

Thiago Dal Sasso dos Reis

**BACTERIOCINOGENICIDADE DE *Lactobacillus plantarum*
(ATCC 8014) NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E
MICROBIOLÓGICA DE MEXILHÕES (*Perna perna*)
REFRIGERADOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna

Florianópolis
2011

dos Reis, Thiago Dal Sasso

Bacteriocinogenicidade de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) na qualidade físico-química e microbiológica de mexilhões (*Perna perna*) refrigerados [dissertação] / Thiago Dal Sasso dos Reis ; orientador, Ernani Sebastião Sant'Anna - Florianópolis, SC, 2011.

82 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Conservação de pescados. I. Sebastião Sant'Anna, Ernani . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Thiago Dal Sasso dos Reis

**BACTERIOCIENOGENICIDADE DE *Lactobacillus plantarum*
(ATCC 8014) NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E
MICROBIOLÓGICA DE MEXILHÕES (*Perna perna*)
REFRIGERADOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 10 de setembro de 2011.

Prof.^a Roseane Fett, Dr.^a
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Ernani Sebastião Sant`Anna, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Regina Coeli Oliveira Torres, Dr.^a
membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Milton Luiz Pinho Espírito Santo, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande

*Aos meus pais, José Roque e Gilda,
pelo apoio, amor incondicional e
confiança em mim depositados nas
horas difíceis*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha fortaleza nos momentos de fraqueza, a minha esperança nos momentos difíceis e a minha certeza de dias melhores. Por tudo.

À FAPESC, pela concessão de verba e fomento para a realização do projeto.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de desenvolvimento tecnológico, fundamental à minha manutenção no programa.

Ao Professor Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança em mim depositada na realização deste trabalho e principalmente pela paciência e sabedoria para lidar comigo durante todo o período do mestrado.

À pesquisadora Dra. Regina Coelli de Oliveira Torres, pelos conhecimentos transmitidos, pelo auxílio em todas as etapas do curso, pela mão amiga e conselheira sempre prestes a ajudar e ensinar e pela paciência em corrigir os erros, sempre de forma muito gentil.

Ao professor Luiz Henrique Beirão, pela atenção dedicada ao projeto.

À professora Elaine Schwinden Prudencio, pela simpatia e auxílio na finalização do experimento e ao professor Paulo Ogliari, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

À ex-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, à atual coordenadora do programa Dra. Roseane Fett, e ao secretário do programa Sérgio de Souza pela competência demonstrada no auxílio nas pendências do dia-a-dia, pela simpatia e incentivo dedicados.

Aos colegas de laboratório, Eunice, Valdemar, Luiz, Alessandro, Eliandro, Carla, Fábio, Ângelo, Ferdi, Van, Krischina, Déia, Isadora e Maria Helena pela prontidão e pelos momentos de descontração.

Aos meus pais, José Roque e Gilda Reis, e minha família, pelo carinho, por estarem presentes mesmo na distância, pelo incentivo, e por sempre acreditarem em mim. À Carla por ser meu porto seguro nos momentos difíceis, sempre dedicando amor e carinho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado,
mas nada pode ser modificado até que seja
enfrentado.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Com a implantação da maricultura em Santa Catarina, o Estado alcançou um patamar de destaque na produção aquícola, posicionando-se como líder na produção de ostras e mexilhões no Brasil e segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina, sendo o Chile o primeiro. No entanto os produtos da maricultura catarinense ainda atingem um mercado regionalizado e sazonal. Porém, há expectativa de ampliação de mercado através da identificação de novos produtos, novas técnicas de conservação, aumento do volume de produção e agregação de valor. As bactérias lácticas (BL) são micro-organismos conhecidos por aumentar a segurança, preservar a qualidade, desenvolver novos sabores característicos e melhorar a qualidade nutricional dos alimentos através da redução no pH do alimento, à competição por nutrientes e a produção de metabólitos inibidores (STILES, 1996), com destaque aos peptídeos antibacterianos denominados bacteriocinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de bacteriocinas produzidas pela cepa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 na qualidade físico-química e microbiológica de mexilhões *Perna perna* desconchados e refrigerados. Amostras (150 gramas) de mexilhão desconchado foram submetidas a imersão em 4 diferentes soluções (tratamentos), com objetivo de avaliar-se a qualidade microbiológica e físico-química ao longo de 17 dias de estocagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os tratamentos utilizados foram: A: caldo de bacteriocinas produzidas pela bactéria *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; B: solução de ácido láctico 6% v/v; C: solução de hipoclorito de sódio 5 mg/L; D: água destilada (controle). As amostras foram analisadas nos dias 0, 3, 6, 10, 13 e 17, quanto a: microbiológicos: contagem de coliformes a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$; estafilococos coagulase positiva; *Salmonella* spp; *Listeria* spp; contagem de mesófilos anaeróbios; contagem de psicrófilos a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$; físico-químicos: pH; bases voláteis totais (N-BVT) e acidez em solução normal. Ao final do experimento o tratamento A manteve a qualidade microbiológica aceitável para o consumo até o período entre o 7º dia e o 10º dia. Este resultado também pode ser alcançado pelo tratamento b, porém com uma acidificação do meio mais pronunciada (pH 4,06). Os valores de pH não variaram significativamente. Foram encontrados valores menores para os tratamentos B e A respectivamente, devido a acidificação das amostras em virtude da quantidade de ácido láctico adicionado na solução do tratamento B e do ácido láctico (em menor quantidade) produzido por *Lactobacillus plantarum* no caldo MRS para produção de bacteriocinas (tratamento A). Os valores de N-BVT mais

elevados foram identificados nos tratamentos C e D, provavelmente devido a maior multiplicação bacteriana, causadora de deterioração precoce nas amostras e liberação do nitrogênio através das bases voláteis.

