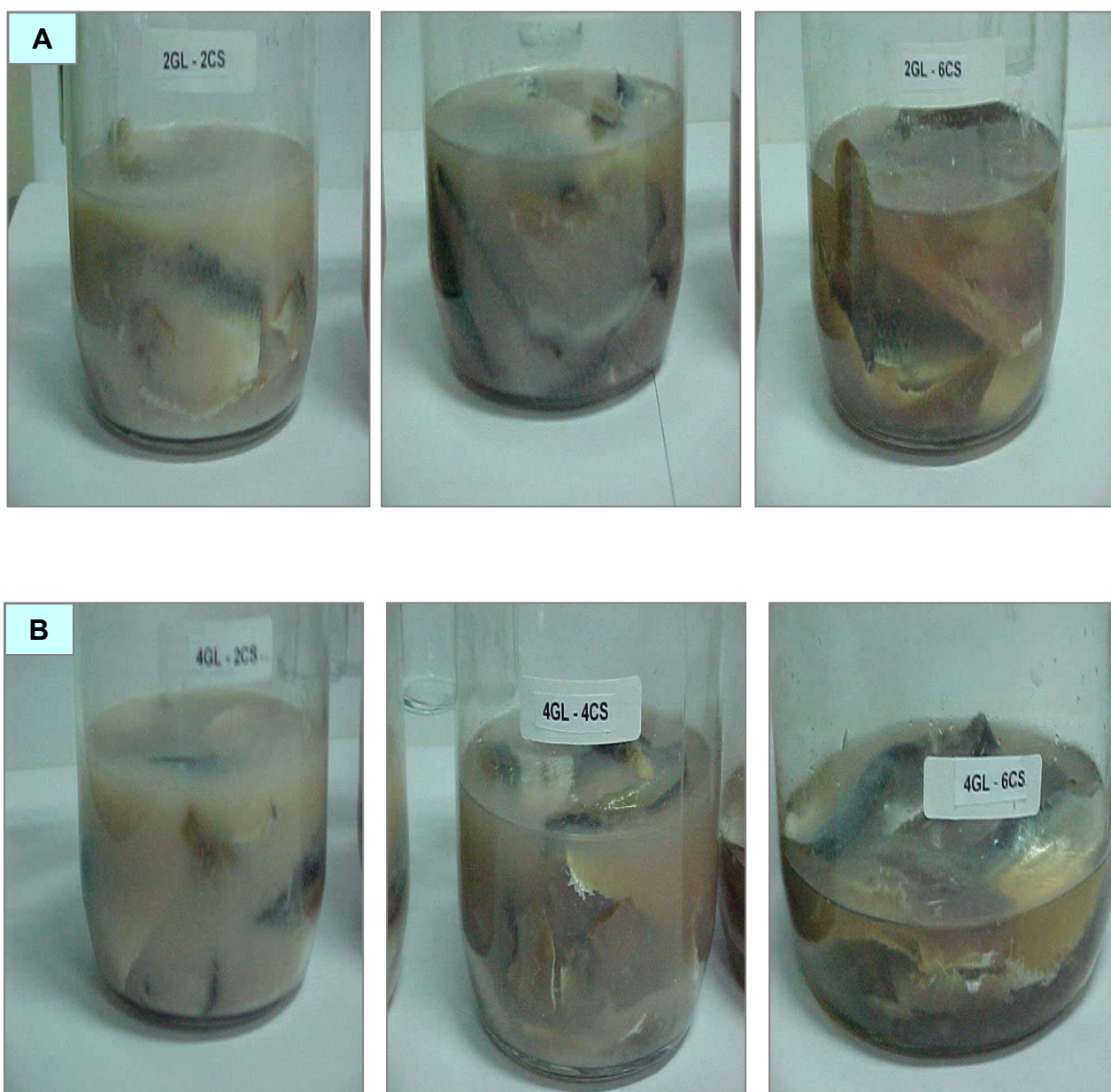


Figura 6: Evolução da fermentação dos filés de sardinha-verdadeira com 2 dias de processamento.

A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.

B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl.

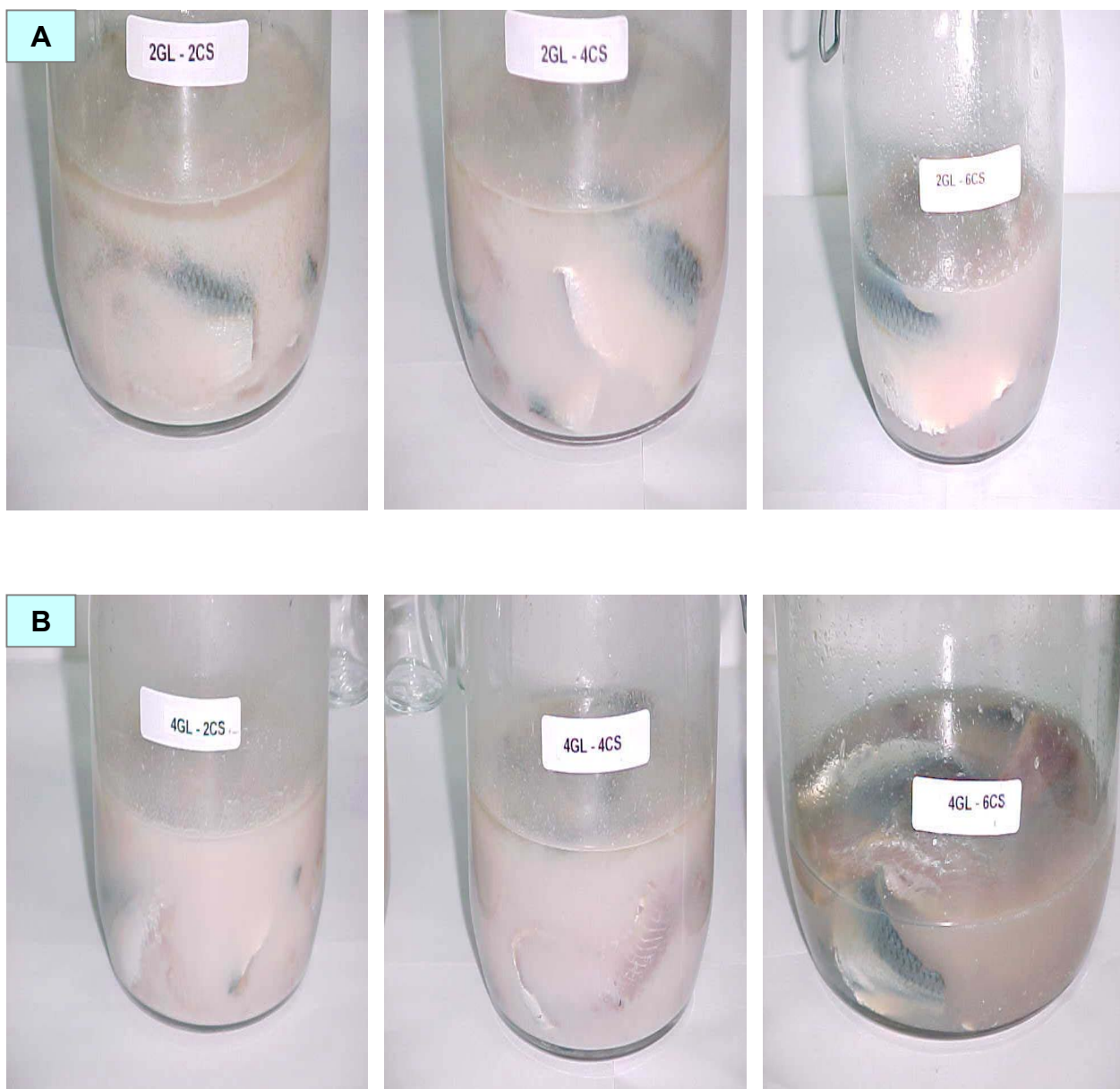


Figura 7: Evolução da fermentação dos filés de sardinha-verdadeira com 7 dias de processamento.

A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.

B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl.



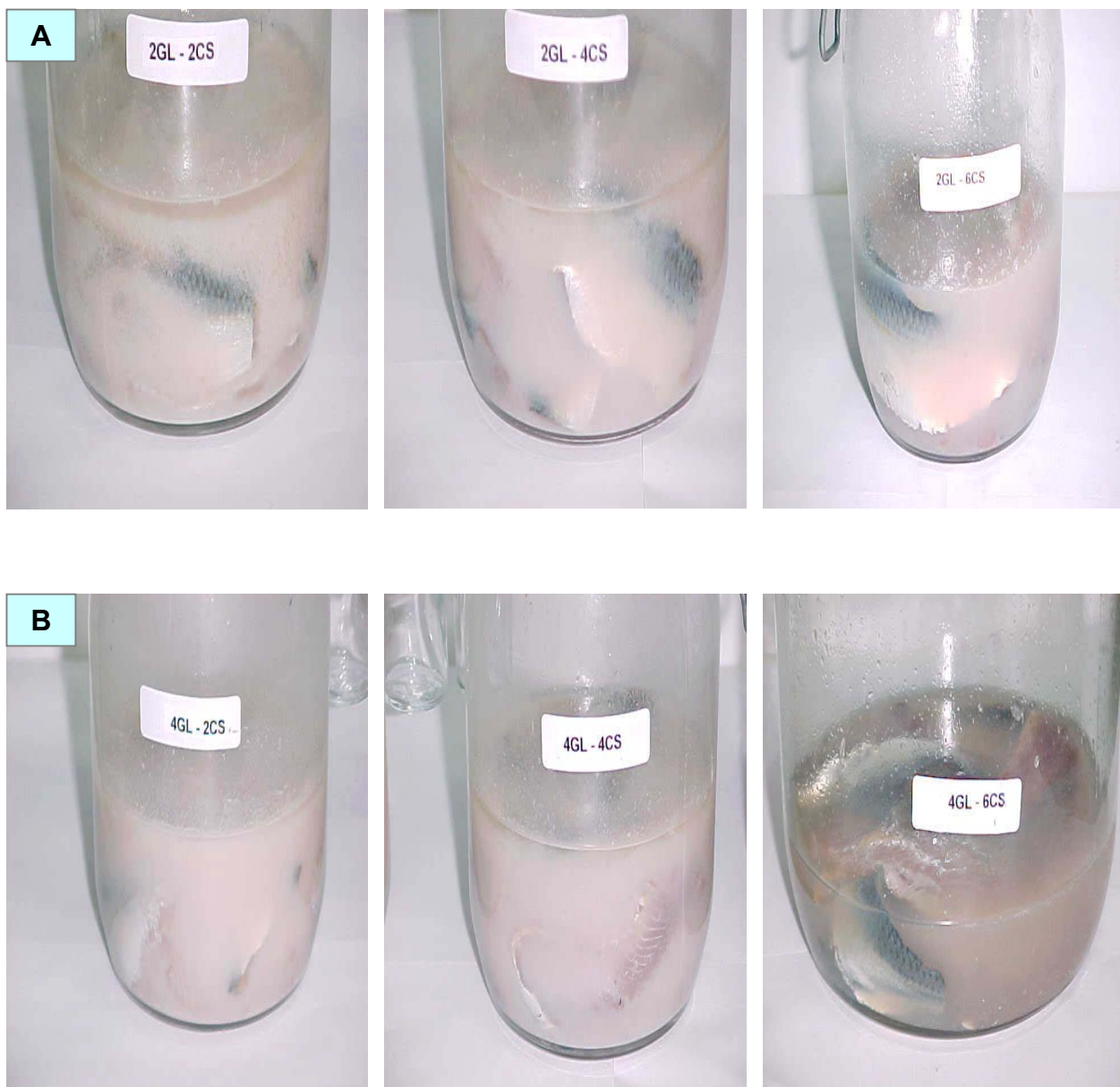


Figura 8: Evolução da fermentação dos filés de sardinha-verdadeira com 14 dias de processamento.

A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.

B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl.

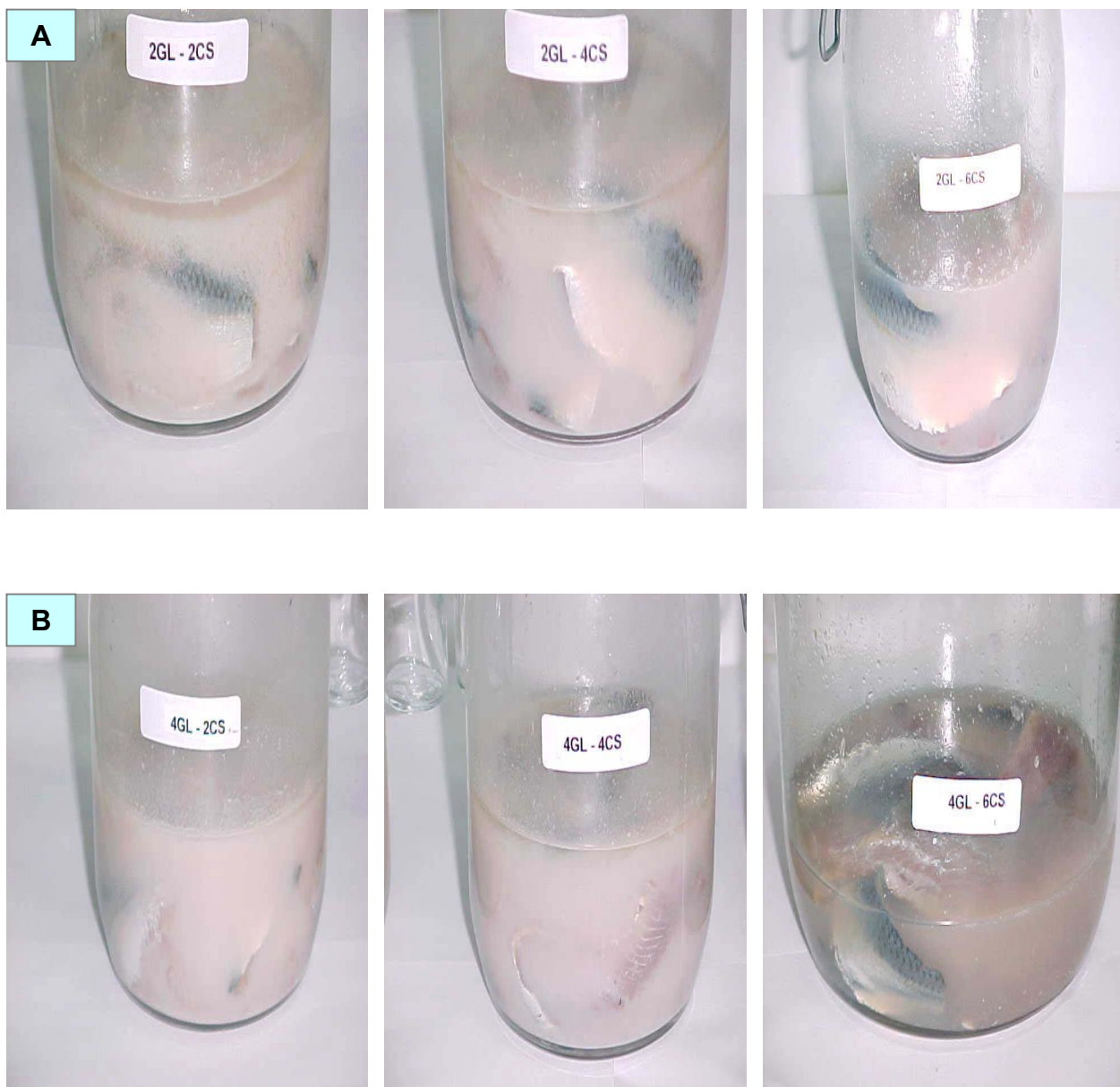


Figura 9: Evolução da fermentação dos filés de sardinha-verdadeira com 21 dias de processamento.

A: *Lactobacillus sakei* 2a, 2% glicose, 2, 4, 6% NaCl.

B: *Lactobacillus sakei* 2a, 4% glicose, 2, 4, 6% NaCl.

A maioria dos produtos tradicionais utiliza o amido com diferentes graus de geleificação e degradação, porém, poucas bactérias lácticas têm sido identificadas como produtoras de amilase. A rapidez e a eficiência da fermentação láctica foram monitoradas pela relação do decréscimo do pH com a correspondente elevação da acidez e o balanço entre a enumeração das bactérias lácticas (BL) em meio MRS e a de deterioradoras em placas com ágar para contagem (PCA) pelo método *pour plate*. O baixo crescimento das bactérias lácticas em PCA facilita uma exclusão do total das bactérias consideradas deterioradoras. A competição entre as BL e as deteriorantes é expressa entre as correspondentes contagens em MRS e PCA.

### 4.3.2 Avaliação do pH e acidez

O resultado das análises físico-químicas indicam que houve uma redução do pH à medida que a fermentação se desenvolveu, com tendência a uma estabilização entre 3,8 e 4,2, após 21 dias (Figura 10), referente à reprodução dos tratamentos com aplicação do inóculo, associado a 2 e 4% glicose e 2, 4 e 6% NaCl. O efeito da redução inicial do pH sugere como uma das causas, a produção de ácido, a partir da cultura iniciadora inoculada, inibindo a multiplicação dos microrganismos de deterioração, permitindo a seqüência da fermentação. Com a redução do pH para valores inferiores a 4,4 no início da fermentação, a microbiota láctica se multiplica rapidamente, resultando em uma redução imediata ainda maior. A produção de ácido é um mecanismo inespecífico, afetando todas as bactérias acidossensíveis indiscriminadamente. GORY et al. (2001) mencionam este comportamento numa avaliação do crescimento de três cepas de *L. sakei* (duas geneticamente modificadas), associadas a produção de lactato e variação de pH. O valor inicial (pH) que era 5,6 reduziu para 4,2 a 30 °C e 4,4 a 22 °C, durante 24 horas.

Os resultados apresentados na Figura 10 indicam que a rápida fermentação láctica do substrato foi obtida da maneira como se esperava. Possível razão para o aumento da velocidade da fermentação inclui as dificuldades criadas pela capacidade tampão destes substratos proteínáceos ou para a adaptação e multiplicação das BL. A grande capacidade tampão deste substrato na faixa de pH

entre 5 e 6 pode permitir a deterioração antes que ocorra uma produção de ácido láctico, suficiente para a redução do pH nas primeiras 24 horas de fermentação.