Palavras chave: *Lactobacillus plantarum*, mexilhão, refrigeração, bacteriocinas.

ABSTRACT

With the establishment of mariculture in Santa Catarina, the state reached a level of prominence in aquaculture production, positioning itself as a leader in production of oysters and mussels in Brazil and the second largest producer of shellfish in Latin America, Chile being the first. However the products of Santa Catarina mariculture still reach a regionalized and seasonal market. However, it is expected to expand the market by identifying new products, new conservation techniques, increase in production volume and adding value.

The lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms known to increase safety, preserve the quality, developing new flavors and improve the nutritional quality of foods by reducing the pH of the food, competition for nutrients and production of inhibitory metabolites (STILES, 1996), with emphasis on antimicrobial peptides called bacteriocins. The objective of this study was to evaluate the activity of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 in the physico-chemical and microbiological quality of *Perna perna* shucked mussels and chilled. Samples (150 grams) of shucked mussels were subjected to immersion in 4 different solutions (treatments), in order to evaluate the microbiological and physical-chemical quality over 17 days of storage under refrigeration ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). The treatments were: A: broth of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; B: solution of lactic acid 6% v/v; C: sodium hypochlorite solution 5 mg/L; D: distilled water (control). The samples were analyzed on days 0, 3, 6, 10, 13 and 17, as: microbiological counts of: coliforms at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$; coagulase-positive staphylococci;

Salmonella spp; *Listeria* spp; anaerobic mesophilic count; psychrophiles at $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ count; physical-chemical: pH, total volatile bases (TVB-N) and acidity in normal solution. At the end of the experiment, treatment A maintained the microbial quality acceptable for consumption until the period between the 7th day and 10th day. This result can also be achieved by treating b, but with a more pronounced acidification of the medium (pH 4.06). The pH values did not vary significantly. Found lower values for treatments B and A respectively, due to acidification of the samples because of the added amount of lactic acid in the treatment solution B and lactic acid (to a lesser extent) produced by *Lactobacillus plantarum* in MRS broth for the production of bacteriocins (treatment A). The TVB-

N values were identified highest in the treatments C and D, probably due to increased bacterial growth, causing early deterioration in the samples and release of nitrogen through the volatile bases.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, mussel, refrigeration, bacteriocins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina (Ton.)	21
Figura 2 - Produção de mexilhões comercializada por município em 2009 (Ton.).....	22
Figura 3 - Mexilhão macho (branco-leitoso) e mexilhão fêmea (vermelho-alaranjado).....	27
Figura 4 - Cultivo em "Bouchots (esquerda) e em espinhel (direita)	28
Figura 5 - Mexilhões desconchados sortidos (machos e fêmeas).....	30
Figura 6 - Cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> em fermentador (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 2000), em caldo MRS.	40
Figura 7 - Fluxograma de preparo das amostras	41
Figura 8 - Fluxograma de elaboração de caldo com bacteriocinas.....	42
Figura 9 - Imersão dos mexilhões em solução controle	44
Figura 10 - Fluxograma de aplicação dos tratamentos nas amostras	45
Figura 11 - Contagem (Log ₁₀ UFC/g) de micro-organismos psicrófilos em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem (4 °C ± 1 °C).	49
Figura 12 - Contagem (Log ₁₀ UFC/g) de micro-organismos mesófilos anaeróbios em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem (4 °C ± 1 °C).....	51
Figura 13 - Valores de pH em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem (4 °C ± 1 °C).	54
Figura 14 - Valores de Acidez em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem (4 °C ± 1 °C).	57
Figura 15 - Valores de Acidez em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem (4 °C ± 1 °C).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades diferenciais básicas de bactérias lácticas.....	32
Tabela 2 - Análises realizadas nas amostras, após aplicação dos tratamentos, ao longo de 17 dias de armazenamento sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	46
Tabela 3 - Contagem (Log_{10} UFC/mL) de micro-organismos psicrófilos em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).	63
Tabela 4 - Contagem (Log_{10} UFC/mL) de micro-organismos mesófilos anaeróbios em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	64
Tabela 5 - Valores de acidez em solução normal (NaOH) em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	65
Tabela 6 - Valores de bases voláteis totais (N-BVT) em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	66
Tabela 7 - Valores de pH (potencial hidrogeniônico) em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação a contagem de micro-organismos psicrófilos.....	49
Quadro 2 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação à contagem de micro-organismos mesófilos anaeróbios.....	51
Quadro 3 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação aos valores de pH. 55	
Quadro 4 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação aos valores de Acidez.	56
Quadro 5 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação aos valores de N-BVT.....	59

SUMÁRIO

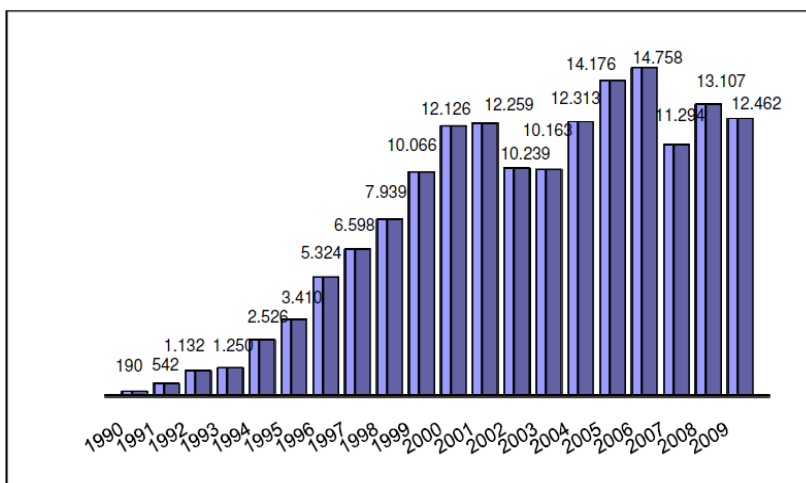
1.	INTRODUÇÃO	21
2.	OBJETIVOS	25
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1.	MEXILHÃO <i>Perna perna</i>	27
3.2.	BACTÉRIAS LÁTICAS.....	31
3.3.	BACTERIOCINAS.....	34
3.4.	<i>Lysteria monocytogenes</i>	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1.	MICRO-ORGANISMO	39
4.1.1.	Micro-organismo produtor de bacteriocinas	39
4.1.2.	Micro-organismo indicador.....	39
4.1.3.	Micro-organismo contaminante	39
4.2.	MEIO DE CULTURA	39
4.3.	CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA.....	39
4.4.	MEXILHÕES – AMOSTRA	40
4.4.1.	Preparo das amostras.....	41
4.5.	TRATAMENTOS	42
4.5.1.	Tratamento A – Caldo com Bacteriocinas.....	42
4.5.1.1.	Teste para verificação da presença de bacteriocinas	43
4.5.2.	Tratamento b – Solução de ácido láctico	43
4.5.3.	Tratamento c – Solução de hipoclorito de sódio – NaClO – Água hiperclorada.....	43
4.5.4.	Tratamento d – Controle	43
4.6.	APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS NOS MEXILHÕES DESCONCHADOS	44
4.7.	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS	46
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.	PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	47
5.2.	EFEITO DOS TRATAMENTOS NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE MEXILHÕES <i>Perna perna</i> DESCONCHADOS	47
6.	CONCLUSÃO	61
7.	APÊNDICE.....	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de moluscos representa 22% da produção mundial de organismos aquáticos cultivados, sendo 40% deste valor correspondente ao cultivo de mexilhões (ROCKZANSKI et al., 2000).

Com a implantação da maricultura em Santa Catarina, o estado alcançou um patamar de destaque na produção aquícola, posicionando-se como líder na produção de ostras e mexilhões no Brasil e segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina, sendo o Chile o primeiro. Em 2009, a produção total de moluscos comercializados em Santa Catarina (mexilhões, ostras e vieiras) foi de 12.462 toneladas (Figura 1). Este volume de produção proporcionou uma movimentação financeira bruta estimada em R\$ 21.606.609,00 para o estado. Atuaram em 2009 diretamente na produção um contingente de 689 maricultores, representados por 28 associações municipais, uma estadual, 3 cooperativas e 2 federações, distribuídas em 12 municípios na região litorânea compreendidos entre os municípios de Palhoça e São Francisco do Sul (CEDAP/EPAGRI, 2009).

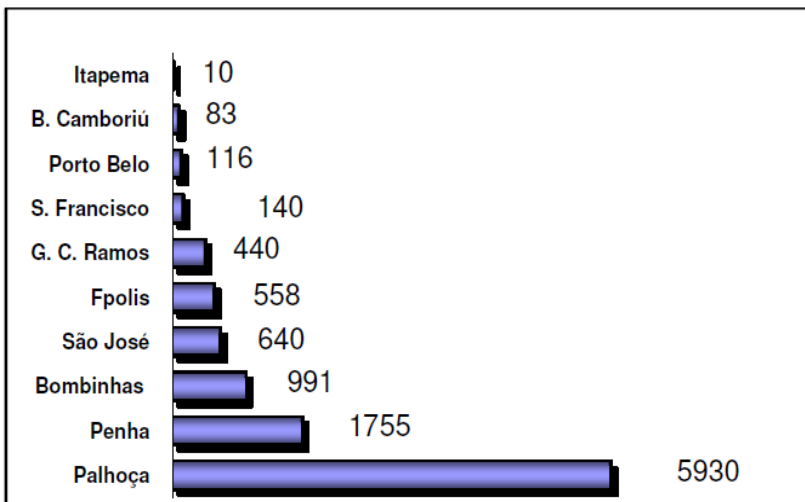
Figura 1 - Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina (Ton.)



Fonte: Cedap/Epagri (2009).

A produção de mexilhões no ano de 2009 foi de 10.663 toneladas. Os destaques ficaram por conta dos municípios de Palhoça, com 5.930 toneladas (Figura 2), representando 55,61% e Penha, com 1.755 toneladas, representando 16,46% da produção estadual de mexilhões.