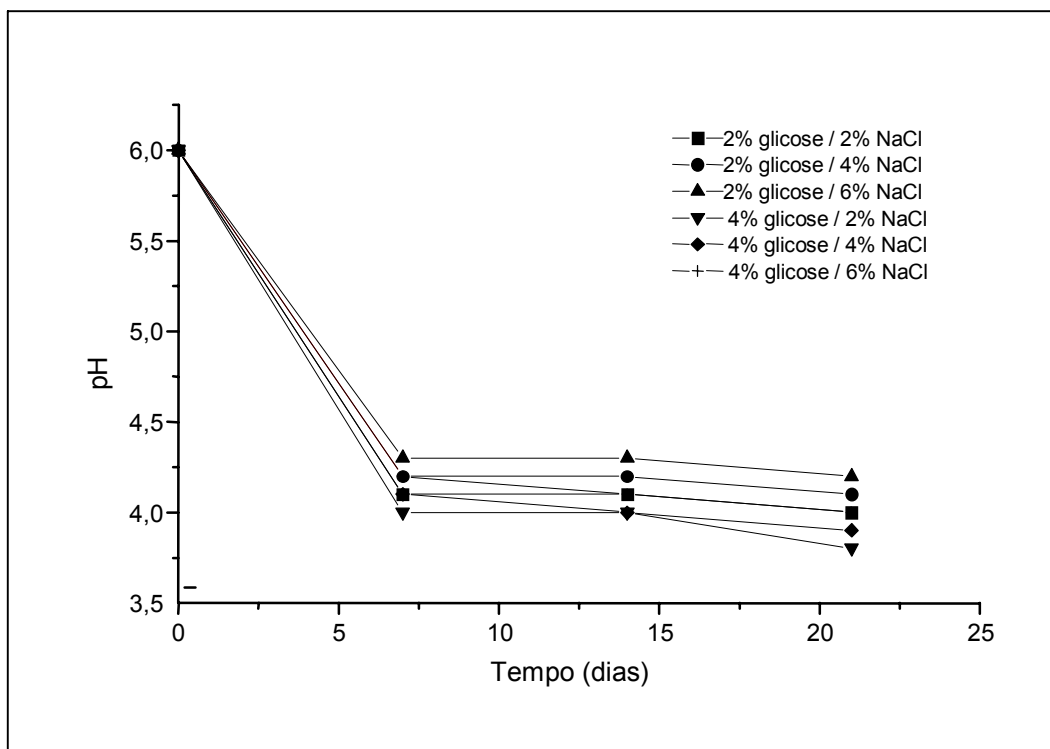


Figura 10: Variação do pH durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a com 2 e 4% glicose. O efeito sobre o pH inicial do substrato foi comparado através da adição de 2, 4 e 6 % NaCl (p/p).

Um outro fator pode ter sido a relação entre a carga inicial dos microrganismos competidores e o inóculo. Diferente das carnes, os peixes marinhos teleósteos possuem um elevado pH, a presença de aminoácidos livres e OTMA (composto osmoregulador) que, por redução microbiana produz TMA. Entretanto, nenhum destes efeitos impediu a eficiência do cultivo iniciador (*Lactobacillus sakei* 2a) sobre este substrato em estudo. ZHANG e HOLLEY (1999) testaram 3 linhagens de BL (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Leuconostoc mesenteroides*), isoladas de carne curada e embalada a vácuo quanto a provável inibição em função das diferentes condições de pH (5,5, 6 e 6,5) e temperatura (6 e 12°C), na presença de NaCl (2,5, 4 e 5,5%). Com relação ao pH, os valores finais encontrados (caldo MRS) não variaram significativamente, com exceção para o tratamento com 2,5% NaCl, correspondente a cepa do *L. sakei*, que apresentou uma redução para pH 5.

Isto é um indicador da atividade de crescimento deste microrganismo nessa condição salina, resultando numa considerável produção de ácido. Contrastando, quando 4 e 5,5% NaCl estiveram presentes, o efeito inibidor foi mais significativo. Para as cepas de *Lc. mesenteroides* e *L. sakei*, o crescimento foi reduzido de 1 a 2 ciclos log. *L. curvatus*, em presença de NaCl, não apresentou efeito significativo no crescimento.

Existem poucos trabalhos evidenciando o crescimento das BL em diferentes níveis de NaCl associado a baixas temperaturas (6<sup>0</sup>C). Esta temperatura relativamente baixa contribui para a diferença na capacidade de crescimento das BL com concentrações de NaCl  $\geq$  2,5%.

KORKEALA et al. (1992) citados por ZHANG e HOLLEY (1999), estudaram o efeito das concentrações de NaCl sobre a capacidade de crescimento das BL. Entretanto, esta pesquisa também foi desenvolvida a temperatura ambiente e a duração da incubação não ultrapassou 50 horas. Foi verificado que as cepas de *L. sakei* e *L. curvatus* são mais resistentes ao NaCl que *Lc. mesenteroides*. Na pesquisa, as cepas de *L. curvatus* apresentaram variações significativas na presença de 4 e 5,5% NaCl. Com efeito, os relatos científicos atestam que o crescimento bacteriano, correspondente à microbiota deterioradora, geralmente ocorre nos valores ótimos de pH, entre 6 e 7. Valores inferiores resultam na morte microbiana e será mais acentuada quanto mais elevada for a temperatura de exposição. O limite crítico de pH para a multiplicação de microrganismos deterioradores pode ser exemplificado através da sobrevivência da *Salmonella*. Em determinadas condições, quando o pH decresce de 7, o efeito inibitório começa a ser detectado quando o pH atinge valores inferiores a 5. Com relação ao *Campylobacter jejuni*, este microrganismo apresenta uma menor resistência; não cresce em temperaturas inferiores a 30<sup>0</sup>C e não sobrevive quando o pH é reduzido para 4,5. Entretanto, devemos verificar que, o efeito antimicrobiano das condições ácidas não depende somente do pH, mas das características do ácido envolvido no processo inibitório, como o grau de dissociação e o efeito tóxico inerente da própria molécula ácida (ADAMS e NICOLAIDES 1997).

Considerando o tratamento em que foi utilizada 2% glicose (Figura 10), o aumento da concentração de NaCl de 2 para 6% reduz muito pouco a relação de fermentação. Com o emprego de 2% NaCl, o pH decresce para 4,1 após 7 dias e atinge 4 com 21 dias de fermentação. Com a presença de 6% NaCl, o resultado é

uma baixa fermentação durante os 7 primeiros dias; o pH se mantém em 4,3 após 7 dias e atinge 4,2 com 21 dias de fermentação. Com a utilização de 4% glicose, a relação de redução do pH é mais sensível. No mesmo período de fermentação e com a utilização de 2% NaCl, o pH atingiu 4 e 3,8, respectivamente. Com 6% NaCl, o pH atingiu 4,2 após 7 dias e 4 com 21 dias de fermentação.

Com relação ao tratamento com 4% NaCl, correspondente a 2 e 4% glicose, a redução de pH manteve uma equivalência intermediária. Após 7 dias de fermentação (2% glicose), o pH reduziu para 4,2 e se manteve em 4,1 após 21 dias. Com 4% glicose, o pH reduziu para 4,1 com 7 dias e, para 3,9 em 21 dias de incubação. Os resultados obtidos são compatíveis com aqueles encontrados na pesquisa de MORZEL et al. (1997). No trabalho citado, é mostrada a avaliação de cultivos iniciadores na fermentação de filés de salmão (*Salmo salar*). Foi otimizado parâmetros de fermentação para avaliar a dependência do crescimento da microbiota e a redução do pH através da adição da sacarose, NaCl e  $\text{NaNO}_2$ , submetidas a várias temperaturas de incubação. O resultado mostrou que o maior potencial de produção de ácido foi obtido com 5% de sacarose. O aumento da concentração não mostrou uma melhora significativa no processo de acidificação. Entretanto, foi observado que, este teor implica em uma quantidade substancial de sacarose que permanece remanescente no sistema após a fermentação, representando um substrato potencialmente disponível para o desenvolvimento de patogênicos. Por outro lado, o excesso de NaCl mostrou um efeito negativo no crescimento das linhagens inoculadas e na redução do pH, criando condições desfavoráveis para o desenvolvimento das bactérias lácticas. Com relação à dependência do pH com a temperatura de incubação (4 e 30°C), pôde ser observado que o pH aumentou com a temperatura, decorrente de um crescimento microbiano máximo a 20°C.

Trabalho semelhante estudou a obtenção de farinha de pescado a partir de resíduos de peixe, empregando bactérias lácticas (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) utilizadas na elaboração de leite fermentado e sacarose, como substrato fermentecível, com incubação a 40°C durante 48 horas. A pesquisa mostrou como a sacarose se apresentou como um fator limitante para a multiplicação das BL. Na ausência da sacarose, não se produzem trocas de pH e acidez, devido a falta da fonte energética para a fermentação. Pelo contrário, a microbiota contaminante que se encontrava nos resíduos, produziu bases voláteis como resultado da alteração das substâncias protéicas e nitrogenadas, ocasionando

a elevação do pH. Entretanto, quando é agregado 2,5% sacarose, o pH reduz para 4,3 em 48 horas e, reciprocamente, a acidez aumenta para 2,6%. Com a agregação de uma maior quantidade de sacarose, variável entre 5 e 10%, o pH manteve uma tendência de rebaixamento, variável em função do tempo de incubação. Em 48 horas, o pH e a acidez, alcançados com estas concentrações salinas, foram 4 e 3,2%, respectivamente (ARECHE e BERENZ, 1989).

A problemática do comportamento microbiano é multifário. Não há dúvida que, neste caso, as interações simultâneas entre a temperatura de fermentação,  $A_w$ , linhagem inoculada, bem como, a composição do substrato, para citar algumas, indica as melhores condições para obter a máxima atividade e, portanto, a estabilidade do sistema em estudo.

O trabalho de OLYMPIA et al. (1992), relacionado com a atividade das BL e suas enzimas, isoladas do *burong bangu*, produto consumido nas Filipinas obtido por fermentação do amido de mandioca agregado ao pescado, apresentou pH e acidez após 10 dias de fermentação, equivalente a 4,2 e 1,25%, respectivamente. Neste estágio, o alimento é considerado pronto para o consumo. A atividade amilolítica iniciou quando o pH atingiu o valor ótimo (4), distante e muito inferior àquele encontrado na mistura fermentada de camarão e arroz, conhecida como *balao-balao*. O pico da atividade enzimática ocorreu no último estágio do processo de fermentação quando o pH do produto foi similar ao ótimo para a atividade da amilase. As condições que favorecem o crescimento das BL incluem:  $\text{pH} \leq 6,0$ ,  $A_w$  entre 0,955 e 0,965 controlada pela adição de 2,5 a 3% de NaCl e a presença de algum açúcar fermentecível (ERIKSSON, 1991). Na produção do *bakasang*, um tradicional molho de peixe fermentado consumido na Indonésia, quando submetido a um controle de pH através da adição de NaCl (10 e 20%) e glicose (1 e 10%), apresentou redução do pH em todos os tratamentos. As amostras com adição de glicose mostraram um grande decréscimo do pH, contrário àquelas sem a adição da glicose. O maior descenso ocorreu quando foram utilizados 10% NaCl e 5% glicose, explicado por um possível envolvimento das BL com habilidade para fermentar a glicose e produzir ácido láctico (IJONG e OHTA, 1996). Segundo OWEN e MENDONZA (1985), citados por ADAMS et al. (1987), vários produtos tradicionais, produzidos com peixe fermentado, envolvem uma cura inicial com um teor elevado de NaCl antes da fermentação láctica.

Este processo preliminar é capaz de promover uma rápida sensibilização dos microrganismos deterioradores. Várias pesquisas (MORZEL et al., 1997; ØSTERGAARD et al., 1998), trabalhando com sistemas semelhantes, sugerem que uma adequada concentração de NaCl favorece a multiplicação das bactérias lácticas com conseqüente formação de ácido lático e rebaixamento do pH. A Figura 11 mostra a influência da concentração salina (2, 4 e 6% NaCl) sobre o pH da sardinha submetida a cura na ausência da glicose e do cultivo iniciador.

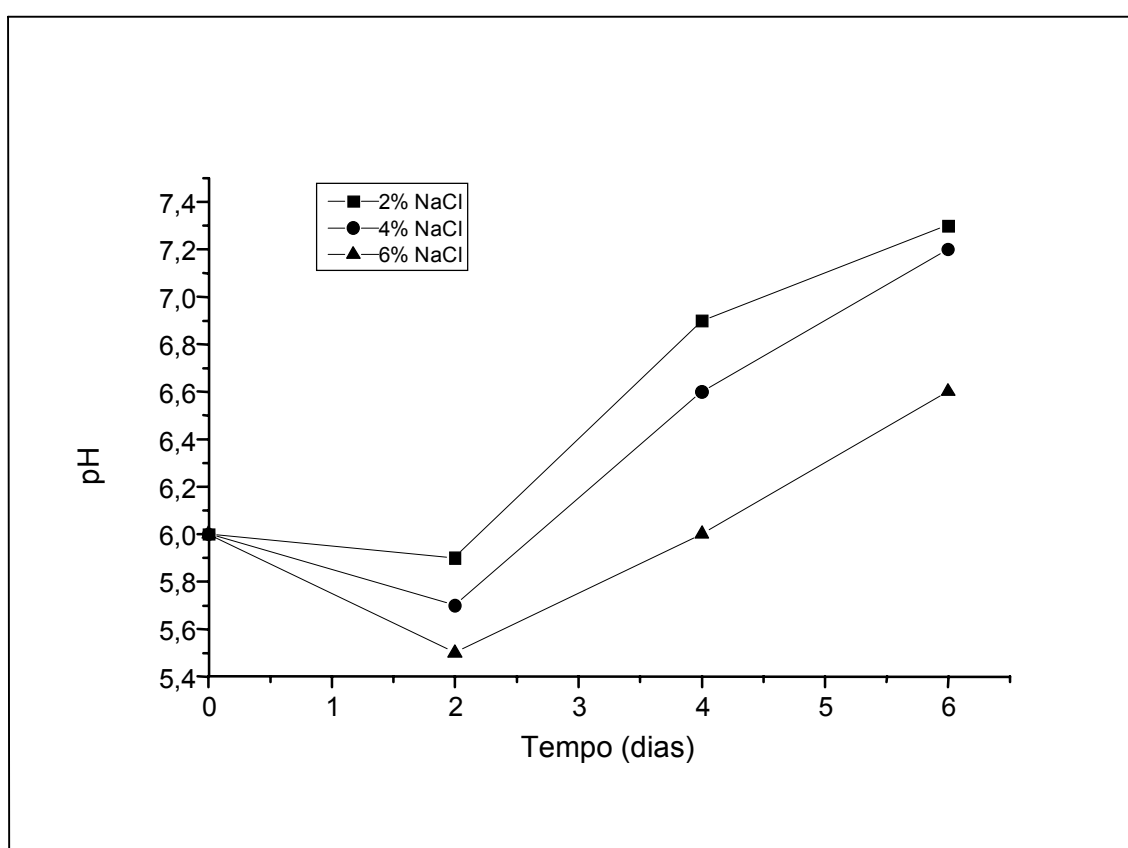


Figura 11: Influência da concentração salina sobre o pH da sardinha - verdadeira submetida ao processo de cura, na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito sobre o pH inicial do substrato foi comparado através da adição de: 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

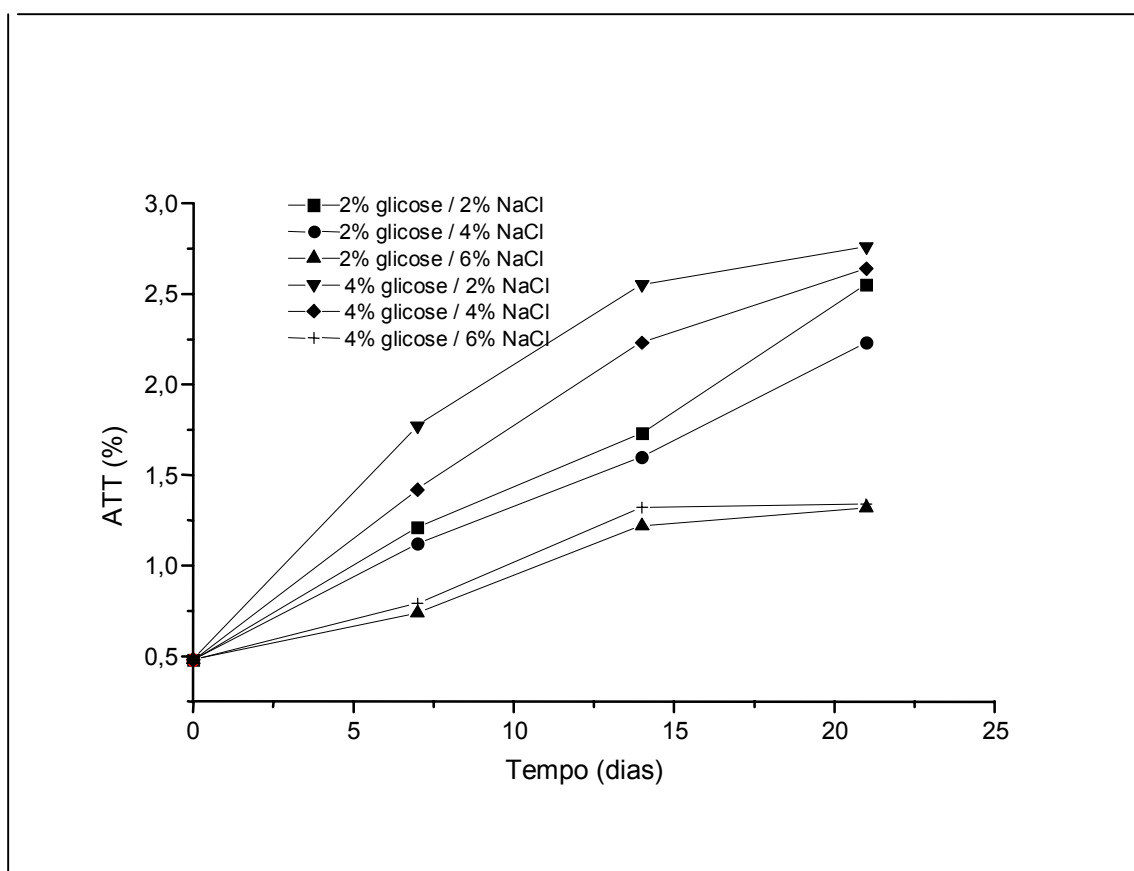
Com 2 dias de cura, o pH se mantém em 5,9 (2% NaCl), 5,7 (4% NaCl) e 5,5 (6% NaCl). Com 4 dias, o pH atinge 6,9 (2% NaCl), 6,6 (4% NaCl) e 6 (6% NaCl). Em 5 dias de fermentação (6% NaCl), o pH atinge 6,6. Considerando a



disponibilidade de nutrientes, conjugado com a elevada  $A_w$  e processamento a temperatura ambiente (23 e 24<sup>0</sup>C), o poder tampão do substrato fez com que o pH se elevasse em direção a faixa alcalina, permitindo o progressivo metabolismo microbiano.