Figura 2 - Produção de mexilhões comercializada por município em 2009 (Ton.).



Fonte: Cedap/Epagri (2009).

Os produtos da maricultura catarinense ainda atingem um mercado regionalizado e sazonal. Porém, há expectativa de ampliação de mercado através da identificação de novos produtos, novas técnicas de conservação, aumento do volume de produção e agregação de valor. No entanto, mesmo com o patamar alcançado na produção, estes produtos ainda são processados, em sua maioria, de forma artesanal e precária pelos próprios produtores, sem nenhum tipo de higienização e/ou inspeção.

O panorama atual da atividade demonstra uma estagnação na produção nos últimos anos, devido em grande parte, à maior parcela da comercialização ainda ser feita de forma “*in natura*”, dificultando a ampliação do consumo. Atualmente é verificado grande interesse na importação dos moluscos catarinenses por parte dos mercados europeu, americano e asiático, possíveis mercados futuros. Todavia, faz-se necessário o emprego de boas práticas de fabricação e o advento de

novas técnicas de processamento e conservação, buscando a fabricação de produtos com qualidade comprovada.

Nos últimos anos, acentuou-se o interesse no desenvolvimento de tecnologias para preservação de produtos de pescado visando o aumento da qualidade, segurança e da vida útil destes produtos. Os alimentos derivados de pescado são ricos em proteínas altamente perecíveis e metabólitos que aceleram a sua deterioração, o que lhes confere uma vida útil reduzida.

Desde o período neolítico, os processos de conservação alimentar empregados têm sido a salga, a fermentação e a secagem. Mais recentemente o enlatamento, o congelamento e os aditivos químicos têm sido utilizados na extensão da durabilidade dos alimentos.

Devido a tendência generalizada da diminuição de uso de aditivos químicos, uma atenção especial vem sendo dada aos métodos de biopreservação, associados à produção de metabólitos, que ocorrem naturalmente, produzidos por bactérias específicas, inibindo o crescimento de micro-organismos indesejáveis.

As bactérias lácticas (BL) são micro-organismos conhecidos por aumentar a segurança, preservar a qualidade, desenvolver novos sabores característicos e melhorar a qualidade nutricional dos alimentos. São capazes de se desenvolver em temperaturas de refrigeração, toleram embalagem sobre atmosfera modificada, baixo pH, altas concentrações de sais e a presença de aditivos como ácido láctico, etanol ou ácido acético (CALO-MATA et al., 2007). As BL exercem forte atividade antagonista contra vários micro-organismos relacionados a deterioração dos alimentos, bem como a bactérias patogênicas, entre elas, *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Bacillus*. Este efeito antagonista ocorre principalmente devido a redução no pH no alimento, à competição por nutrientes e a produção de metabólitos inibidores (STILES, 1996), com destaque aos peptídeos antibacterianos denominados bacteriocinas.

Estudos desenvolvidos nos últimos anos indicam que a aplicação de bacteriocinas produzidas pelas BL na preservação dos alimentos podem oferecer diversos benefícios (THOMAS; CLARKSON e DELVES-BROUGHTON, 2000) como:

- Extensão da vida útil dos alimentos;
- Provisão de uma proteção extra durante condições extremas de temperatura;
- Decréscimo no risco de transmissão de patógenos, através da cadeia alimentar;

- Redução nas perdas econômicas causadas pela deterioração;
- Redução na aplicação de conservantes químicos;
- Redução na aplicação de tratamentos térmicos severos sem comprometer a segurança do alimento, melhor preservação dos nutrientes, vitaminas e das propriedades organolépticas do alimento e;
- Permite a comercialização de novos produtos (menos ácidos, com menor concentração de sal e maior teor de umidade).

A respeito das novas tendências na indústria de alimentos, como a necessidade de eliminar o uso de ingredientes artificiais e aditivos, a demanda por alimentos minimamente processados e frescos, bem como por alimentos prontos para o consumo, alimentos funcionais e nutracêuticos, podem ser atendidas ao menos em parte através da aplicação das bacteriocinas (ROBERTSON et al., 2004).

A pesquisa proposta vem ao encontro de uma crescente demanda por novas tecnologias para o setor produtivo da maricultura catarinense, setor este caracterizado pelo modo de produção artesanal, o qual carece imensamente de técnicas sofisticadas que visem à profissionalização e o avanço do setor. Os resultados da pesquisa proposta podem contribuir para o estabelecimento de um processo de conservação utilizado ao redor do mundo, proporcionando uma alternativa aos métodos convencionais e apresentando uma nova possibilidade para conservação dos produtos da maricultura catarinense.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a atividade de bacteriocinas produzidas pela cepa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 na qualidade físico-química e microbiológica de mexilhões (*Perna perna*) desconchados e refrigerados.

- Cultivo da cepa bacteriana de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 visando produção de bacteriocinas;

- Avaliar a sobrevivência de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos, em mexilhões desconchados, submetidos a 4 diferentes tratamentos, ao longo de 17 dias de estocagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

- Avaliar a dinâmica de parâmetros físico-químicos, em mexilhões desconchados submetidos a 4 diferentes tratamentos, ao longo de 17 dias de estocagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MEXILHÃO *Perna perna*

A espécie *Perna perna*, popularmente denominada como: marisco, marisco preto, ostra-de-pobre (Figura 3) (FERREIRA e MAGALHÃES, 2004), é classificado como um dos maiores mexilhões do mundo chegando a atingir 182 mm de comprimento. Apresenta superfície lisa com linhas de crescimento concêntricas, margem ventral estreita e charneira com 1 ou 2 dentes. Perióstraco marrom escuro com bandas verde-amareladas próximas a margem ventral e face interna nacarada de cor roxa (RIOS, 2009).

Figura 3 - Mexilhão macho (branco-leitoso) e mexilhão fêmea (vermelho-alaranjado)



Fonte: Grupo de Estudos Pesqueiros UNIVALI – Itajaí (2009)

Na classe Bivalvia, também conhecida como Pelecypoda ou Lamellibranchia, estão, entre outros, as ostras e mexilhões. Dentre as características destes moluscos, estão o corpo lateralmente comprimido e a concha composta por duas valvas articuladas, que envolvem completamente o animal. São desprovidos de cabeça distinta, por isso denominado Acephala (OLIVEIRA, 1969) e a cavidade do manto é a mais espaçosa dentre todas as classes de moluscos. São organismos filtradores e sua alimentação consiste basicamente de fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão, além do zooplâncton que pode complementar a sua dieta (ROSA, 1994). As brânquias são relativamente grandes assumindo a função de coletar alimento e realizar as trocas gasosas.

Graças a sua alta produtividade, os mexilhões vêm sendo utilizados na alimentação humana há séculos (SUCHANEK, 1986). Foram encontradas conchas do mexilhão azul, *Mytilus edulis*, em sambaquis datados de 6000 a.C. No século XIX, eles eram consumidos pela maioria dos países europeus, sendo utilizados como alimento, isca de peixe e fertilizante (FAO, 2005).

A espécie *Perna perna* é bastante resistente às variações de temperatura e salinidade, além da grande capacidade adaptativa e reprodutiva. Tais características, aliadas a taxa de crescimento em cultivo que pode passar de 2 cm para 6 a 8 cm no período de 6 a 8 meses (FERREIRA e MAGALHÃES, 1989) e seu alto valor protéico conferem à espécie, boas qualidades para o seu cultivo em escala comercial, cultivo este denominado mitilicultura (FERREIRA e MAGALHÃES, 2004).

O primeiro sistema de cultivo de mexilhões utilizado no mundo foi em “bouchots” (Figura 4), o qual consistia na utilização de estacas de madeira enterradas no substrato, normalmente lodoso. Este método ainda persiste e é praticado quase que exclusivamente na França (MARQUES, 1998).

Figura 4 - Cultivo em "Bouchots (esquerda) e em espinhel (direita)



Fonte: www.conexaoparis.com.br

Ferreira e Magalhães (2004) descrevem que o sistema de cultivo de mexilhões predominante atualmente são os suspensos flutuantes, com estruturas do tipo sa ou espinhel (“long line”) (Figura 4), largamente difundidos nos cultivos comerciais, desde a Ásia (China e Malásia), Europa (principalmente Espanha e França), até as Américas (Canadá, Estados Unidos, Chile, Venezuela e Brasil).

Em Santa Catarina cultivo de mexilhões surgiu comercialmente em meados de 1989-90, a partir dos esforços do Laboratório de

Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, da Secretaria da Agricultura do estado de Santa Catarina (através da ACARPESC, hoje EPAGRI) e de comunidades de pescadores artesanais. A atividade surgiu como uma alternativa de renda à estas comunidades, entretanto tornou-se atividade comercial e/ou principal fonte de renda para a maioria dos produtores. Geradora de emprego e renda contribui também para a fixação das populações tradicionais em seus locais de origem e para a conscientização da necessidade de preservação da qualidade da água nos ambientes costeiros (COSTA, 2007).

Os mexilhões são considerados indicadores da qualidade ambiental do ecossistema em que vivem. Esta propriedade se deve à potencialidade destes organismos em acumular contaminações em seus tecidos em quantidade proporcionais às concentrações do poluente ambiental (LIMA, 1997). Tal característica dos mexilhões faz com que exista uma grande preocupação das autoridades sanitárias quanto à origem, estado e conservação deste pescado destinado ao consumo humano.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece que, a média geométrica de densidade de coliformes termotolerantes de no mínimo 15 amostras do mesmo local de coleta não deverá exceder 43/100 mL e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88/100 mL para as águas salinas utilizadas para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana. Esses índices devem ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras (BRASIL, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, através da RDC 12 (BRASIL, 2001), resolução que estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, institui como limites para permissão do consumo de moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, temperados e não, industrializados resfriados ou congelados, os seguintes parâmetros em amostra indicativa: estafilococos coagulase positiva: 103 UFC/g; Salmonella sp: ausência em 25 g; coliformes a 45 °C: 5×10 UFC/g.

Os mexilhões por apresentarem curto prazo de vida útil e possuírem rica microbiota em seu trato intestinal, devem ser tecnologicamente processados para aumento de sua vida de prateleira, não ser vetor de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) aos ingestores e para impedir perdas econômicas (VALENTE, 2004).