Se considerarmos o tratamento com o cultivo iniciador, a acidez resultante da fermentação corresponde a ácidos orgânicos não dissociados, os quais possuem uma acentuada atividade antimicrobiana. O resultado das análises químicas mostra não somente que a acidez aumenta com o teor de glicose e tempo de fermentação, como possibilita observar que a relação de acidificação aumenta com a redução do NaCl. A Figura 12 apresenta a produção de ácido láctico durante a fermentação da sardinha, reproduzindo os tratamentos com aplicação do cultivo iniciador, associado a 2 e 4% de glicose e 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

Com o tratamento correspondente a adição de 2% glicose e 2% NaCl, a acidez titulável após 21 de fermentação obteve o máximo valor de 2,55%. Com 4% de glicose e equivalente teor salino, atingiu 2,76 %. Assim que, quando se agrega 2% glicose e 2% NaCl, o pH reduz para 4,1 em 7 dias e para 4 em 21 dias. Reciprocamente, a acidez aumenta para 1,21 e 2,55%, respectivamente. Com 4% glicose e 2% NaCl, o pH reduz para 4 em 7 dias e 3,8 em 21 dias. Por sua vez, a acidez aumenta para 1,77% (7 dias) e 2,76 % (21 dias). Contrariamente, na ausência da glicose e, considerando as 3 concentrações salinas (2, 4, e 6% NaCl), a acidez mostrou uma tendência de queda, comprovada pela deterioração do pescado com 6 dias de processamento (Figura 13). Trabalhos similares envolvendo fermentações lácticas mostram que o comportamento do pH e acidez não são diferentes. ADAMS et al. (1987), avaliando a produção de ácido láctico como preservativo de truta (*Salmo trutta*), monitoraram a eficiência da fermentação láctica pela relação do decréscimo do pH, elevação da acidez e balanço entre bactérias lácticas (enumeração em MRS) e bactérias deterioradoras (enumeração em PCA). Os tratamentos aplicados ao substrato, envolvendo os cultivos iniciadores comerciais compostos por cepas de *L. plantarum* (Lactostart) e *P. pentosaceus* (Pediostart) mostraram uma relação de rebaixamento do pH com a adição de 5% sacarose (p/p).



\*ATT: Acidez titulável total

Figura 12: Produção de ácido láctico durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a, com 2 e 4% glicose. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

O aumento da concentração de NaCl (6%) também baixou a relação de fermentação. Utilizando 1% NaCl, 4% glicose e Lactostart, o pH reduziu para 5,4 nas primeiras 24 horas e 4,2 após 4 dias. Com 2 e 3% NaCl, o resultado foi uma baixa fermentação durante os 3 primeiros dias de fermentação; o pH se manteve entre 6 e 6,5 após 24 horas e atingiu 4,2 com 4 dias de fermentação. Com 4 a 6% NaCl, o pH se manteve em torno de 6,5 com incubação de 7 dias. A repetição com diferentes tratamentos mostrou diferenças no período mais importante, os 2 primeiros dias de fermentação e, isto pode ser o reflexo de diferentes graus de frescor do peixe, obtido comercialmente, afetando a relação entre as bactérias lácticas e a microbiota competidora. Recentemente, foram pesquisadas as características antagônicas relacionadas com *L. monocytogenes* presente em molho fermentado (asiático),

utilizado como condimento utilizando a glicose como elemento fermentecível (ϕSTERGAARD et al., 1998). A glicose foi fermentada rapidamente, entretanto, o pH decresceu muito lentamente no caldo suplementado com 4% (glicose) e 3,5% NaCl na mistura de arroz e peixe. Apenas 4 das 44 cepas isoladas puderam fermentar carboidratos complexos como os do arroz, batata e amido de milho (ϕSTERGAARD et al., 1998).

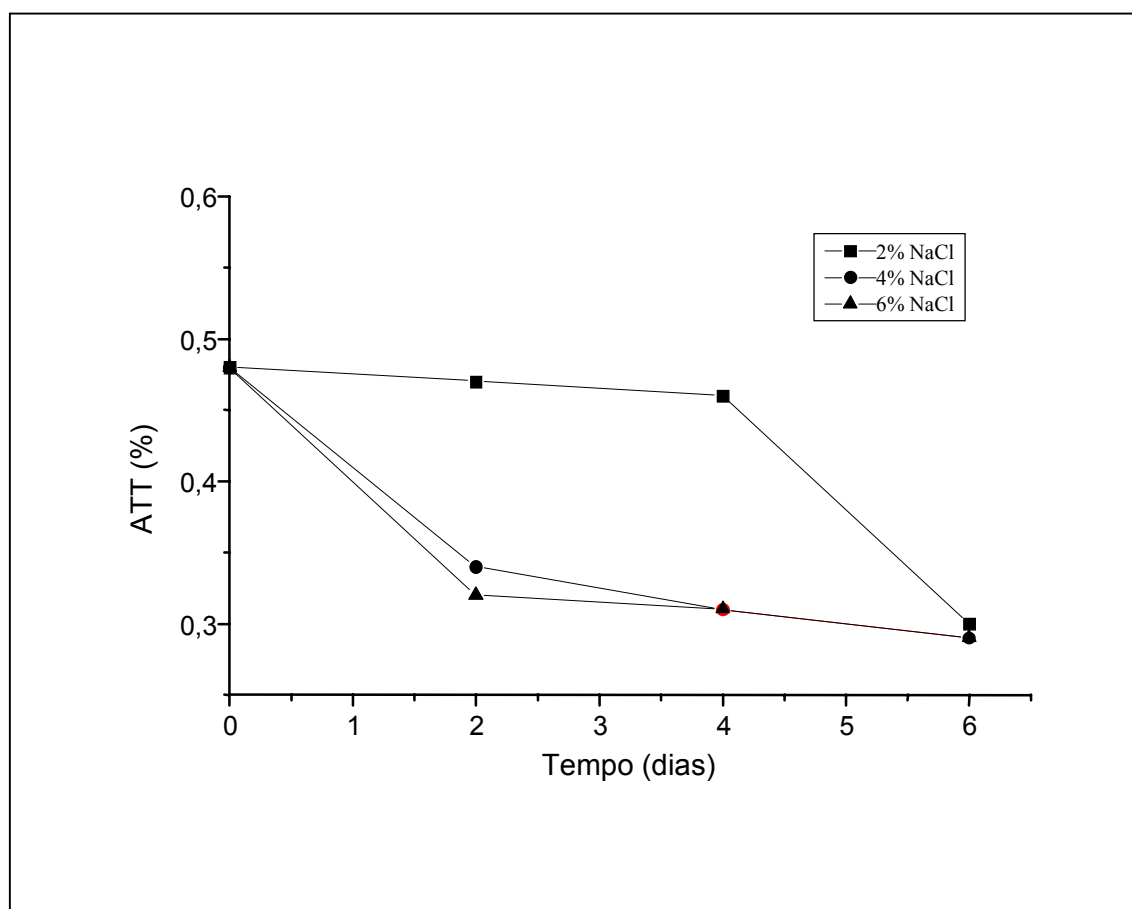


Figura 13: Influência da concentração salina na produção de ácido láctico durante a cura da sardinha - verdadeira na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito sobre o pH inicial do substrato foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

ARECHE e BERENZ (1989), examinando a fermentação de resíduos de pescado para a obtenção de silagem, desenvolvida com o auxílio de bactérias lácticas utilizadas em laticínios, determinaram a estabilidade quando a acidez atingiu

4,55% e o pH 3,9 após 180 dias de estocagem. Com 20 dias, os valores de acidez e pH foram 4,45% e 3,7, respectivamente. Para estabelecer a participação das bactérias lácticas na produção da silagem, foram realizados experimentos tendo como base: 81,5% resíduos de pescado cozidos, 10% cultivo iniciador comercial, 7,5% sacarose e 1% NaCl. Uma das conclusões finais se refere à falta de influência do NaCl no processo fermentativo.

### **4.3.3 Atividade antagônica do *L. Sakei* 2a**

Como se observa (Figuras 14 e 15), as bactérias lácticas apresentaram um bom desempenho na inibição dos microrganismos deterioradores. A rapidez e a eficiência da fermentação foi monitorada pela relação do decréscimo do pH (dependendo da concentração de NaCl, uma redução de 6 para 4 ou 4,3, nos primeiros 7 dias) e o balanço entre a enumeração das bactérias lácticas e o total de bactérias deterioradoras. A queda do pH foi devida a produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas, o que não descarta a possibilidade de produção deste ácido por outros microrganismos. TANASUPAWAT e KOMAGATA (1995) mencionam que os estafilococos presentes em pescado fermentado, com características de coagulase positivo e hemolisina negativa, têm a capacidade de produzir pequena quantidade de ácido láctico, porém sem influência maior no desenvolvimento da fermentação e produção destes alimentos pesqueiros.

Considerando a carga inicial das bactérias deteriorantes em PCA ( $10^6$  UFC g<sup>-1</sup>), ocorreu um significativo aumento da contagem nos primeiros 7 dias de fermentação ( $10^{11}$  -  $10^{12}$  UFC g<sup>-1</sup>) e, decresceu gradualmente à partir deste tempo e até o 21<sup>o</sup> dia para todas as amostras ( $10^9$  UFC g<sup>-1</sup>). O efeito de inibição somente foi menor para a amostra correspondente a adição de 4% glicose e 2% NaCl, cuja com redução para  $10^{10}$  UFC g<sup>-1</sup>. Observa-se que, o nível de variação no PCA foi similar na maioria dos casos. O aumento no teor de glicose (de 2 para 4%) não causou diferença significativa na contagem bacteriana. A Figura 17 que se refere à contagem de bactérias em placas (PCA), representado por um aumento da microbiota nos primeiros 7 dias de fermentação, ou uma falsa tendência de aumento e, posteriormente, uma constante e gradual redução até o final da fermentação. Este aumento inicial se deve a presença de bactérias não formadoras de ácidos que

gradualmente desaparecem durante o processamento pela transformação do meio em um substrato bastante acidificado. Comparando os resultados (Figura 17) com aqueles obtidos com as bactérias lácticas, verificamos que estes microrganismos estão presentes, apenas no reduzido estágio inicial da fermentação, enquanto que durante todo o período do processamento há uma predominância das bactérias formadoras de ácidos (FA). Estas inversões de crescimento demonstradas pela diferença da população inicial de cada grupo na matéria-prima, presente no início da fermentação, pode ser explicado como sendo um resultado da sensibilidade ao baixo pH e acidez elevada, presença de metabólitos antagônicos aos microrganismos deterioradores, necessidade de requerimentos nutricionais e a mudança do potencial redox. De acordo com o ICMSF (1980), nas fermentações anaeróbicas, muitos microrganismos associados à deterioração não toleram a exclusão do oxigênio e a presença do CO<sub>2</sub>. IJONG e OHTA (1996) também não obtiveram resultados superiores na contagem em PCA quando, em trabalho semelhante com molho de peixe fermentado, foi adicionada glicose e NaCl em quantidades variáveis entre 100 g kg<sup>-1</sup> e 200 g kg<sup>-1</sup> NaCl. As amostras contendo 100 g kg<sup>-1</sup> NaCl apresentaram valores mais elevados de contagem em PCA que aquelas com 200 g kg<sup>-1</sup> NaCl. Através dos resultados obtidos, a adição de glicose também não produziu efeito significativo na contagem bacteriana, indicando que os baixos valores nas amostras com 200 g kg<sup>-1</sup> NaCl podem ser devidos à baixa atividade de água (A<sub>w</sub>). Também como na fermentação da sardinha, ocorreu um significativo aumento na contagem em PCA durante os primeiros 10 dias e decresceu gradualmente a partir deste tempo para todas as amostras. Após 10 dias de incubação, a carga bacteriana aumentou em todas as amostras com o correspondente decréscimo do pH.

De acordo com MACRAE (1993), citado por IJONG e OHTA (1996), uma solução contendo 200 g NaCl e 800 g H<sub>2</sub>O possui uma atividade de água (A<sub>w</sub>) igual a 0,838. Até a A<sub>w</sub> 0,950, o crescimento da maioria das bactérias Gram-negativas ou formadoras de esporos, é inibido. Bactérias Gram-positivas, como *Lactobacillus* e *Micrococcus* spp. toleram baixa A<sub>w</sub> e atuam como microflora competitiva na fermentação. Apenas bactérias halófilas podem crescer e permanecerem viáveis até o final do processo.

Os resultados apresentados na Figura 15 indicam que a rápida fermentação láctica do substrato (peixe) foi obtida como se esperava, conforme os critérios descritos na introdução do texto, mas não tão fácil, como se preconizava. A contagem em MRS a partir do sétimo dia de fermentação e até o 21<sup>o</sup>, excedeu a dos deterioradores (PCA) entre 1 Log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> e 5 Log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>. Assim que, a relação de fermentação foi maior em todos os tratamentos se considerarmos a utilização de 4% glicose, proporcionando uma diferença de contagem em MRS, em pelo menos 1 Log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>. Muitos carboidratos, incluindo os amiláceos, são bons substratos para as BAL e o uso deste tipo de nutriente pode provocar um início muito grande da atividade láctica. Os principais carboidratos que podem ser utilizados nestas fermentações inclui o arroz cozido, o arroz pré-fermentado ou farináceos a base de mandioca (TWIDDY et al., 1987).

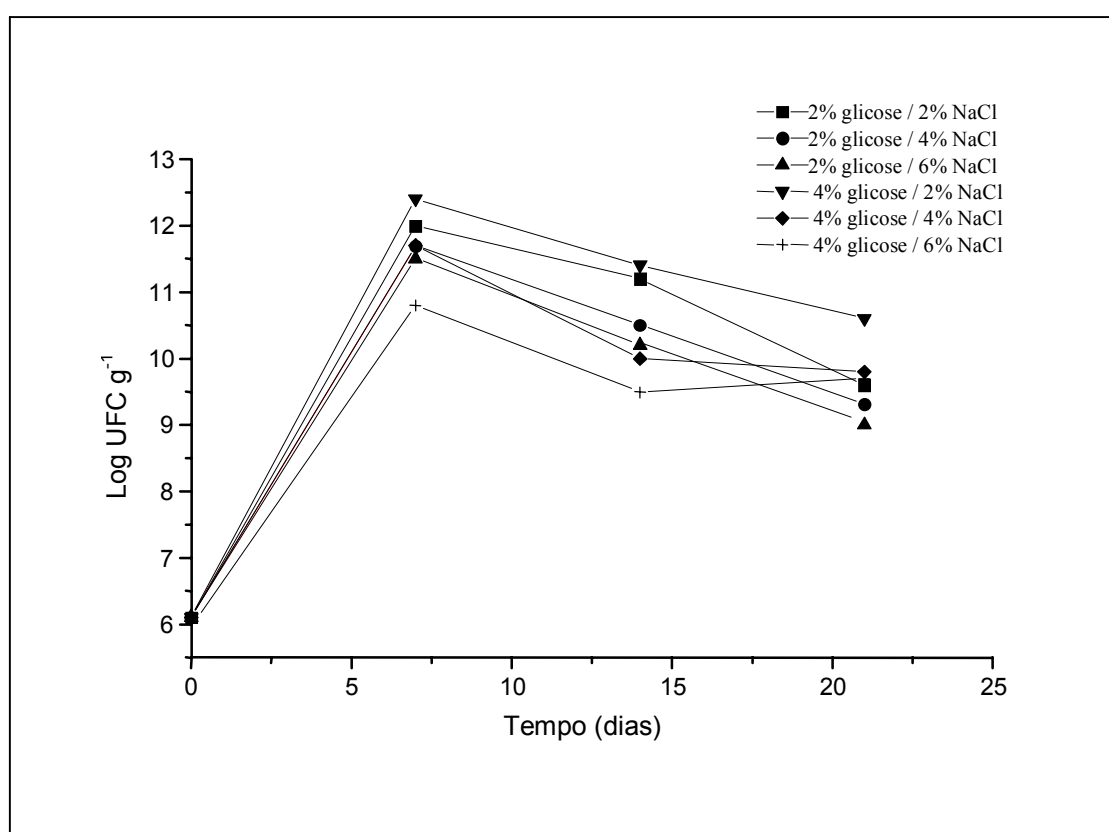


Figura 14: Variação na contagem de microrganismos em placas sobre PCA (Log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a, com 2 e 4 % glicose. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

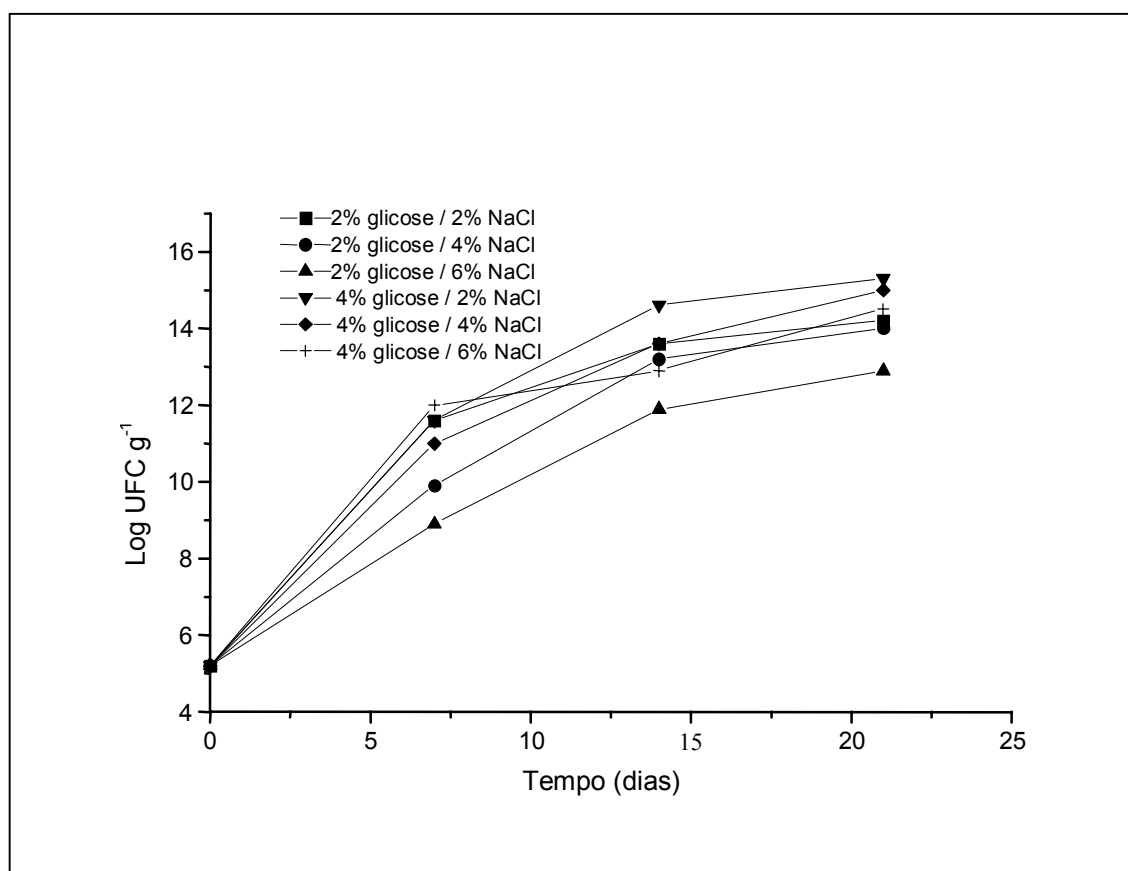


Figura 15: Variação na contagem das bactérias lácticas sobre MRS ( $\text{Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$ ) durante a fermentação da sardinha - verdadeira pelo *Lactobacillus sakei* 2a, com 2 e 4% glicose. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

ADAMS et al. (1987) estudaram a fermentação de peixes com a adição de glicose e NaCl, avaliando diversos fatores que favorecem a rápida fermentação láctica, como o rápido decréscimo do pH ( $< 4,5$ ) nas primeiras 48 horas e uma rápida multiplicação das BAL com decréscimo dos microrganismos deterioradores. Estudos com *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* mostraram que a relação de fermentação aumenta na faixa entre 1 e 5% de glicose ou sacarose, ao passo que, aumentando a concentração de NaCl (1 para 6%), há uma relação de redução de fermentação. Trabalhando com atmosfera modificada e temperatura de incubação entre 15 e 37 °C, a contagem de bactérias lácticas raramente excedeu valores significativos, representativos da deterioração, pelo menos durante os primeiros 2 dias de fermentação. A utilização de pedaços cozidos de peixe mostrou pequenas trocas nas relações de fermentação. Em função dos resultados

encontrados, é conclusivo que, cada fermentação dependerá da microbiota acompanhante, composição do alimento,  $A_w$ , pH, concentração de NaCl e temperatura de processamento.