Segundo Seed (1976) fatores bióticos como predação e competição intraespecífica (GRIFFITHS, 1992) e interespecífica, principalmente por espaço, contribuem significativamente para limitar a

sobrevivência do mexilhão durante os seus primeiros meses de crescimento (DAYTON, 1973; PAINE, 1976). A predação por peixes e outros organismos aquáticos (principal causa de mortalidade de mexilhões) é extremamente severa em algumas áreas sendo mais comum em águas rasas. Diversas são as espécies que se alimentam destes bivalves, como: estrelas-do-mar (INGLIS E GUST, 2003), siris (DeGRAAF E TYRREL, 2004), pássaros (HAMILTON E NUDDS, 2003) e peixes (LAPPALAINEN; WESTERBOM e VESALA, 2004).

Em relação à reprodução, a espécie é dióica (Figura 6) de fecundação externa, a qual ocorre no ambiente aquático. Na desova, a emissão dos gametas é estimulada por fatores físicos ou climáticos, principalmente pelo aumento na concentração de nutrientes no meio e pela variação repentina na temperatura ou salinidade da água (COCHÔA, 2005). A nomenclatura que divide o processo de maturação sexual dos mexilhões adultos em estádios foi proposta por Lunetta (1969). Este método é o mais utilizado por pesquisadores brasileiros e tem a vantagem de determinar os estádios a olho nu, através da simples observação macroscópica do manto, permitindo distinguir os diferentes estádios do ciclo sexual.

Figura 5 - Mexilhões desconchados sortidos (machos e fêmeas)



Fonte: Autor

Suchanek (1986) afirma que os mexilhões, representantes da família Mytilidae, possuem uma incrível habilidade para tornar-se fauna dominante em costões rochosos (seu principal habitat) em todos os continentes, principalmente nas regiões de clima temperado em ambientes expostos ou semiexpostos em substratos horizontais ou levemente inclinados. A intensa produção de larvas e o rápido crescimento em ambientes eutrofizados propiciam aos mexilhões a dominância na competição por espaço. Com raras exceções, em locais expostos ou moderadamente expostos, os mitilídeos são pioneiros na formação de uma complexa comunidade nas rochas litorâneas, onde oferecem refúgio e habitat a uma série de organismos a eles associados (BAYNE, 1976). Devido a isto são considerados bioatratores de diversidade.

Os mexilhões representam importante fonte de alimento em muitas partes do mundo e tem grande potencial devido ao seu alto valor nutritivo (ANDREU, 1976). A boa adaptação às condições adversas do ambiente como variação de salinidade e temperatura além da grande disponibilidade de larvas faz dele o “candidato ideal para a aquicultura”, como citado por Hickman (1992).

3.2. BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias lácticas (BL) são micro-organismos que possuem diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum: são gram-positivos, não formadores de esporos, catalase-negativos, fastidiosos, anaeróbicos, aerotolerantes e ácido tolerantes e possuem metabolismo fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto final (DE MARTINIS; ALVES e FRANCO, 2003; LEROY e DE VUYST, 2004). Normalmente possuem forma de cocos ou bastonetes e podem ser homofermentativos ou heterofermentativos. As BL homofermentativas degradam hexoses em lactato, enquanto as BL heterofermentativas degradam hexoses em lactato e produtos adicionais, tais como: acetato, etanol, CO₂, formato, ou succinato (CALO-MATA et al., 2007).

A classificação das BL é baseada em critérios morfológicos, metabólicos e fisiológicos. Nas últimas décadas, os métodos baseados em segmentação de DNA, usando como gene alvo 16S rRNA, aplicados para determinar o “parentesco” de BL associados a alimentos, resultaram em importantes mudanças em sua classificação taxonômica. Os gêneros compreendendo as BL são: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus, Lactococcus e Streptococcus, bem como Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus Teragenococcus, Vagococcus e Weisella, sendo apontados como de maior importância na indústria alimentícia os gêneros Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus e Streptococcus. (STILES e HOLZAPFEL, 1997).

Tabela 1- Propriedades diferenciais básicas de bactérias lácticas

Gênero	Fermentação	Formato das células	Arranjo das células
<i>Streptococcus</i>	Homolática	Cocos	Par, cadeia
<i>Leuconostoc</i>	Heterolática	Cocos	Par, cadeia
<i>Pediococcus</i>	Homolática	Cocos	Tétrade, caixo
<i>Aerococcus</i>	Homolática	Cocos	Tétrade, caixo
<i>Enterococcus</i>	Homolática	Cocos Cocos ou	Par, cadeia
<i>Vagococcus</i>	Homolática Homo ou	bastonetes	Par, cadeia
<i>Lactobacillus</i>	heterolática	Bastonetes	Par, cadeia
<i>Carnobacterium</i>	Heterolática	Bastonetes	Par, cadeia

FONTE: Ringø and Gatesoupe (1998)

As BL são largamente distribuídas na maioria dos ecossistemas e são encontradas no solo, água, plantas e animais. Elas são responsáveis por muitos processos de fermentação em alimentos, mas também são comumente encontradas em alimentos não-fermentados, como laticínios, produtos cárneos, mariscos, frutas, legumes e cereais; e estão presentes no intestino e vias respiratórias de seres humanos e animais. BL são amplamente utilizadas como culturas iniciadoras na indústria de alimentos para a produção de alimentos fermentados, incluindo lácteos (iogurte e queijo), cárneos (salsichas e outros embutidos), peixes, cereais (pães e bebidas como a cerveja), frutas (processos de fermentação malolática na produção de vinhos) e vegetais (couve, kimchi, silagem) (CALO-MATA et al., 2007). A maioria das BL são consideradas como “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS – Generally Recognized as Safe) pelo órgão norte-americano de controle de alimentos e medicamentos, FDA - Food and Drug Administration (SILVA et al., 2002).

BL são amplamente utilizadas para elevar a segurança, preservar a qualidade, desenvolver novos sabores característicos e melhorar a qualidade nutricional dos alimentos. São capazes de se desenvolverem em temperaturas de refrigeração, toleram embalagem sobre atmosfera modificada, baixo pH, altas concentrações de sais e a presença de aditivos como ácido láctico, etanol e ácido acético (CALO-MATA et al., 2007). As BL exercem forte atividade antagonista contra vários microorganismos relacionados a deterioração dos alimentos, incluindo organismos deteriorantes e bactérias patogênicas como *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Bacillus*. Este efeito antagonista ocorre principalmente devido a redução do pH do alimento, à competição por nutrientes e a produção de metabólitos inibidores (STILES, 1996) como: ácidos orgânicos, diacetil, acetonas, peróxido de hidrogênio, reuterina, reuteriniclina, peptídeos anti-fúngicos e bacteriocinas (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995; HOTZEL; GANZLE; NICHOLSON; HAMMES; JUNG, 2000). Entre os metabólitos inibidores, podemos destacar as bacteriocinas, peptídeos sintetizados via ribossomos os quais apresentam atividade antibacteriana (GUINAME et al., 2005).

No âmbito das espécies aquáticas, as BL são consideradas não pertencentes ao meio aquático, porém certos gêneros (*Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*) têm sido reportados em peixes e em seu ambiente circundante (STILES e HOLZAPFEL, 1997; RINGØ e GATESOUBE, 1998). Algumas BL também têm sido isoladas de produtos alimentícios advindos do meio aquático, como em diversas espécies de pescado (RINGØ e GATESOUBE, 1998), produtos de pescado como surimi (YAMAZAKI et al., 2003), peixes frescos (BUCIO et al., 2006), peixes cultivados (MICHEL et al., 2007) e conteúdo intestinal de peixes marinhos costeiros (ITOI et al., 2008).

Tomé e colaboradores (2008) verificaram o potencial *in vitro* de 9 cepas de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas, isoladas de salmão defumado a frio, embalado a vácuo, para possível uso como culturas biopreservativas contra *L. monocytogenes*. Entre as cepas testadas, *Enterococcus faecium* ET05, *Lactobacillus curvatus* ET06 e ET30, *L. delbrueckii* ET32 e *Pediococcus acidilactici* ET34 apresentaram-se hábeis a secretar bacteriocinas no meio de cultura, tanto em altas concentrações de sal, quanto em baixas temperaturas, ambas em condições aeróbicas e anaeróbicas. Em estudo posterior, Tomé; Gibbs e Teixeira (2008) avaliaram a atividade inibitória das cepas selecionadas anteriormente, contra *Listeria innocua* 2030c, em salmão defumado a frio e embalado a vácuo. Todas as 5 cepas apresentaram

atividade antibacteriana, com destaque para a cepa *Enterococcus faecium* ET05, a qual apresentou-se como a melhor opção para o controle de *L. innocua 2030c* em salmão naquelas condições.

Algumas cepas de *Carnobacterium* (PILET et al., 1995; NILSSON et al., 2004) *Lactococcus lactis*, *Enterococcus spp.* E *Pediococcus spp.* (CAMPOS et al., 2006 ; TOMÉ et al., 2008) têm recebido atenção como culturas produtoras de bacteriocinas.

Nos últimos anos, diversos estudos tem reportado aumento na qualidade e na vida-de-prateleira de produtos de pescado através do uso das bacteriocinas (KATLA et al., 2001; BRILLET et al., 2005;), com destaque para os testes em que é experimentada a combinação de métodos para a inibição de patógenos em peixes e moluscos bivalves, como por exemplo, as embalagens ativas com bacteriocinas absorvidas (ZUCKERMAN e BEM AVRAHAM, 2002; CHEN e HOOVER, 2003; AL-HOLY et al., 2004; ELOTMANI e ASSOBEI, 2004).

Em comparação com outros produtos alimentícios como os lácteos e os cárneos, poucas cepas bacteriocinogênicas e bacteriocinas isoladas de ambientes aquáticos, produtos de pescados e ainda menos de produtos de pescado não fermentados, tem sido identificadas e caracterizadas. Neste contexto, a aquisição de cepas aclimatizadas ao ambiente aquático pode apresentar vantagens em termos de biopreservação nos alimentos derivados de pescado (TAHIRI et al., 2004).

3.3. BACTERIOCINAS

Nos últimos anos tem aumentado a preocupação dos consumidores com o uso de aditivos químicos para garantir a segurança dos produtos e estender a vida útil dos alimentos. Em resposta a estas preocupações, esforços têm sido feitos para introduzir tecnologias de processamento mínimo e para encontrar alternativas para a preservação da qualidade alimentar (GUINAME et al, 2005). Neste âmbito, o uso das bacteriocinas tem recebido atenção especial devido a suas características antimicrobianas, as quais possibilitam o aumento da segurança e da qualidade dos produtos alimentares além de estender sua vida útil.