A potencialidade das bactérias lácticas associada com os processos fermentativos depende do tipo de carboidrato utilizado. TWIDDY et al. (1987) avaliaram a utilização do amido de arroz e mandioca como carboidratos alternativos, com 1 dia de pré-fermentação, em produtos elaborados com peixe. Contrariamente ao amido de arroz, a utilização da mandioca (20% p/p) resultou em uma rápida fermentação; o pH reduziu para valores inferiores a 4,5 e a relação entre as bactérias lácticas e as deterioradoras excedeu 4 Log UFC g<sup>-1</sup> nas primeiras 48 horas de crescimento.

Assim como neste trabalho, foi necessário a utilização de um carboidrato com baixo peso molecular (2% glicose) para prevenir o aumento do pH nos primeiros 2 dias de fermentação. Uma análise dos resultados apresentados nas Figuras 16 e 17 (sistema de referência), que relaciona o efeito do NaCl na cura da sardinha na ausência da glicose e do cultivo iniciador, nos permite observar o rápido crescimento dos microrganismos deterioradores. Com 4 dias de cura, à temperatura de 24 °C (Anexo 27) e teor de 2% e 4% NaCl, a quantidade de microrganismos (PCA) atingiu 15,3 Log UFC g<sup>-1</sup> e 14,5 Log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente. Com 6 dias, os valores chegam a 18,4 Log UFC g<sup>-1</sup>, 17,2 Log UFC g<sup>-1</sup> e 15,7 Log UFC g<sup>-1</sup>, correspondente a 2, 4 e 6% NaCl, respectivamente. Neste estágio, pudemos observar que as três amostras apresentavam variações na textura e odores significativos, associados a uma proteólise elevada, decorrente de uma atividade enzimática oriunda da microbiota natural ou contaminante. Considerando a quantidade de microrganismos presente na matéria-prima ( $1,3 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>), a elevada temperatura de processamento (24 °C), reduzido teor salino (2, 4 e 6% NaCl) e pH inicial elevado (6) provavelmente por decorrência do efeito tampão, houve a produção elevada de aminas biogênicas, ocasionando a deterioração. Apesar da presença inicial de bactérias lácticas no sistema de referência (5,2 Log UFC g<sup>-1</sup>), o aumento da carga microbiana (aproximadamente 10 Log UFC g<sup>-1</sup>) em 6 dias de cura, não foi suficiente para superar o antagonismo criado pela microbiota não produtora de ácido.

De acordo com VALDIMARSSON e GUDBJÖRNSDÓTTIR (1984), citados por MORZEL et al. (1997), contagens bacterianas em MRS mostram que as bactérias lácticas representam apenas a menor parte da microbiota (5%) do peixe fresco.



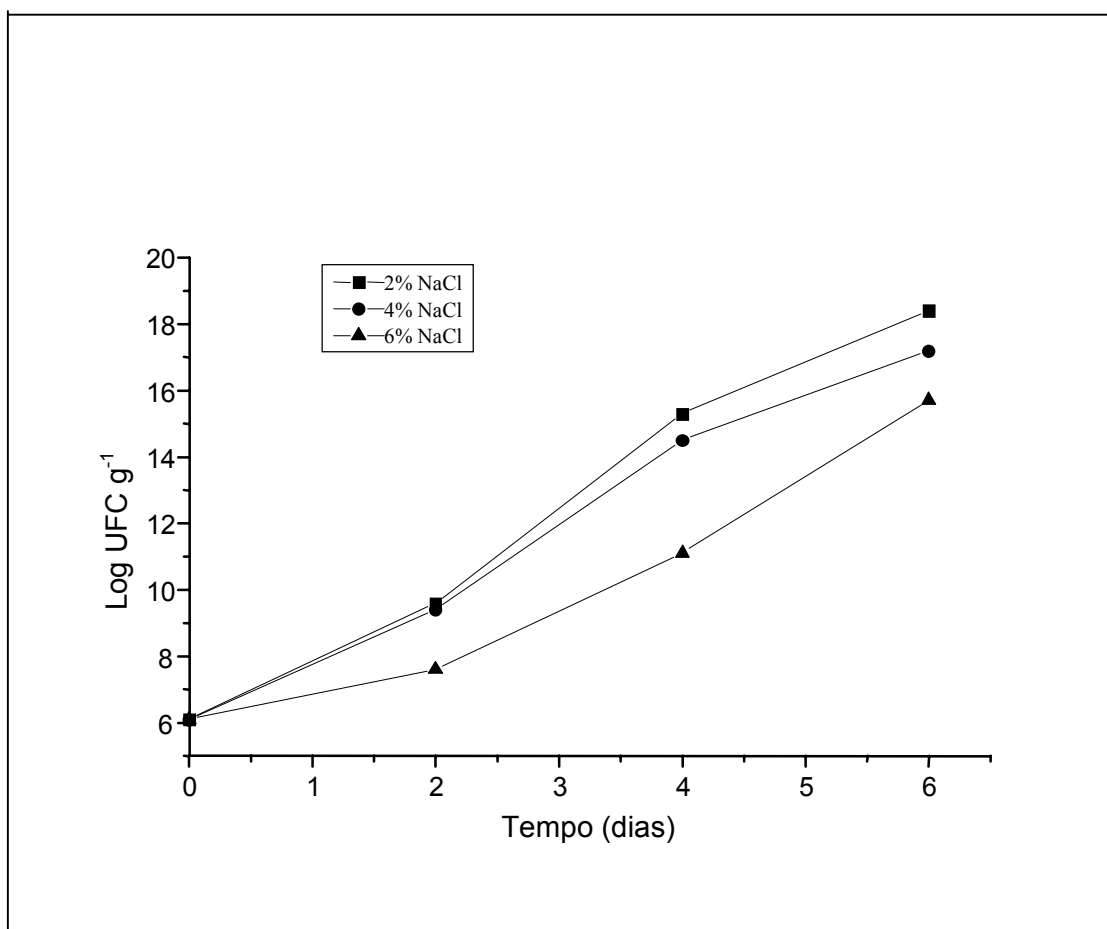


Figura 16: Influência da concentração salina sobre o crescimento dos microrganismos em PCA ( $\text{Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$ ) durante a cura da sardinha - verdadeira, na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

As bactérias lácticas crescem em determinados produtos de carne, como os salames e, vários trabalhos têm sido desenvolvidos comparando o efeito da produção de ácido láctico e outros compostos antagônicos, por determinadas cepas, frente a uma microbiota deterioradora presente nestes alimentos. KEARNEY et al. (1990), trabalhando com carne e pesquisando o efeito antagônico de 2 bactérias ácido lácticas (*Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus plantarum*) com cultivo iniciador comercial constatou a eficiência destas linhagens no processo fermentativo. Superior ao *P. pentosaceus*, a cepa de *L. plantarum* exibiu uma maior relação de fermentação demonstrada pela queda do pH.

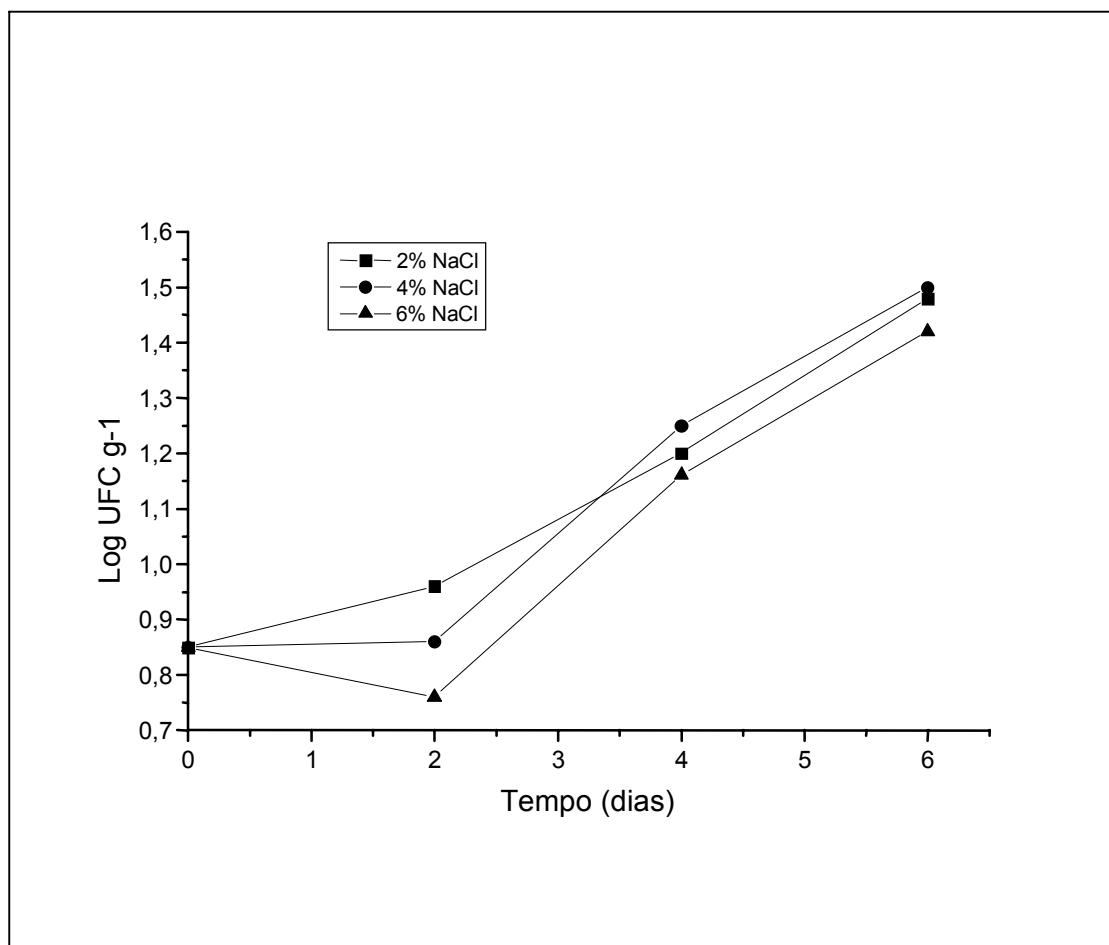


Figura 17: Influência da concentração salina sobre o crescimento das bactérias lácticas em MRS ( $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ) durante a cura da sardinha - verdadeira, na ausência da glicose e do cultivo iniciador. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% NaCl (p/p).

Em 31 horas de fermentação, o pH reduziu para 5, enquanto que o cultivo iniciador comercial atingiu este valor somente com 43 horas. Entretanto, para este mesmo valor de pH, houve uma certa equivalência com relação a produção de ácido láctico ( $3,40 \text{ mg g}^{-1}$  carne). O experimento mostrou, ainda, a superioridade do *P. pentosaceus* sobre o cultivo comercial relacionada com o crescimento em MRS. Com 20 horas de fermentação, a carga de *P. pentosaceus* atingiu aproximadamente  $8,3 \text{ Log UFC g}^{-1}$  carne, enquanto que o cultivo comercial se situou em  $8,1 \text{ Log UFC g}^{-1}$  carne. Em experimentos mais recentes, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al. (1997),

trabalhando com as cepas de *Lactobacillus sakei* e *Pediococcus* sp., estudaram a influência destes cultivos iniciadores comerciais com a cepa de *L. sakei*, isolada de salame produzido na Espanha, com relação à variação da acidificação do embutido pela produção de ácido láctico. Com relação à potencialidade da fermentação na presença de 0,1% glicose (utilizada na formulação), não foi observado diferença significativa entre as cepas comerciais. Várias metodologias têm sido usadas para avaliar a potencialidade de crescimento das bactérias lácticas e o antagonismo com relação aos microrganismos deterioradores. MORZEL et al. (1997), pesquisando um cultivo iniciador para a fermentação de filés de *salmão* (*Salmo salar*), utilizaram metodologias para avaliar a dependência do crescimento bacteriano e a redução do pH através da adição de sacarose, NaCl, NaNO<sub>2</sub> e temperaturas específicas de incubação. Conforme os resultados, o maior potencial de produção de ácido foi obtido com o teor de sacarose em 5 g kg<sup>-1</sup>. O aumento da concentração não mostrou uma melhora significativa na acidificação, apesar de que, o crescimento máximo aconteceu com 25 g kg<sup>-1</sup> sacarose. Observa-se, entretanto que, este teor implica numa quantidade substancial de sacarose que permanece remanescente no sistema após a fermentação, representando um substrato potencialmente disponível para o crescimento de patogênicos. Por equivalência, quando se utilizou 4% glicose associada a 2, 4 e 6% NaCl (fermentação da sardinha), os valores da acidez (2,76, 2,64 e 1,34%, respectivamente) não mostraram aumento significativo em relação ao tratamento com 2% glicose (2,55, 2,23 e 1,32%) apesar da carga de bactérias lácticas ter aumentado entre 1 Log UFC g<sup>-1</sup> e 1,5 Log UFC g<sup>-1</sup> (Figura 19). Independente das qualidades que os produtos fermentados adquirem com a utilização do NaCl, como adequação de sabor e maior preservação, este componente tem um efeito negativo ao criar condições desfavoráveis para as bactérias lácticas, interferindo na redução do pH. No estudo desenvolvido por MORZEL et al. (1997), o efeito negativo começou a ser observado na mais baixa concentração de NaCl (10 g kg<sup>-1</sup>) e, se fosse considerado somente a otimização do pH relacionado com o crescimento bacteriano, os parâmetros mais adequados seriam equivalentes a 5 g kg<sup>-1</sup> glicose e temperatura de incubação fixada em 20<sup>o</sup>C quando a carga das bactérias lácticas foi superior. Comparando a fermentação do salmão e da sardinha, a temperatura de incubação da sardinha, entre 23 e 24 <sup>o</sup>C (Anexo 27), esteve muito próxima daquela preconizada como ótima (20<sup>o</sup>C). Como referência, estes pesquisadores, indicaram

ainda, entre várias cepas testadas, o *Lactobacillus sakei* e *L. alimentarius*, como cultivos iniciadores mais apropriados e com maior potencialidade

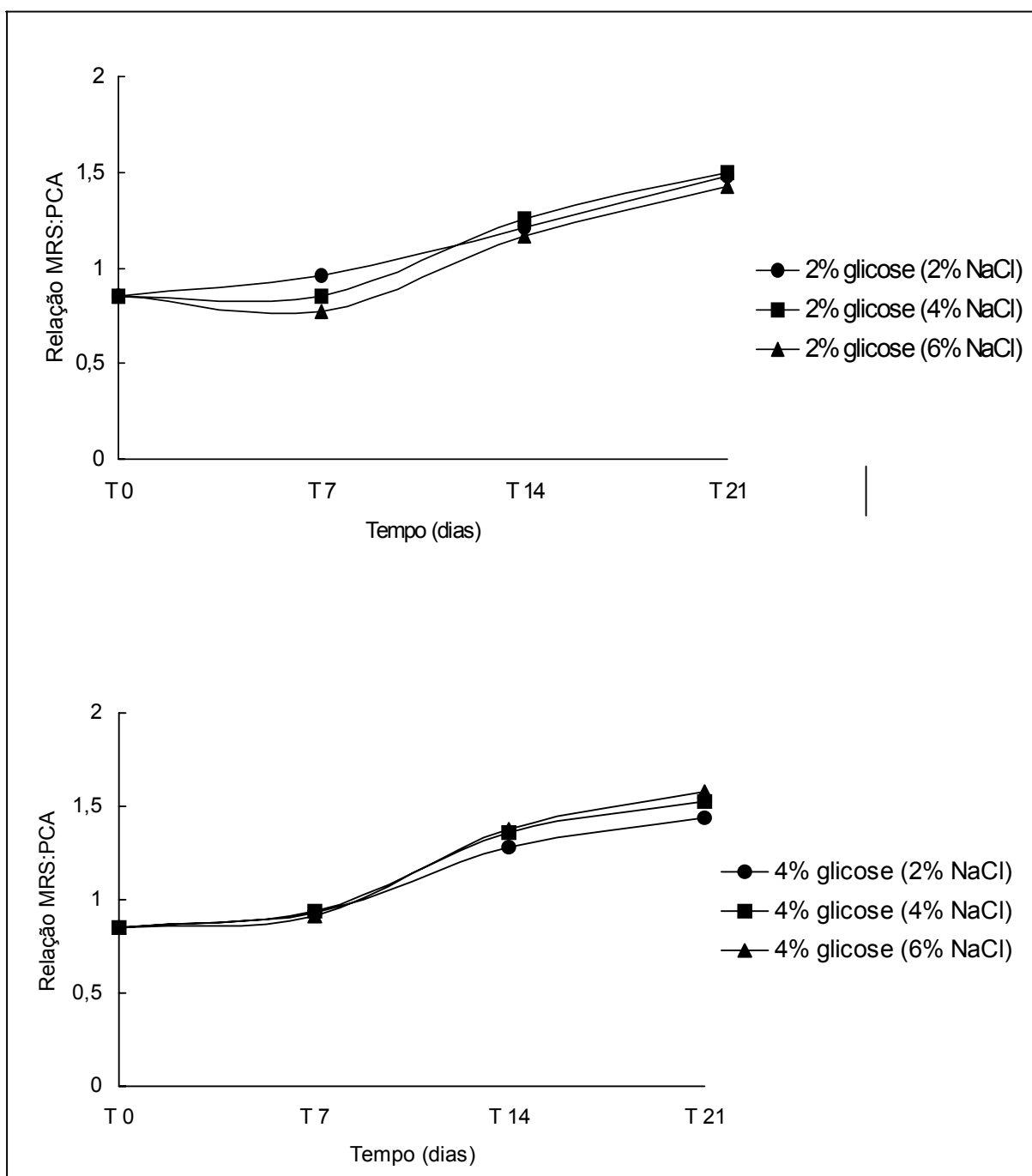


Figura 18: Efeito da adição da glicose (2 e 4%) e NaCl (2, 4 e 6%) na relação de fermentação da sardinha – verdadeira (*Sardinella brasiliensis*).

para a fermentação do salmão (*Salmo salar*). Independentemente, o *L. sakei* tem sido indicado como uma alternativa, em substituição ao *L. plantarum*, devido à elevada e comprovada competitividade e viabilidade de adaptação na fermentação de carnes (HAMMES et al., 1998).

#### **4.3.4 Relação entre o nitrogênio protéico (NP) e o nitrogênio solúvel total (NST)**

Segundo BERTULLO (1975), a estrutura muscular do pescado é composta por proteínas salinosolúveis: miosina, actina, actomiosina e pequenas quantidades de tropomiosina, que somam mais da metade de todas as proteínas da carne do pescado. A outra fração que representa entre 20 e 25% do total das substâncias protéicas, são as proteínas hidroextratáveis: mio gênio (6 a 8%), mioalbumina (7%) e globulina (8 a 10%). Juntas, correspondem as frações do nitrogênio protéico. Os constituintes do nitrogênio não protéico têm importância dietética pela extensão de sua digestibilidade e capacidade de conferir sabor ao músculo. Estes compostos se encontram dissolvidos no plasma celular e fluido intercelular e, são facilmente solubilizados em água. Compreendem: as bases nitrogenadas voláteis (incluindo a amônia), betaínas, creatina, creatinina, uréia, aminoácidos e derivados das purinas.

O conteúdo de nitrogênio protéico (Anexo 29) dos sobrenadantes de todas as amostras aumentou com o tempo de fermentação. Amostras contendo 2% de NaCl mostraram valores maiores do que aquelas contendo 6% NaCl, independente do teor de glicose utilizada (2 ou 4%). O aumento do conteúdo de nitrogênio protéico pode ser atribuído ao efeito combinado da autólise e degradação microbiana do músculo do peixe. A evidência para a autólise neste experimento pode ser mostrada pela variação na relação do nitrogênio protéico (NP) para o nitrogênio solúvel total (NST), mostrado pela Figura 19. A relação aumentou durante o período de fermentação indicando a ocorrência deste processo metabólico. O efeito inibidor do *starter* associado a uma maior concentração de NaCl tem um efeito negativo na atividade microbiana. O cloreto de sódio é um agente bacteriostático para a maioria das bactérias, incluindo patogênicas e deterioradoras. Entretanto, dependendo das condições de processamento, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Pediococcus* podem permanecer viáveis até 40 dias de fermentação. Isto tem sido reportado para

espécies halotolerantes importantes em alimentos fermentados, variando de forma complexa, a produção de metabólitos (FRAZIER e WESTHOFF, 1993). Pesquisando a utilização de *Lactobacillus* e *Streptococcus* na fermentação de resíduos de pescado, uma alternativa de produção para a alimentação animal, ARECHE e BERENZ (1989) demonstraram a eficácia destas bactérias lácticas associada com as mudanças nas características físico-químicas e microbiológicas deste alimento. Nas primeiras 24 horas de fermentação, os inóculos agregados em diferentes concentrações (2,5 e 10%) ocasionaram um ligeiro aumento das bases voláteis nitrogenadas (quantificadas em mg de N<sub>2</sub>/100 g amostra) e em especial a histamina. Posteriormente, as concentrações destes compostos foram diminuindo lentamente, contribuindo para a redução do nitrogênio solúvel total; um decréscimo significativo e constante durante as 300 horas de estocagem do material fermentado.

Por semelhança, os resultados relacionados com o nitrogênio solúvel total (Anexo 30) obtidos com a fermentação da sardinha, mostram um controle natural da fermentação desenvolvida pelo *Lactobacillus sakei* 2a. A atividade sugere uma reação amino-negativa, prevenindo a formação de aminas durante o processo de fermentação. A cepa parece não apresentar reação de descarboxilação de aminoácidos para a produção de aminas. Possivelmente, também reduza a atividade de bactérias descarboxilases (microbiota acompanhante ou contaminante da sardinha-verdadeira *in natura*) na formação de aminas biogênicas, contribuindo na redução do nitrogênio solúvel total.

Os riscos microbiológicos na fermentação da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) estão sempre associados à formação de histamina; amina produzida através da descarboxilação da histidina pela histidina-decarboxilase, a exemplo de outras espécies (atuns). SILVA et al. (1998), estudando os efeitos da temperatura de estocagem na formação de histamina em atuns (*Thunnus obesus* e *katsuwonus pelamis*), constataram a formação desta escombrotóxina em níveis considerados elevados (>30 mg/100g), quando estas espécies foram estocadas durante 1, 3 e 6 dias, entre 4 e 22 °C. A enumeração dos microrganismos formadores de histamina aumentou durante a estocagem entre 4 e 10 °C e diminuiu com a temperatura de referência equivalente a 4 °C. Relacionado ainda com a formação de aminas biogênicas, HUSS (1992) constatou o significativo efeito dos condimentos na redução da histamina através do eugenol e do aldeído cinâmico, presentes nos óleos essenciais do cravo-da-índia e da canela. Os resultados reforçaram a tese de

que estes compostos possuem uma ação inibidora na síntese das descarboxilases com uma justificativa bastante provável para a obstrução da formação de aminas. A incorporação destes condimentos na elaboração de produtos de pescado é um efetivo meio para o controle de produção de aminas por microrganismos.

BUCKENHÜSKES (1993) ao adotar critérios de seleção para a utilização de bactérias láticas em alimentos, menciona que a ocorrência de aminas biogênicas é previsível em todos os produtos fermentados e em especial aqueles que são produzidos por uma microbiota indefinida. Menciona ainda que, a seleção de um cultivo iniciador apropriado reduzirá a formação destas aminas biogênicas. Este autor, em um experimento de fermentação com a aplicação de *L. plantarum* (cultivo iniciador comercial) na concentração de  $2 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, mostrou uma significativa redução na cinética de formação da putrescina, tiramina, cadaverina e histamina.

ROIG-SAGUÉS e EEROLA (1997) estudando a formação de bases aminadas em carne picada, inoculada com *Lactobacillus sakei*, mostraram que o efeito do cultivo iniciador é dependente da presença de microrganismos descarboxilases presentes na matéria-prima e os efeitos são diferentes para cada amina produzida. Conforme MAIJALA et al. (1995) citados por ROIG-SAGUÉS e EEROLA (1997), um dos maiores efeitos está relacionado com o *Pediococcus cerevisae* (starter amino-negativo) na prevenção da formação de aminas biogênicas por microrganismos proteolíticos ou descarboxilantes.

Um outro comportamento foi observado na pesquisa associada com o processamento do *bakasang*, um tradicional molho de peixe fermentado da Indonésia (IJONG e OHTA, 1996). Neste estudo foram examinadas as características químicas, físicas e microbiológicas do *bakasang*, de maneira a promover uma melhoria das qualidades deste tradicional produto. A pesquisa favoreceu a comparação dos efeitos da fermentação obtida por simples e complexas misturas de culturas durante o processamento e o efeito nas características do produto acabado. As espécies (microrganismos) envolvidas são influenciadas pela composição da mistura durante a fermentação e normalmente se constituem de halófilas e bactérias láticas. O processo de fermentação mostrou o aumento do nitrogênio solúvel (molho), como uma vantagem adicional relacionada com o aumento do valor nutritivo do produto associado à preservação. O nitrogênio solúvel total (NST) de todas as amostras filtradas aumentou com o tempo de fermentação e,

as mudanças no conteúdo total de nitrogênio protéico (NP) apresentaram similaridade em relação às variações do NST.

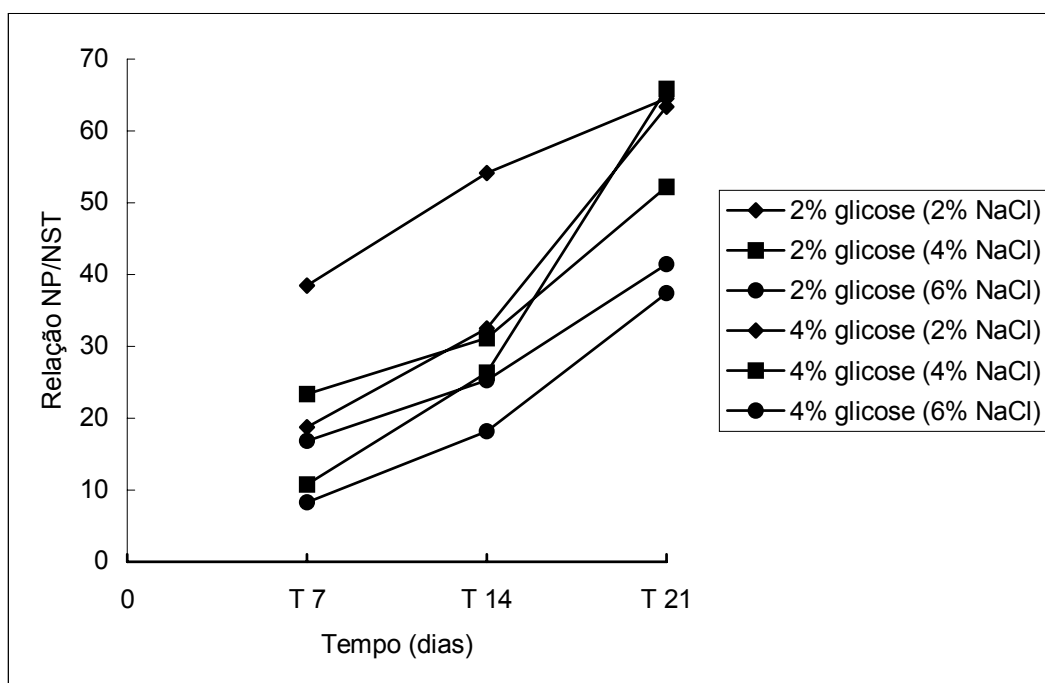


Figura 19: Evidência da autólise durante a fermentação da sardinha – verdadeira (*Sardinella brasiliensis*).

Amostras contendo  $100 \text{ g kg}^{-1}$  NaCl mostraram valores maiores de NP do que aquelas contendo  $200 \text{ g kg}^{-1}$  NaCl e glicose. Uma maior adição de glicose, de  $50 \text{ g kg}^{-1}$  para  $100 \text{ g kg}^{-1}$  não mostrou efeito significativo sobre o nível de NP e NST. O aumento do conteúdo de NP e a relação NP: NST durante o processamento do *bakasang* também foi atribuído ao efeito da autólise e degradação microbiana do músculo do peixe. A indução da deterioração bacteriana pela autólise resulta na descarboxilação de aminoácidos, produzindo aminas biogênicas, reduzindo o valor nutritivo do pescado de modo significativo (FAO, 1995).



### 4.3.5 Avaliação sensorial

A Tabela 9 representa a média dos valores atribuídos pelos julgadores, referente a análise sensorial dos filés de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) submetidos a fermentação com *L. sakei* 2a, glicose e NaCl.

Tabela 9: Médias dos valores atribuídos pelos julgadores na análise sensorial dos filés de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) submetidos a fermentação com *L. sakei* 2a, glicose e NaCl

Amostras	Atributos			
	Cor	Odor	Sabor	Textura
( I ) 2% Gli - 2% NaCl	4,85	6,48	6,93	3,83
( II ) 2% Gli - 4% NaCl	5,10	6,76	7,48	6,66
( III ) 2% Gli - 6% NaCl	5,30	3,83	6,39	6,52
( IV ) 4% Gli - 2% NaCl	5,24	4,88	6,80	3,25
( V ) 4% Gli - 4% NaCl	6,27	4,38	7,46	6,94
( VI ) 4% Gli - 6% NaCl	4,70	4,37	5,62	7,52

Gli = glicose; NaCl = cloreto de sódio

Seguindo-se a análise, efetuou-se uma representação multidimensional (Figura 20), realizado com os atributos de cor, odor, sabor e textura.

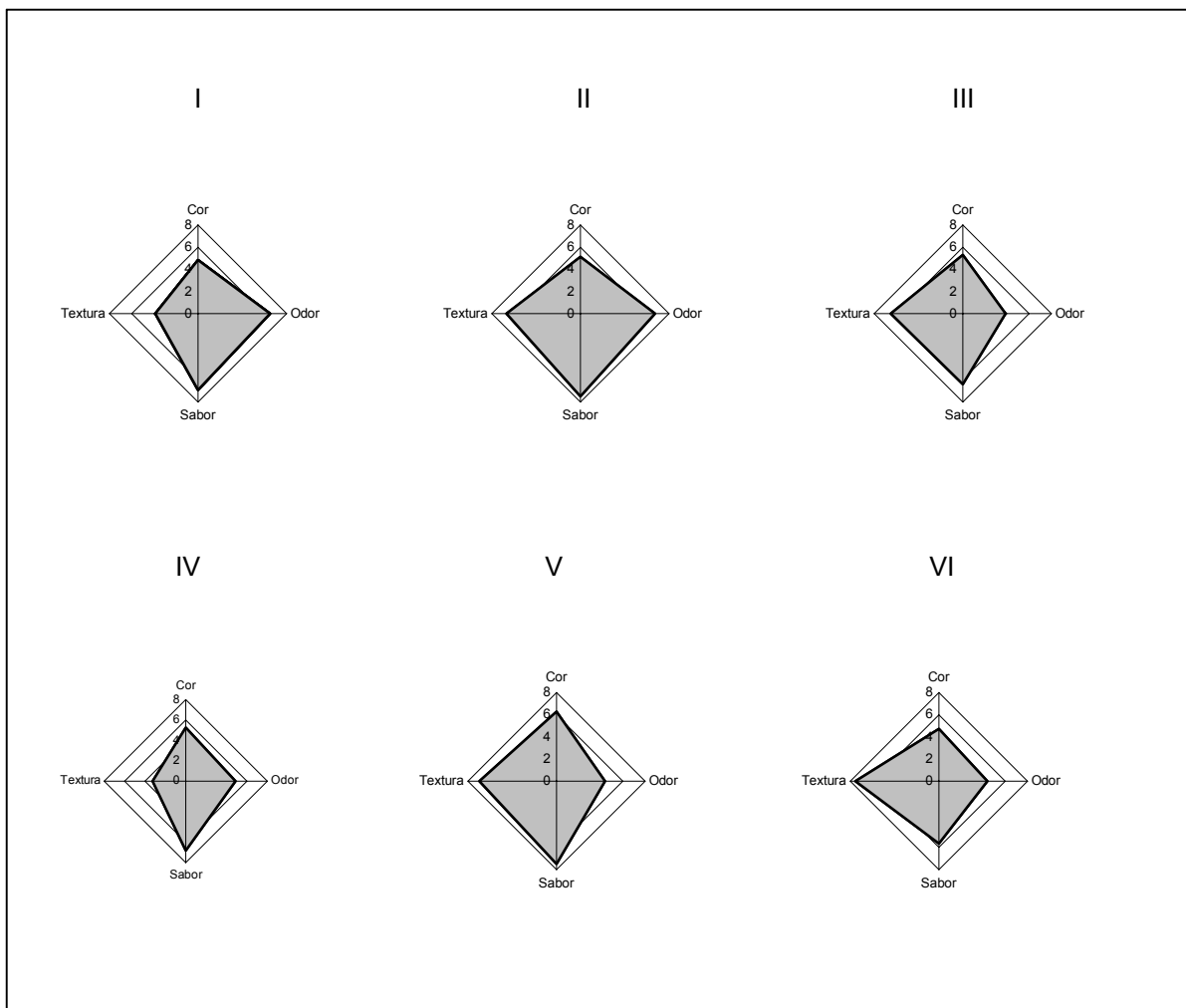


Figura 20: Variação organoléptica das amostras de sardinha fermentada, inoculadas com *Lactobacillus sakei* 2a. Amostras: I - 2% glicose e 2% NaCl; II - 2% glicose e 4% NaCl; III - 2% glicose e 6% NaCl; IV - 4% glicose e 2% NaCl; V - 4% glicose e 4% NaCl; VI - 4% glicose e 6% NaCl. Propriedades organolépticas: cor; odor; sabor; textura.

O perfil sensorial descritivo dos atributos indica que o tratamento com melhores características nas condições operacionais da fermentação com o *Lactobacillus sakei* 2a é aquele em que foi utilizado 2% glicose e 4% NaCl, referente a amostra II (Figura 20). Com este tratamento, os filés de sardinha obtiveram os melhores resultados para os atributos odor e sabor, fatores qualitativos referenciais importantes para a aceitabilidade do produto. Outro atributo importante, como a textura, mesmo

apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos outros atributos (cor, odor e sabor), mostrou uma representação gráfica de pouca relevância. Com relação a textura, o tratamento com 4% glicose e 6% NaCl foi o que apresentou a maior média (7,52), próxima da identificada como a de melhor qualidade (textura elástica e succulenta). Algumas mudanças organolépticas, associadas a cor e odor, somente foram observadas após 3 dias de fermentação. Esta verificação demonstra a elevada especificidade da capacidade de fermentação das bactérias lácticas, especialmente se o substrato e o experimento for variável.

Os valores de “p” (Tabela 10) mostram diferenças significativas entre as amostras para o atributo textura ( $p \leq 0,05$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre amostras para os atributos cor, odor e sabor.

Tabela 10: Teste LSD (*Least Significant Difference*) - Valores de  $p^*$  amostras

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
	3,830846	6,666667	3,258707	6,949627	6,520523	7,527985
( I ) 2% Gli - 2% NaCl		0,022845	0,628113	0,024924	0,050074	0,009132
( II ) 2% Gli - 4% NaCl	0,022845		0,007451	0,830003	0,911674	0,515101
( III ) 2% Gli - 6% NaCl	0,628113	0,007451		0,009234	0,019565	0,003202
( IV ) 4% Gli - 2% NaCl	0,024924	0,830003	0,009234		0,766402	0,689073
( V ) 4% Gli - 4% NaCl	0,050074	0,911674	0,019565	0,766402		0,487313
( VI ) 4% Gli - 6% NaCl	0,009132	0,515101	0,003202	0,689073	0,487313	

Gli = glicose; NaCl = cloreto de sódio

\*Nível de significância:  $p \leq 0,05$

GELMAN et al. (2001) avaliando bactérias lácticas e, entre elas, o *Lactobacillus mesenteroides* como cultivo iniciador para a elaboração de novos produtos de pescado, constatou mudanças organolépticas positivas após 3 semanas de fermentação de filés de atum (*Thunnus albacares*). Após este tempo, as amostras de pescado adquiriram

textura elástica e suculenta, sabor e odor característicos e coloração rosada. Após 44 dias de fermentação, as amostras começaram gradualmente a se deteriorarem; a textura mostrou uma perda significativa da elasticidade e uma diminuição da intensidade do aroma característico de produto fermentado. A cor e o sabor mantiveram-se inalteráveis até o final da fermentação. Estudando a fermentação de atum (*Thunnus albacares*) com inóculos de *P. pentosaceus*, obtiveram um produto final com uma textura muito rígida e nenhuma característica aceitável para os atributos relacionados com a cor e odor.

Estes resultados com pescado não foram confirmados por outros pesquisadores (LUCKE, 1996) quando utilizaram *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* em operações de fermentação.

PALUDAN-MÜLLER et al. (2002) estudaram o efeito de diferentes concentrações salinas na redução do pH, crescimento da microbiota láctica e variações sensoriais (odor) durante a fermentação do *plaa-som*, um produto de pescado obtido através da fermentação da espécie de água doce conhecida popularmente como cabeça de cobra (*Channa striatus*). Durante a fermentação foram isoladas várias cepas de bactérias ácido lácticas (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus alimentarius*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *Weisella confusa* e *Lactococcus garviae*) e algumas leveduras, entre elas, as predominantes *Zigosaccharomyces rouxii* e *Zigosaccharomyces baillii*. Estes pesquisadores utilizaram arroz cozido (80 g/750 g de peixe) como carboidrato fermentecível e várias concentrações salinas (6, 7, 9 e 11% NaCl). Eles observaram um retardamento da fermentação do *plaa-som* quando foi utilizado 9% NaCl, devido à inibição do crescimento das bactérias lácticas. O crescimento da *Z. rouxii* não teve influência na relação de fermentação, mas contribuiu positivamente para o desenvolvimento do odor do produto. O processamento do *plaa-som* apresentou um crescimento acentuado de leveduras e bactérias lácticas e, isto é devido aos baixos teores salinos utilizados se comparados com os molhos de soja fermentados produzidos no Japão que contêm concentrações mais elevadas (15 - 20% NaCl), inibindo o aumento desta microbiota. Estes microrganismos são, comprovadamente, um dos fatores mais importantes na contribuição das variações de sabor destes produtos.

De acordo com estes pesquisadores, *Z. rouxii* é uma espécie de levedura causadora da deterioração da maioria dos produtos alimentícios com elevada concentração de açúcar como doces, geléias e frutas desidratadas. Contrastando, *Z. rouxii* é importante para o desenvolvimento do aroma na produção de molhos (soja) fermentados e pastas comestíveis.

#### 4.4 Sugestões para futuros trabalhos

- Caracterizar a bacteriocina produzida pelo *L. sakei* 2a, identificando as semelhanças com outras bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas como: lactocina S produzida pelas linhagens *L. sakei* L45, 148 e V8, sakacina A (*L. sakei* Lb 706), sakacina K (*L. sakei* CTC494), sakacina P (*L. sakei* LTH673), sakacina 674 (*L. sakei* Lb674) e bavaricina MN (*L. sakei* MN).
- Comparar a potencialidade da bacteriocina produzida pelo *L. sakei* 2a com a nisina A e a pediocina, com atividade inibitória na germinação de esporos do *C. botulinum* e antagônica com *L. monocytogenes*.
- Avaliar a sensibilidade de microrganismos patogênicos (*S. aureus*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *E. coli* O157: H7) à bacteriocina produzida pelo *L. sakei* 2a.
- Determinar a natureza protéica da bacteriocina com a utilização de enzimas proteolíticas ( $\alpha$ -quimotripsina, tripsina, pronase E, pepsina, proteinase K e XIV).
- Estudar as características bioterapêuticas e mecanismos de ação do *L. sakei* 2a, (controle da imunidade, redução do colesterol, controle de artrites reumatóides, prevenção do câncer, redução dos efeitos com relação à intolerância a lactose, redução de dermatites atópicas e eliminação de infecções do trato urinário), considerando a necessidade da utilização de métodos naturais para a manutenção da saúde humana.
- Estudar o uso mais extensivo da bacteriocina produzida pelo *L. sakei* 2a: isolamento, segurança, eficácia e interação com outros componentes alimentares, sistemas de preservação, mecanismos de ação, métodos de aplicação, perdas nutricionais e sensoriais e a influência na qualidade dos produtos que sofrem a ação deste microrganismo.
- Avaliar a atividade lipolítica do *L. sakei* 2a através de variáveis como pH, temperatura e concentração de NaCl.
- Estudar o efeito do *L. sakei* 2a como cultura amino-negativo, na redução da formação de aminas biogênicas, como: histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina e cadaverina.

- Pesquisar os parâmetros de fermentação (pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio e nitrito de sódio) associados às variedades de carboidratos fermentescíveis (sacarose e amidos, como de mandioca e batata).
- Pesquisar *L. sakei* 2a na produção de molhos fermentados para serem utilizados como acentuador de sabor.

## 5 CONCLUSÕES

- Em termos de comportamento e identificação e, de acordo com a caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica, a cepa isolada de *Lactobacillus sakei* 2a mostrou resultados compatíveis e semelhantes com a descrição do *Lactobacillus sakei*, do grupo das bactérias lácticas acidúricas produtoras de ácido láctico, Gram-positivas, catalase negativas e microaerófilas.
- A bactéria ácido láctica *Lactobacillus sakei* é produtora de bacteriocinas. A produção, através da técnica por difusão em poços, foi evidenciada através da formação de halos de clareamento em torno do inóculo da cepa produtora (*Lactobacillus sakei* 2a), com conseqüente inibição do microrganismo indicador (*Listeria monocytogenes* Scott A).
- A pesquisa conclui que a fermentação da sardinha-verdadeira é passível de ser obtida com o auxílio do *Lactobacillus sakei* 2a. Durante a fermentação e, com o auxílio da glicose (carboidrato fermentescível), a cepa demonstrou uma significativa eficiência na redução do pH e aumento da acidez devida a produção de ácido láctico.
- O estudo indica um grande efeito antagônico do *L. sakei* 2a sobre a microbiota deterioradora no processo de fermentação. Com 21 dias de incubação, quando a contagem das bactérias lácticas atingiu  $10^{13}$  a  $10^{15}$  UFC g<sup>-1</sup>, a enumeração das bactérias deterioradoras (PCA) apresentou uma redução de até 3 ciclos logarítmicos após significativo aumento desta microbiota nos primeiros 14 dias de fermentação. Este resultado mostra o efeito antagônico desenvolvido pela cepa.
- O processo de fermentação mostra o aumento do nitrogênio protéico no sobrenadante à medida que aumenta o tempo de fermentação e, é equivalente ao teor de NaCl utilizado e se mostrou independente do teor de glicose utilizado (2 e 4%). Amostras produzidas com 2% NaCl mostraram menor autólise que aquelas com 6%. A adição de um maior conteúdo de NaCl tem um efeito negativo na atividade microbiana. O aumento do conteúdo de nitrogênio protéico é atribuído ao efeito metabólico representado pela combinação da autólise e proteólise envolvida. A evidência para a autólise neste experimento pode ser mostrada pela mudança na relação entre o nitrogênio protéico (NP) e o nitrogênio solúvel total (NST).



- Com relação aos atributos sensoriais avaliados (cor, odor, sabor e textura) não houve diferença estatisticamente significativa entre os atributos cor, odor e sabor. Somente o atributo textura mostrou diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os diferentes tratamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; ROMBOUITS, F.M.; HUGENHOLTZ, J.; GUIHARD, G.; LETELLIER, L.. Mode de action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1962-1968, 1994.

\_\_\_\_\_ ; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.2, p.169-185, 1995.

ADAMS, M.R.; COOKE, R.D.; TWIDDY, D.R. Fermentation parameters involved in the production of lactic acid preserved fish-glucose substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.22, n.2, p.105-114, 1987.

\_\_\_\_\_ ; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, Oxford, v.8, n.5/6, p.227-239, 1997.

ALLISON, G.E.; WOROBO, R.W.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T.R. Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1371-1377, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington, 1992. 1219p.

AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blücher, 1983. 227p.

ARECHE, T. N.; BERENZ, Z. Ensilado de residuos de pescado por bacterias del yogur. **Boletín de Investigación - Instituto Tecnológico Pesquero del Perú**,

Callao, v.3, p.26-36, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO - ABIA. **Compêndio da legislação de alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos.** v.1/A, p.3.152, 3.161, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR6022:** apresentação de artigos em publicações periódicas. Rio de Janeiro, 1994.

\_\_\_\_\_. **NBR6023:** Informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2000.

\_\_\_\_\_. **NBR6024:** numeração progressiva das seções de um documento. Rio de Janeiro, 1989.

\_\_\_\_\_. **NBR6027:** sumário. Rio de Janeiro, 1989.

\_\_\_\_\_. **NBR6028:** resumos. Rio de Janeiro, 1990.

\_\_\_\_\_. **NBR6029:** apresentação de livros. Rio de Janeiro, 1993.

\_\_\_\_\_. **NBR10520:** Informação e documentação – apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 2001.

\_\_\_\_\_. **NBR12225:** títulos de lombada. Rio de Janeiro, 2002.

\_\_\_\_\_. **NBR14140.** Alimentos e Bebidas – Análise sensorial – Teste de análise descritiva quantitativa (ADQ). CE-13:014.01 - Comissão de estudos de análise sensorial. Rio de Janeiro, 1998.

\_\_\_\_\_. **NBR14141.** Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. CB-13-Comitê brasileiro de alimentos e bebidas. CE-13: 014.01 – Comissão de estudos de análise sensorial. Rio de Janeiro, 1998.

\_\_\_\_\_. **NBR14724**: Informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed., Washington, 1995. 1141p.

AXELSSON L.; HOLCK, A.; BIRKELAND, S.E.; AUKRUST, T.; BLOM, H. Cloning and nucleotide of a gene from *L. sake* LB706 necessary for sakacin A production and immunity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.2868 - 2875, 1993.

AYMERICH, M.T; HUGAS, M.; MONFORT, J.M. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Science and Technology International**, New York, v.4, n.3, p.141-158, 1998.

AYMERICH, M.T.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; VOGEL, R. F.; MONFORT, J. M. Eletrotransformation of meat lactobacilli. Effect of several parameters on their efficiency of transformation. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.75, p.320-325, 1993.

\_\_\_\_\_. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilesterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1676-1682, 1996.

BAGGIO, J.H. Déficit da produção de sardinhas supera 40 mil t. **Gazeta Mercantil**. Florianópolis, 27 junho 2000. Caderno Economia - Santa Catarina, p.5.

BATISTA, C.R.V.; DAMIAN, C.; PETRUS, J.C.C.; ESPIRITO SANTO, M.L.P. Utilização de nisina em produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.293, p.18-25, 2001.

BEIRÃO, L.H. **Parâmetros de avaliação da maturação da sardinha (*Sardinella brasiliensis*) no processo de anchovagem**. Campinas, 1988. 99p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas.

BENOIT, V.; MATHIS, R.; LEFEBVRE, G. Characterization of brevicin 27, a bacteriocin synthesized by *Lactobacillus brevis* SB27. **Current Microbiology**, New York, v.28, n.3-61, 1994.

BERRY, E.D.; HUTKINS, R.W.; MENDIGO, R.W. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control postprocessing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, p.681-686, 1991.

BERTULLO, V.H. **Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 538p.

BHUNIA, A.K.; JOHNSON, M.C.; RAY, B.; KALCHAYANAND, N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. **Journal of Applied Bacteriology**, London, n.70, p.25-30, 1991.

BORGSTROM, G. **Fish as food**. London: Academic Press Inc., v.3, p.195-217, 1965.

BOTTA, J.R.; KENNEDY, K.M.; KICENIUK, J.W.; LEGROW, J. Importance of redfeed level, fish size and roe content to the quality of roe capelin. **International Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.27, p.93-98, 1992.

BRANDÃO, M.L.C.C.; FURLANETTO, S.M.P. Determinação quantitativa de alguns grupos de microrganismos em sardinhas (*Sardinella aurita*), vendidas em mercados e feiras livres do município de São Paulo, 1978. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo, v.4, n.2, p.158-180, 1984.

BRAVERMAN, J.B.S. **Introducción a la bioquímica de los alimentos**. México: El Manual Moderno S.A., 1976. 358p.

BREMNER, H.A.; HALLETT, I.C. Muscle fiber-connective tissue junctions in the blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). A scanning microscope study. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.975-980, 1985.

BROCK, T.D. **Biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 5<sup>a</sup> ed., p.697-704, 1974.

BUCKENHÜSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **Microbiology Reviews**, Washington, v.12, p.253-272, 1993.

CAMPANINI, M.; PEDRAZZONI, I.; BARBUTI, S.; BALDINI, P. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.20, p.169-175, 1993.

CARVAJAL, G. Peligros reales de *Listeria* en productos pesqueros. **Infopesca Internacional**, Montevideo, n.4, p.34-38, 2000.

CHIBA, A.; HAMAGUCHI, M.; KOSAKA, M.; TOKUNO, T.; ASAI, T.; CHICHIBU, S. Quality evaluation of fish meat by phosphorus-nuclear magnetic resonance. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, p.660-664, 1991.

CHIKINDAS, M.L.; GARCIA-GARCERA, M.J.; DRIESSEN, A.J.M.; LEDEBOER, A.M.; NISSEN-MEYER, J.; NES, I.F.; ABEE, T.; KONINGS, W.N.; VENEMA, G. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.3577-3584, 1993.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P. **Introducción a la Bioquímica y**

**tecnología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1977. 404p.

CHUNG, K.; DICKSON, J.S.; CROUSE, J.D. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1329-1333, 1989.

CINTRA, L. Nam Pla. **Cultura culinária**, São Paulo. Disponível em <[http://www.terra.com.br/culinaria/lcintra/cultura\\_08 .htm](http://www.terra.com.br/culinaria/lcintra/cultura_08.htm). Acesso em 22 ago. 2002.

COLLINS, E.B.; ARAMICK, K. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, p.353, 1980.

COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS TÉCNICAS PARA ALIMENTOS - CNNPA. PORTARIA Nº1 DINAL/MS 28/01/87. **Normas técnicas**. São Paulo, 1987.

CONNELL, J.J. **Advances in fish science and technology**. Aberdeen: Fishing News Books Ltd., p.86-152, 1979.

COVENTRY, M.J.; GORDON, J.B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HICKEY, M.W.; HILLIER, A.J.; WAN, J. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.83, n.2, p.248-258, 1997.

CUTTER, C.N.; SIRAGUSA, G.R. Descontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. **Food Microbiology**, London, v.11, p.481-489, 1994.

DAESCHEL, M.A.; KLAENHAMMER, T.R. Association of 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p.1538, 1985.

\_\_\_\_\_. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, Chicago, v.43, p.164-167, 1989.

DAVIS, M.J.; COOTE, P.J.; O'BYRNE, C.P. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* : the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. **Microbiology**, Washington, v.142, p.2975-2982, 1996.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G..M. Inhibition of foodborne by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp and *Lactobacillus sake* isolated from "lingüiça frescal". **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, n.4, p.284-287, 1997.

DJIEN, K. Useful role of moulds in foods. In: SAMSON, R.A. & VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S. **Introduction to foodborne fungi**. Baarn: Central Bureau Voor Schimmelcultures, p.274-283, 1988.

DRIESSEN, A.J.M; VAN DEN HOOVEN, H.W.; KUIPER, W.; VAN DE KAMP, M.; HAHN, H.G.; KONINGS, R.N.H.; KONINGS, W.N. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. **Biochemistry**, New York, v.34, p.1606-1614, 1995.

EDWARDS, R.A.; DAINITY, R.H.; HIBBARD, C.M. Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strains during growth on been stored in air at chill temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.62, p.403-412, 1987.

EINARSSON, H.; LAUZO, H.L. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.669-676, 1995.

ERIKSSON, C. Lactic acid bacteria and vegetable, cereal, meat and fish fermentations. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, London, v.51, p.553-556, 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Quality and quality changes in fresh fish**. Roma, 1995. 195p.



\_\_\_\_\_. **Manual de técnicas para laboratório de nutrición de peces y crustáceos. Programa cooperativo gubernamental**, Mexico, 1993. 104p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Bacteriological analytical manual**. 8 ed. Washington, 1995.

FRAZIER, W.C; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FUCHS, R.S.; REILLY, P.J.A. The incidence and significance of *Listeria monocytogenes* in seafoods. In: HUSS, H.H.; JAKOBSEN, M.; LISTON, J. **Quality assurance in the fish industry**. Copenhagen: Elsevier, p.217-229, 1992.

GELLI, D.S. Enfermedades transmitidas por alimentos. In: CURSO DE ANÁLISE DE RISCOS E CONTROLE DE PONTOS CRÍTICOS, 1997, Brasília/DF. **Palestras...** Brasília: MAA/CRH, 1994. p.1-31.

GELMAN, A.; DRABKIN, V.; GLATMAN, L. Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from lightly preserved fish products, as starter cultures for new fish-based food products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Beit Dagan, v.1, p. 219-226, 2001.

GIBSON, D.M. Pathogenic microorganisms of importance in seafood. In: HUSS, H.H.; JAKOBSEN, M.; LISTON, J. **Quality assurance in the fish industry**. Copenhagen: Elsevier, p.197-209, 1991.

GODOY, M.P. **Peixes do estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Ed. UFSC, 1987. 589p.

GOLBERG, I.; WILLIAMS, R. **Biotechnology and food ingredients**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 577p.

GONZÁLES-FERNANDEZ, C.; SANTOS, E.M.; JAIME, I.; ROVIRA, I. Utilización de

cultivos iniciadores en la elaboración de chorizo y su influencia en las propiedades sensoriales. **Food Science and Technology International**, New York, v.3, n.1, p. 31-42, 1997.

GORY, L.; MONTEL, M.C.; ZAGOREC, M. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters**, Amsterdam, v.194, n.2, p.127-133, 2001.

GRAIKOSKI, J.T. Microbiology of cured and fermented fish. In: CHICHESTER, C.O. ; GRAHAM, H.D. **Microbial safety of fishery products**. New York: Academic Press Inc., p.97-112, 1973.

GRIS, E.F.; BORTOLUZZI, R.; ESPIRITO SANTO, M.L.P.; DAMIAN, C. Produtos fermentados. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.308, p. 1-4, 2002.

HAMMES, W.P; BANTLEON, A.; MIN, S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. **Microbiology Reviews**, Washington, n.87, p.165-174, 1990.

\_\_\_\_\_; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, London, n.49, n.1, p.125-138, 1998.

HARADA, M.M. Marinado da carne de aves. **Boletim de Conexão Industrial do Centro de Tecnologia de carnes do Itai**, v.11, n.4, p. 1-3, jul.-ago. 2001.

HARDING, C.D.; SHAW, B.G. Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.69, p.648-654, 1990.

HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, p.3784-3787, 1989.

\_\_\_\_\_ ; FLEMING, H.P.; KLAENHAMMER, T.R. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n.58, p.1477-1483, 1992.

HOOVER, D.G.; HARLANDER, S.K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. New York: Academic Press Inc., p.23-39, 1993.

HUANG, C.C; LIN, C.W. Change in quality of chinese-style sausage inoculated with lactic acid bacteria during storage at 3 °C and 25 °C. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.11, p.1227-1233, 1995.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T; MONFORT, J.M. Biochemical characterization of lactobacilli isolated from dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.18, p.107-113, 1993.

\_\_\_\_\_. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC 494. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.79, p.322-330, 1995.

\_\_\_\_\_. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, London, v.49, n.1, p.139-150, 1998.

\_\_\_\_\_. MONFORT, J.M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, Oxford, v.59, n.4, p.547-554, 1997.

HUSTIN, H.O. Biochemical deterioration of fish muscle. In: INTERNATIONAL CONFERENCE, 1, 1991, Copenhagen. **Anais...Copenhagen**, 1991. p.125-138.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Atuns e afins e da sardinha: relatório da V reunião do Grupo Permanente de Estudos (GPE) sobre atuns e afins, realizada no período**

de 10 a 14 de dezembro de 1990, e, Itajaí, SC, e relatório da VI reunião do grupo permanente de estudos (GPE) de atuns e afins, realizada no período de 22 a 25 de outubro de 1991, em Tamandaré, PE. Brasília: IBAMA, 1994. p. 61-201 (Coleção Meio Ambiente. Série Estudos - Pesca, 11).

\_\_\_\_\_. **Relatório preliminar da reunião do Grupo Permanente de Estudos (GPE) da sardinha, realizada no período de 23 a 27 de setembro de 1991.** Brasília: IBAMA, 1992, 44p. (Coleção Meio Ambiente. Série Estudos - Pesca, 4).

IJONG, F.G.; OHTA, Y. Physicochemical and microbiological changes associated with bakasang processing - A traditional indonesian fermented fish sauce. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.71, n.1, p.69-74, 1996.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Gases as preservatives.** In: **Microbial Ecology of Foods.** New York: Academic Press Inc.,v.1, p.170-192, 1980.

\_\_\_\_\_. **Microorganisms in foods: their significance and methods for enumeration.** 3<sup>a</sup> ed., Toronto, 1990.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/DIS 3972. **Sensory analysis – Determination of sensibility of taste.** Geneva, 1993.

\_\_\_\_\_. ISO/DIS 5492. **Sensory analysis – Vocabulary.** Geneva, 1993.

\_\_\_\_\_. ISO/DIS 8586-1. **Sensory analysis general guidance for the selection, training and monitoring of assessors – part 1: selected assessors.** Geneva, 1993.

IWAMOTO, M.; YAMANAKA, H.; WATABE, S.; HASHIMOTO. Effect of storage temperature on *rigor mortis* and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, p.6, 1987.

JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1978. 491p.

\_\_\_\_\_. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.525, 1982.

KAI, M.; MORAIS, C. Vias de deterioração do pescado. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Campinas. **Anais...**Campinas; UNICAMP, p.13-20, 1988.

KEARNEY, L.; UPTON, M.; LOUGHLIN, A. Meat fermentations with immobilized lactic acid bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**. Dublin, v.33, p.648-651, 1990

KEKESY, D.A.; PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. **Applied Microbiology Biotechnology**. Dublin, v.20, p.282-283, 1970.

KELLY, W.J.; ASMUNDSON, R.V.; HUANG, C.M. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, p.209-218, 1996.

KENNEALLY, P.M.; LEUSCHNER, R.G.; ARENDT, E.K. Evaluation of the lipolytic of starter cultures for meat fermentation purposes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.5, p.839-846, 1998.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Microbiology Reviews**, Washington, v.12, p.39-86, 1993.

KNAUF, H.J.; VOGEL, R.F.; HAMMES, W.P. Cloning, sequence and phenotypic expression of KatA, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.832-839, 1992.

KORHONEN, R.W.; LANIER, T.C. An evaluation of simple methods for following rigor

development in fish. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, p.2, 1990.

LANIER, T.C.; LEE, C.M. **Surimi technology**. New York: Marcel Dekker, Inc, p.201-203, 1992.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL - LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1981. 94p.

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.1683-1688, 1991.

\_\_\_\_\_ ; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.13, p.145-150, 1991.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial - Revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza: Acribia, 1994. 428p.

LISTON, J. Microbiology in fishery science. In: CONNELL, J.J. **Advances in fish science and technology**. Aberdenn: Fishing News Books Ltd., p.138-157, 1979.

\_\_\_\_\_. Fish and shellfish and their products. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROORGANISMS SPECIFICATIONS FOR FOODS, **Microbial ecology of foods**, Vol II., New York: Academic Press Inc., p.567-605, 1980.

LUCKE, F.K. Lactic acid bacteria involved in food fermentations and their present and future uses in food industry. In: BOLOGLU, F.; RAY, B. **Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications**. Heideberg: Springer-Verlag, p.81-99, 1996.

MACHADO, Z.L. **Tecnologia de recursos pesqueiros: parâmetros, processos, produtos**. Recife: Star, 1984. 277p.

MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO. Darmstadt: Merck, 1994. 364p.

MARUGG, J.D.; GONZÁLEZ, C.F.; KUNKA, B.S.; LEDEBOER, A.M.; PUCCI, M.J.; TOONEN, M.Y.; WALKER, S.A.; ZOETMULDER, L.C.M.; VANDENBERG, P.A. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2360-2367, 1992.

MAZO, J.Z. **Detecção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN em melão de cana-de-açúcar sob fermentação submersa**. Florianópolis, 1999. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

MEIGLGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Florida: CRC Press, INC, 1991. 235p.

MING, X.; WEBER, G.H.; AYRES, J.W. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.6, p.413-415, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – MS/SVS. **Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Portaria nº 451/1997. Diário Oficial da União, 2 de julho de 1998.p.6.

MOL, J. H.H.; HITBRINK, J.E.A.; MOLLEN, H.W.M.; TINTEREN, J. Observations on the microflora of vacuum packed sliced cooked meat products. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.34, p.377-397, 1971.

MONNET, C.; CORRIEU, G. Selection and properties of lactobacillus mutants producing  $\alpha$ -acetolactate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.8, p.2096-2102, 1998.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, p.557-577, 1997.

MOORE, J.E.; MADDEN, R.H. Preservation of vacuum-packaged pork liver paté by fermentation. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.7, p.791-794, 1997.

MORENO, I; LERAYER, A. L.S.; LEITÃO, M.F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p.130-136, 1999.

MORTVEDT-ABILDGAARD, C.I.; NISSEN-MEYER, J.; JELLE, B.; GRENOV, B.; SKAUGEN, M.; NES, I.F. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from lactobacillus sake L45. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.175-179, 1995.

MORZEL, M.; FRANSEN, N.G.; ELKE, K.A. Defined starter cultures used for fermentation of salmon fillets. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.6, p.1214-1218, 1997.

MULDER, J.W.M.; BOERRIGTER, I.J.; ROLLEMA, H.S.; SIEZEN, R.J.; DE VOS, W.M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **European Journal Biochemistry**, v.201, p.581-584, 1991.

MULLER, H.G.; TOBIN, G. **Nutrición y ciencia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991. 321p.

MUÑOZ, A.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation in quality control**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240p.

NETO, J.D.; DORNELLES, L.D.C. **Diagnóstico da pesca marítima do Brasil**.



Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1996. 165p.

NIELSEN, I.F.; DICKSON J.S.; CROUSE, J.D. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.2142-2145, 1990.

NUNES, M.L.; CARDINAL, M.; MENDES, R.; MORÃO CAMPOS, R.; BANDARRA, N.M.; LOURENÇO, H.; JEROME, M. Effect of season and storage on proteins and lipids sardine (*Sardina pilchardus*) minces and surimi. In: HUSS, H.H.; JAKOBSEN, M.; LISTON, J. **Quality assurance in the fish industry**. Copenhagen: Elsevier, p.73-79, 1992.

OLYMPIA, M.; ONO, H.; SHINMYO, A.; TAKANO, M. Lactic acid bacteria in a fermented fishery product "burong bangus". **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.73, n.3, p.193-197, 1992.

OSCAR, L.E.; ROSA, E.G.; ROBERTO, S.V. Sardinha madurada enlatada y su almacenamiento en refrigeración. **Boletín de Investigación - Instituto Tecnológico Pesquero del Peru**, Callao, v.3, p.54-59, 1989.

ØSTERGAARD, A.; EMBAREK, P.K.B.; WEDELL-NEERGAARD, C.; HUSS, H.H.; GRAM, L. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. **Food Microbiology**, London, v.15, n.2, p.223-233, 1998.

PALUDAN - MÜLLER, C.; MADSEN, M.; SOPHANODORA, P.; GRAM, L.; MØLLER, P.L. Fermentation and microflora of *plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, p.61-70, 2002.

PARENTE, E.; HILL, C. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, p.497-502, 1992.

\_\_\_\_\_ ; MOLES, E.; RICCIARDI, A. Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. **Journal of Food International Microbiology**, Amsterdam, v.33, n.2/3, p.231-243, 1996.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw - Hill do Brasil, 1980. 566p.

PIGOTT, G.M.; TUCKER, B.W. **Seafood – Effects of technology on nutrition**. New York: Marcel Dekker, Inc, p.32-65, 1990.

PINHEIRO, C.R. **Avaliação física, química e sensorial do pescado curado**. Campinas: UNICAMP, p.149-158, 1979.

PRICE, R.J.; LEE, J.S. Inhibition of *pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.33, p.13, 1970.

REID, G. The Scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.3763-3766, 1999.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática, roteiro e manual: bactérias e fungos**. Campinas: Atheneu, 1993. 112p.

RINGO, E.; STENBERG, E.; STROEM, A.R. Amino-acid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.47, p.1084-1089, 1984.

\_\_\_\_\_ ; GATESOUP, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v.160, n.3/4, p.177-203, 1998.

ROBINSON, D.S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991. 516p.

RODRÍGUES , J.M.; CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HORN, N.; DODD, H.M.; HERNÁNDEZ, P.E.; GASSON, M.J. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.78, p.109-115, 1995.

ROIG - SAGUÉS, A.; EEROLA, S. Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sake* starter strains and an amine-positive lactic acid bacterium. **Food Research and Technology**, New York, v. 205, n.3, p.227-231, 1997.

SABOYA, L.V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados - Uma revisão. **Boletim SBCTA**, v.31, n2, p.176-185, 1997.

SAKAI, H.; CALDO, G.A. Microbiological and Chemical Changes in *tapuy* fermentation. **Fermentation Technology**, Osaka, v.63, n.1, p.11-16, 1985.

SAMELIS, J.; ROLLER, S.; METAXOPOULOS, J. Sakacin B, bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.76, p.475-486, 1994.

SANZ, Y.; TOLDRÁ, F. Aminopeptidase activities from *Lactobacillus sake* in models of curing ingredients and processing conditions for dry sausage. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.6, p.1211-1213, 1997.

SARKAR, P.K.; BANERJEE, S. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.33, n.3, p.231-233, 1996.

SCHILLINGER, U.; KAYA, M.; LÜCKE, F.K. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.70, p.473-478, 1991.

\_\_\_\_\_ ; LÜCKE, F.K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, London, v.4, p.199-208, 1987.

\_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.8, p.1901-1906, 1989.

SILVA, C.C.G.; DA PONTE, J.B.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E. Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.4, p.644-647, 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C. A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159p.

SMITH, J.L.; PALUMBO, S.A. Microorganisms as food additives. **Journal of Food Protection**, Ames, v.44, n.12, p.936-955, 1981.

SNEATH, P.H.A. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, secção 14, p.1208-1230, 1986.

SOBRINO, O.J.; RODRÍGUEZ, J.M.; FERNÁNDEZ, M.F.; SANZ, B.; HERNÁNDEZ, P.E. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.13, p.1-10, 1991.

STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R. **General microbiology**. Hong Kong: Macmillan Press, 5<sup>a</sup> ed., p.496-501, 1995.

STATSOFT INC. **Statistica for windows [ Computer Program Manual ]**. Tulsa, OK: StatSoft Inc. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

STENSTROEM, I.M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of fish, with

special reference to *Shewanella putrefaciens*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.68, p.601-618, 1990.

STILES, M.E.; HASTINGS, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends in Food Science Technology**, Oxford, v.2, p.247-251, 1991.

STONE, H.; SIDEL, J. Descriptive analysis. In: TAYLOR, S.L. **Sensory evaluation practices**. London: Academic Press, Inc, p.216-235, 1993.

SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DA PESCA - SUDEPE. **Relatório da comissão de avaliação dos incentivos fiscais – Fiset/PESCA – Portaria P-154, de 24/07/85**. Brasília: SUDEPE, 1985. Mimeografado.

TAYLOR L.; CANN, D.D.; WELCH, B.J. Antibotulin properties of nisin in fresh fish packaged in na atmosphere of carbondioxide. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, p.953-959, 1990.

TANASUPAWAT, S.; KOMAGATA, K. Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. **Word Journal of Microbiology & Biotechnology**, Cingapura, v.11, p.253-256, 1995.

TICHACZEK, P. S.; VOGEL, R.F.; HAMMES, W. P. Cloning and sequencing of *sake P* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. **Microbiology**, Washington, v.140, p.361-367, 1994.

TRÜPER, H.G.; DE CLARI, L. Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) “in apposition”. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.3, p.908-909, 1997.

TWDDY, D.R.; CROSS, S.J.; COOKE, R.D. Parameters involved in the production of lactic acid preservaed fish-starchy substrate combinations. **International Journal of Food and Technology**, Mysore, v.22, p.115-121, 1987.

UNITED NATIONS DEVELOPMENT FUND FOR WOMEN. **Fish processing**. New York: Photosistem, p.11-45, 1988.

VALENTINE, H.; CARDOSO, R. D. Análise da pesca de sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, na costa sudeste - sul do Brasil. **Atlântica**, Rio Grande, v.13, n.1, p.45-54, 1991.

VIRULHAKUL, P. The processing of Thai fish sauce. **Infofish International**, n.5, p.49-53, 2000.

WENDAHOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Effects of spices on growth of and biogenic amine formation by bacteria in fish muscle. In: HUSS, H.H.; JAKOBSEN, M.; LISTON, J. **Quality assurance in the fish industry**. Copenhagen: Elsevier, p.217-229, 1992.

WHEATON, F.W.; LAWSON, T.B. **Processing aquatic food products**. Canada: John Wiley & Sons, 1985. 497p.

WINKOWSKI, K.; CRANDALL, A.D.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.2552-2557, 1993.

ZHANG, G.; HOLLEY, R.A. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. **Food Microbiology**, London, v.16, p.633-644, 1999.

## ANEXOS

**ANEXO 1** - Caldo para *Lactobacillus* seg. DE Man, Rogosa e Sharpe - Caldo MRS.  
(MERCK - Art. Núm. 10661)

### 1.1 Composição

Reagente	Quantidade
Peptona de caseína	10,0 g
Extrato de carne	8,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
Glicose (D+)	20,0 g
Hidrogenofosfato <i>di</i> -potássico	2,0 g
Tween 80	1,0 g
Hidrogenocitrato <i>di</i> -amônico	2,0 g
Acetato de sódio	5,0 g
Sulfato de magnésio	0,2 g
Sulfato de manganês	0,04 g
Ágar	12,0 g
Água destilada	1000 mL

Fonte: Merck, 1994.

## 1.2 Preparação

- Dissolver os ingredientes na água destilada submetendo-os ao aquecimento.
- Esterilizar em autoclave a 118 °C durante 15 min.
- pH final do meio:  $5,7 \pm 0,2$  a 25 °C.

Para a preparação do ágar MRS adicionar 1% de ágar bacteriológico.

## ANEXO 2 - Cristal Violeta para *Coloração Diferencial de Gram*

### 2.1 Composição

Reagente	Quantidade
Cristal violeta	1,0g
Ácido fênico	2,0 g
Álcool absoluto	10 mL
Água destilada	100 mL

Fonte: APHA, 1992.

### 2.2 Preparação

- Misturar o corante com o álcool e juntar aos poucos o ácido fênico.
- Misturar a água de forma a obter uma mistura homogênea.
- Filtrar após 24 horas, em papel de filtro.

## ANEXO 3 - Iodo lugol para *Coloração Diferencial de Gram*

### 3.1 Composição

Reagente	Quantidade
Iodo	1,0 g
Iodeto de potássio	2,0 g
Água destilada	300 mL

Fonte: APHA, 1992.



### 3.2 Preparação

- Triturar o iodo com o iodeto de potássio.
- Misturar com a água destilada.

Usar até 30 dias após a preparação.

## ANEXO 4 - Álcool - acetona para *Coloração Diferencial de Gram*

### 4.1 Composição

Reagente	Quantidade
Álcool	800 mL
Acetona	200 mL

Fonte: APHA, 1992.

### 4.2 Preparação

- Triturar o iodo com o iodeto de potássio.
- Misturar com a água destilada.

Usar até 30 dias após a preparação.

## ANEXO 5 - Fucsina de Ziehl diluída para *Coloração Diferencial de Gram*

### 5.1 Composição

Reagente	Quantidade
Fucsina	2,5 g
Álcool etílico	100 mL
Água destilada	90 mL

Fonte: APHA, 1992.

## 5.2 Preparação

- Dissolver a fucsina no álcool etílico.
- Juntar 10 mL da solução estoque com a água destilada.

## ANEXO 6 - Caldo VM-VP (Meio de Clark e Lubs)

### 6.1 Composição

Reagente	Quantidade
Peptona de carne	7,0 g
Glicose	5,0 g
Monofosfato de potássio	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Fonte: APHA, 1992.

### 6.2 Preparação

- Dissolver os componentes na água destilada.
  - pH do meio:  $6,9 \pm 0,1$
- Distribuir volumes de 5 mL em tubos de 13 x 100 mm.
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.
- Na leitura adicionar 1 mL:

Solução de $\alpha$ -naftol*	0,6 mL
Solução de hidróxido de potássio a 40%	0,2 mL

\*Solução de  $\alpha$ -naftol

$\alpha$ -naftol	5,0 g
álcool absoluto	100 mL

- Para cada volume de 1 mL da cultura incubada durante 48 horas, adicionar os reagentes, agitando sempre após a inclusão de cada solução.
- Deixar em repouso por 5 minutos e verificar o resultado.

## **ANEXO 7 - SIM Medium (MERCK - Art. Núm. 5470)**

### **7.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona de caseína	20,0 g
Peptona de carne	6,6 g
Citrato férrico amoniacal	0,2 g
Tiosulfato de sódio	0,25 g
Agar	3,0 g
Água destilada	1000 mL

Fonte: Merck, 1994.

### **7.2 Preparação**

- Dissolver os componentes em água destilada.
  - pH final do meio:  $7,3 \pm 0,1$ .
- Aquecer até completa dissolução.
- Distribuir volumes de 3 mL em tubos 13 x 100 mm.
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

## ANEXO 8 - Caldo Carboidrato Vermelho de Fenol

### 8.1 Composição

Reagente	Quantidade
Peptona ou Trypticase	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho de fenol	0,025 g
Carboidrato*	5,0 g
Água destilada	900 mL

\* carboidrato em teste.

Fonte: Merck, 1994.

### 8.2 Preparação

- Dissolver os componentes em água destilada, exceto o carboidrato.  
- pH final do meio:  $7,0 \pm 0,1$ .
- Distribuir volumes de 9 mL em tubos 16 x 150 mm, contendo tubos de fermentação invertidos (tubos de Durham).
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.
- Esfriar e adicionar 1 mL da solução a 5% (esterilizada por filtração) do carboidrato em teste.

## ANEXO 9 - Água peptonada 0,1% - H<sub>2</sub>O<sub>p</sub>

### 9.1 Composição

Reagente	Quantidade
Peptona	1,0 g
Água destilada	1.000 mL

Fonte: Silva *et al.* 1997.

## 9.2 Preparação

- Dissolver a peptona na água destilada.
  - pH final do meio:  $7,0 \pm 0,1$ .
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

## ANEXO 10 - Água peptonada 1% - H<sub>2</sub>Op

### 10.1 Composição

Reagente	Quantidade
Peptona	10,0 g
Água destilada	1.000 mL

Fonte: Silva *et al.* 1997.

### 10.2 Preparação

- Dissolver a peptona na água destilada.
  - pH final do meio:  $7,0 \pm 0,1$ .
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

## ANEXO 11 - Plate Count Agar - PCA (MERCK - Art. Núm.5463)

### 11.1 Composição

Reagente	Quantidade
Peptona de caseína	5,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
Glicose D(+)	1,0 g
Ágar-ágar	14,0 g

Fonte: Merck, 1994.

### 11.2 Preparação (meio desidratado)

- Dissolver 22,5 g em 1.000 mL de água destilada.
  - pH final do meio:  $7,0 \pm 0,1$ .
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

**ANEXO 12 - Lauryl Sulfate Broth - LSB (MERCK - Art. Núm.10266)****12.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Triptose	20,0 g
Lactose	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Lauril sulfato de sódio	0,1 g
Fosfato dipotássico	2,75 g
Fosfato monopotássico	2,75 g

Fonte: Merck, 1994.

**12.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver 35,5 g em 1.000 mL de água destilada. Utilizar tubos de Durham.  
- pH final do meio:  $6,8 \pm 0,1$ .
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

**ANEXO 13 - EC Broth (MERCK - Art. Núm. 10765)****13.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona de caseína	20,0 g
Lactose	5,0 g
Sais biliares	1,5 g
Hidrogenofosfato dipotássico	4,0 g
Dihidrogenofosfato potássico	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g

Fonte: Merck, 1994.

### 13.2 Preparação (meio desidratado)

- Dissolver 37,0 g em 1.000 mL de água destilada. Utilizar tubos de Durham.  
- pH final do meio:  $6,9 \pm 0,1$ .
- Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

## ANEXO 14 - Baird-Parker Agar (MERCK - Art. Núm. 5406)

### 14.1 Composição da base

Reagente	Quantidade
Triptona	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Piruvato de sódio	10,0 g
Glicina	12,0 g
Cloreto de lítio	5,0 g
Ágar	20,0 g

Fonte: Merck, 1994.

### 14.2 Preparação (meio desidratado)

- Dissolver 58,0 g em 950 mL de água destilada. Esterilizar em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}/15$  min.
- Adicionar para cada 95 mL do meio basal: 5 mL de emulsão de gema de ovo, 1 mL de solução de telurito de potássio a 1%. pH final do meio: 6,8 a 7,2.

## ANEXO 15 - Brain Heart Infusion - BHI (OXOID - CM 225)

### 15.1 Composição

Reagente	Quantidade
Infusão de cérebro de bezerro	12,5 g
Infusão de coração bovino	5,0 g
Proteose-peptona	10,0 g
Glicose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g

Fonte: Oxoid, 1994.

### 15.2 Preparação (meio desidratado)

- Dissolver 37,0 g em 1.000 mL de água destilada.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min. Esfriar até 45 °C. Para a preparação do ágar BHI, adicionar 1% de ágar bacteriológico. pH final do meio: 7,4 ± 0,2.

## ANEXO 16 - KF *Streptococcus* Agar (MERCK - Art. Núm. 10707 )

### 16.1 Composição

Reagente	Quantidade
Proteose peptona	10,0 g
Extrato de levedura	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Glicerofosfato de sódio	10,0 g
Maltose	20,0 g
Lactose	1,0 g
Azida de sódio	0,4 g
Púrpura de bromocresol (1,5 mL da sol. 1%)	0,015 g
Ágar	15,0 g

Fonte: Merck, 1994.

### 16.2 Suplemento estéril

Cloreto de trifeniltetrazólio: 100 mg/1000 mL

### 16.3 Preparação (meio desidratado)

- Dissolver 71,5 g em 1.000 mL de água destilada.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 10 min. Esfriar até 45 °C.
- Incorporar 10 mL da solução CTT 1%
  - pH final do meio: 7,2 ± 0,2

## ANEXO 17 - Lactose Broth (MERCK - Art. Núm. 7661)

### 17.1 Composição

Reagente	Quantidade
Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Lactose	5,0 g
Água destilada	1.000 mL

Fonte: Merck, 1994.



**17.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver os componentes em água destilada, aquecendo se necessário.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min.

**ANEXO 18 - Selenite Cystine Broth - SC Broth (MERCK - Art. Núm. 7709)****18.1 Composição**

Reagente	Quantidade
Peptona de caseína	5,0 g
L (-) cisteína	0,01 g
Lactose	4,0 g
Fosfato sódico	2,0 g
Hidrogenoselenito sódico	4,0 g

Fonte: Merck, 1994.

**18.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver 23,0 g em 1.000 mL de água destilada. Aquecer no máximo a 60 °C.
- Esterilizar por filtração. pH final do meio: 7,0 ± 0,2.

**ANEXO 19 - Tetrathionate Enrichment Broth - TTB (MERCK - Art. Núm. 5285)****19.1 Composição**

Reagente	Quantidade
Peptona de caseína	2,5 g
Peptona de carne	2,5 g
Sais biliares	1,0 g
Carbonato de cálcio	10,0 g
Tiosulfato de sódio	30,0 g
Iodeto de potássio	5,0 g
Iodo	6,0 g
Verde brilhante (eventual)	6,0 g

Fonte: Merck, 1994.

**19.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver 46,0 g em 1.000 mL de água destilada. Aquecer no máximo a 60 °C.
- Antes do uso adicionar 20 mL por litro, de solução de iodo-iodeto de potássio.

Não esterilizar em autoclave.

- pH final do meio:  $7,0 \pm 0,1$ .

## **ANEXO 20 - Hektoen Enteric Agar (MERCK – Art. Núm. 11681)**

### **20.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona	15,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Sacarose	14,0 g
Lactose	14,0 g
Salicina	2,0 g
Tiosulfato de sódio	5,0 g
Citrato de amônio e ferro (III)	1,5 g
Sais biliares	2,0 g
Azul de bromotimol	0,05 g
Fucsina ácida	0,08 g
Ágar-ágar	13,5 g

Fonte: Merck, 1994.

### **20.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver 75,0 g em 1.000 mL de água destilada. Não esterilizar.
- À aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$ , adicionar 15 mg de Novobiocina (esterilizada por filtração) por litro de meio de cultivo. pH final do meio:  $7,7 \pm 0,1$ .

**ANEXO 21 - Triple Sugar Iron Agar - TSI Agar (MERCK - Art. Núm. 3915)****21.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Lactose	10,0 g
D (+) glicose	1,0 g
Citrato de ferro (III) e amônio	0,5 g
Tiosulfato de sódio	0,3 g
Vermelho de fenol	0,024 g
Ágar-ágar	12,0 g

Fonte: Merck, 1994.

**21.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver 65,0 g em 1.000 mL de água destilada.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min.
  - pH final do meio: 7,4 ± 0,1.

**ANEXO 22 - Lysine Iron Agar - LIA (MERCK - Art. Núm. 11640)****22.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona de carne	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
D (+) glicose	1,0 g
Monocloridrato de L-lisina	10,0 g
Tiosulfato de sódio	0,04 g
Citrato de amônio e ferro (III)	0,5 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Ágar-ágar	12,5 g

Fonte: Merck, 1994.

**22.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver 32,0 g em 1.000 mL de água destilada.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min.
  - pH final do meio: 6,7 ± 0,1.

**ANEXO 23 - Tryptone Soya Agar (OXOID - CM 131)****23.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Triptona	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	15,0 g

Fonte: Oxoid, 1994.

**23.2 Preparação (meio desidratado)**

- Dissolver 40,0 g em 1.000 mL de água destilada. Dissolver, aquecendo à ebulição.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min. pH final do meio: 7,3 ± 0,2.

**ANEXO 24 - Caldo tripticase de soja - TSB****24.1 Composição**

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona de caseína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dipotássico	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Água destilada	1000 mL

Fonte: Neusely *et al.*, 1997.

**37.2 Preparação**

- Dissolver os ingredientes na água destilada.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 min.
  - pH final do meio: 7,3 ± 0,2.

**ANEXO 25** - Composição centesimal e valor calórico de filés de peixes marinhos por estação do ano (inverno, 1992/outono, 1993)

Espécies	Estação do ano	Composição (g/100 g)				Valor calórico (Kcal/100 g)
		Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	
Corvina ( <i>Micropogon furnieri</i> )	I	77,9	1,0	0,7	19,8	85
	P	83,8	1,0	0,5	14,5	63
	V	79,5	0,9	0,5	18,9	80
	O	77,2	1,4	0,8	20,7	90
Goete ( <i>Cynoscion petranus</i> )	I	76,3	1,1	1,1	21,6	96
	P	79,4	1,0	1,3	17,7	82
	V	80,6	0,7	0,8	17,4	77
	O	77,7	1,3	0,6	20,7	88
Peixe-porco ( <i>Balistes carolinensis</i> )	I	77,8	1,2	0,7	19,8	85
	P	78,8	1,3	0,6	19,9	85
	V	79,3	0,9	0,8	19,6	85
	O	77,0	1,2	0,5	21,5	91
Sardinha-verdadeira ( <i>Sardinella brasiliensis</i> )	I	75,5	1,5	3,4	20,2	111
	P	73,8	1,8	1,4	22,4	102
	V	75,2	1,6	1,1	21,6	95
	O	75,6	1,7	1,0	21,3	95
Tainha ( <i>Mugil spp.</i> )	I	75,0	9,6	0,9	23,7	103
	P	80,9	1,3	0,7	17,7	78
	V	76,4	1,1	0,8	21,4	93
	O	77,0	1,3	0,5	21,8	80

I: inverno, P: primavera, V: verão, O: outono.  
Fonte: Badolato et al., 1994.

**ANEXO 26 - Relação de minerais presente no pescado e em outros alimentos**

Alimentos	Na (mg/100 g)	Ca (mg/100 g)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Referências
Bacalhau <sup>a</sup>	90	15	4,8	10,5	2,5	SIDWELL, 1981
Arenque <sup>a</sup>	105	58	10,9	7,4	1,7	SIDWELL, 1981
Salmão <sup>a</sup>	42	20	9	8	4	SIDWELL, 1981
Mexilhão <sup>a</sup>	316	83	69	30	2,5	SIDWELL, 1981
Caranguejo <sup>a</sup>	330	60	52	28	5,7	SIDWELL, 1981
Ostra <sup>a</sup>	386	111	82	232	63	SIDWELL, 1981
Ostra <sup>b</sup>	106	8	68	134	1044	SIDWELL, 1981
Ostra <sup>c</sup>	111	61	76	825	602	SIDWELL, 1981
Carne <sup>a</sup>	65	9	22	-	-	SIDWELL, 1981
Carne <sup>d</sup>	-	-	-	40	-	GORDON e ROBERTS, 1977
Galinha	12	58	13	-	-	ANTHONY et al. 1983
						SIDWELL, 1981
						LAWLER e KLEVOY, 1984

Fonte: PIGOTT e TUCKER, 1990.

**ANEXO 27 - Temperatura do sobrenadante (fermentação)**

Tempo (dias)	Temperatura (°C)
1	23
2	23
3	23
4	24
5	24
6	24
7	23
8	23
9	24
10	23
11	24
12	24
13	24
14	24
15	24
16	23
17	23
18	24
19	24
20	24
21	24

**ANEXO 28** - Variação no conteúdo de nitrogênio total (mg%) durante a fermentação



da sardinha - verdadeira com *Lactobacillus sakei* 2a

Tempo (dias)	2% glicose			4% glicose		
	NaCl			NaCl		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
7	630,17	614,21	477,42	572,06	499,80	456,14
14	796,67	717,48	653,35	756,32	702,13	555,20
21	867,72	784,32	766,86	949,92	764,75	625,35

Obs: Os resultados correspondem à média de três repetições.

**ANEXO 29** - Variação no conteúdo de nitrogênio protéico (mg %) durante a fermentação da sardinha – verdadeira com *Lactobacillus sakei* 2a

Tempo (dias)	2% glicose			4% glicose		
	NaCl			NaCl		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
7	614,21	588,98	450,62	543,16	457,35	407,01
14	782,22	695,20	628,48	733,74	676,47	526,30
21	854,47	769,57	748,80	935,17	753,31	609,09

Obs: Os resultados correspondem à média de três repetições.

**ANEXO 30** - Variação no conteúdo de nitrogênio solúvel total (mg %) durante a fermentação da sardinha – verdadeira com *Lactobacillus sakei* 2a

Tempo (dias)	2% glicose			4% glicose		
	NaCl			NaCl		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
7	15,96	25,23	26,80	28,90	42,45	49,14
14	14,45	22,28	24,87	22,58	25,66	28,90
21	13,25	14,75	18,06	14,75	11,44	16,26

Obs: Os resultados correspondem à média de três repetições.

**ANEXO 31** - Relação entre o conteúdo de nitrogênio protéico (mg%) e nitrogênio

solúvel total (mg%), durante a fermentação da sardinha - verdadeira com *Lactobacillus sakei* 2a

Tempo (dias)	2% glicose			4% glicose		
	2%	NaCl 4%	6%	2%	NaCl 4%	6%
7	38,48	23,34	16,81	18,79	10,77	8,28
14	54,13	31,20	25,27	32,49	26,36	18,21
21	64,48	52,17	41,46	63,40	65,84	37,45

Obs: Os resultados correspondem à média de três repetições.

**ANEXO 32** – Variação no conteúdo de nitrogênio protéico (mg %) durante a produção da sardinha - verdadeira submetida ao processo de salmouragem sem adição do *starter*

Tempo (dias)	NaCl		
	2%	4%	6%
2	370,73	362,29	322,15
4	526,44	459,55	398,03
6	560,15	558,16	546,68

Obs: Os resultados correspondem à média de três repetições.

**ANEXO 33** – Variação no conteúdo de nitrogênio solúvel total (mg %) durante a produção da sardinha - verdadeira submetida ao processo de salmouragem sem adição do *starter*

Tempo (dias)	NaCl		
	2%	4%	6%
2	216,34	213,98	191,20
4	227,64	225,80	224,31
6	238,21	227,84	233,88

Obs: Os resultados correspondem à média de três repetições.

**ANEXO 34** – Relação entre o conteúdo de nitrogênio protéico (mg%) e nitrogênio solúvel total (mg%), durante a produção da sardinha - verdadeira

submetida ao processo de salmouragem sem adição do *starter*

Tempo (dias)	NaCl		
	2%	4%	6%
2	1,71	1,69	1,68
4	2,31	2,03	1,77
6	2,35	2,44	2,34

Obs: Os resultados correspondem à média de três repetições.

### ANEXO 35 – Ficha para análise sensorial

---

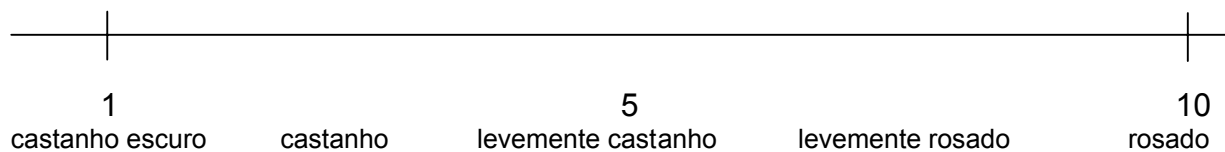
#### FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome:..... Data:...../...../.....

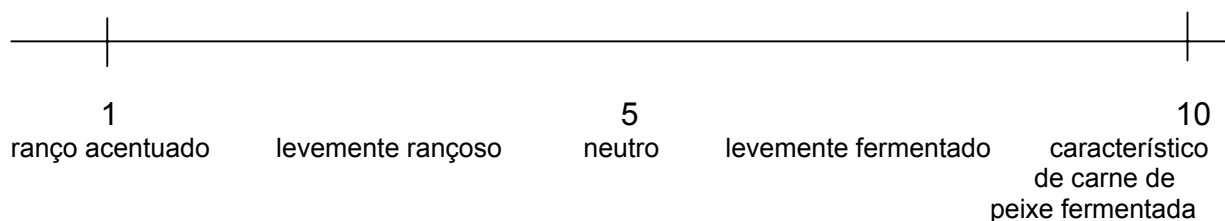
---

Você está recebendo amostras de um produto fermentado. Usando as escalas, indique as características de cor, odor, sabor e textura. Faça os comentários que achar pertinente com relação às características avaliadas.

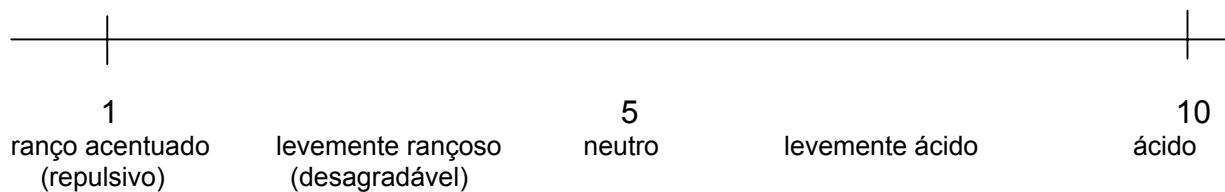
### COR



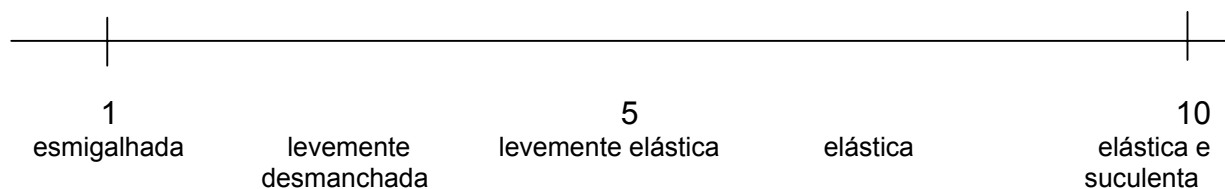
### ODOR



### SABOR



### TEXTURA



**Comentários:**.....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....