As bacteriocinas foram descobertas na década de 1920 por Gratia e por Rogers (ROGERS, 1928, Apud GUINAME et al, 2005). Gratia estava envolvido em pesquisas buscando inativar bactérias, e em um intervalo de poucos anos, suas pesquisas também resultaram no desenvolvimento de antibióticos e na descoberta

de bacteriófagos. Gratia denominou sua primeira descoberta de colicina, devido sua ação contra *Escherichia coli* (CALO-MATA et al., 2007).

Desde então, a classificação das bacteriocinas tem sido revisada por diversos autores como Klaenhammer (1988); Ennahar; Sonomoto; Ishizaki (1999); Cintas; Casaus; Herranz; Hernández (2001); Cleveland; Montville; Nes; Chikindas (2001). Baseado na classificação de Klaenhammer, as bacteriocinas são classificadas, com base em elementos comuns, em quatro classes bem definidas:

Bacteriocinas classe 1 (Lantibióticos): caracterizadas por peptídeos modificados após a tradução para conter aminoácidos como a lantionina, β -metil-lantionina além de diversos aminoácidos desidratados. Os lantibióticos são divididos em dois subgrupos, A e B, baseados em suas características estruturais e seu modo de ação.

✓ Lantibióticos tipo A: consiste de peptídeos hidrofóbicos e catiônicos os quais formam poros na membrana da célula alvo. São lineares e geralmente maiores que os do tipo B, e chegam a conter de 19 a 38 aminoácidos. Nisina é a mais conhecida e estudada bacteriocina gram-positiva, integrante deste grupo, e foi aprovada como aditivo alimentar pela união européia em 1983 e pelo FDA em 1988 (GUINAME et al, 2005).

✓ Lantibióticos tipo B: possuem uma estrutura secundária mais globular e menor que o tipo A, (a maior possui 19 aminoácidos). O modo de ação dos lantibióticos tipo B é através da inibição de enzimas, interferindo na biosíntese da parede celular.

Bacteriocinas classe 2: As bacteriocinas desta classe caracterizam-se por serem: pequenas, estáveis ao calor, sem lantibióticos e geralmente possuem carga positiva em pH neutro. São divididas em 4 subgrupos:

✓ Classe 2a (bacteriocinas semelhantes à pediocina com forte atividade contra *Listeria*): É o maior grupo e seus membros são identificados pela seqüência amino-terminal (YGNGVXaaC) e pela forte atividade inibitória contra *Listeria*. O modo de ação desta classe se assemelha aos lantibióticos tipo A, agindo através da formação de poros na membrana citoplasmática. Exemplos

incluem Pediocina PA-1 e Pediocina AcH (*Pediococcus acidilactici*), Sakacinas A e P (*Lactobacillus sakei*), Leucocina A (*Leuconostoc gelidum*), Enterocinas A e P (*Enterococcus faecium*) e Carnobacteriocina (*Carnobacterium sp.*).

✓ Classe 2b (bacteriocinas em que a atividade depende da atividade complementar de dois peptídeos): são formadas por duas proteínas atuando em conjunto e seu modo de ação é através da formação de poros na membrana celular da célula alvo. A este grupo pertencem as bacteriocinas lactacina F e Lactococina G.

✓ Classe 2c: inclui as bacteriocinas secretadas pelo sistema *sec*-dependentes, como a acidocina B e enterocina P, a qual pode ser incluída tanto na classe 2a quanto na classe 2c.

✓ Classe 2d: inclui outras bacteriocinas não incluídas em outros sub-grupos, como as lactocinas A e B.

Bacteriocinas classe 3: proteínas grandes (peso molecular geralmente maior que 30 KDa) que possuem como características a instabilidade ao calor. Incluem as Helveticinas J e V e a Lactacina B.

Bacteriocinas classe 4: (peptídeos cíclicos); Estas bacteriocinas requerem lipídeos ou carboidratos para sua atividade. Pouco se conhece sobre a estrutura e função desta classe. Este grupo ainda precisa ser confirmado através de purificação e caracterização bioquímica (CLEVELAND et al., 2001) Nesta classe estão incluídas a Leuconocina S e a Lactacina 27.

Segundo Franco (2005) a ação da maior parte das bacteriocinas depende da ligação a receptores da superfície celular bacteriana, com permeabilização da membrana citoplasmática e formação de canais iônicos que causam o fluxo rápido de componentes celulares de baixo peso molecular. Há dissipação do gradiente eletroquímico na membrana citoplasmática, resultando em uma situação incompatível com a viabilidade celular. Evidências indicam a ocorrência de alguns efeitos secundários, como a degradação de proteínas, DNA e RNA, inibição da síntese de proteínas, DNA, RNA e peptideoglicano, responsáveis pela lise celular. Interferências na formação e degradação de ATP também foram relatadas.

3.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes faz parte de um grupo de micro-organismos contaminantes do meio ambiente, que tem sido isolado de águas doces e marinhas, assim como de muitos produtos de pescado. Este micro-organismo já foi isolado de produtos pesqueiros processados, entre eles os defumados, cozidos, congelados, produtos marinados e derivados do surimi (SANTO, 2003). Os sintomas da infecção, denominada de listeriose, incluem: meningite, infecção do sistema nervoso central, aborto, parto prematuro e septicemia (CARVAJAL, 2000), e podem levar a morte em 20 a 30% dos casos reportados (ROCOURT, 1996)

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporogênico e com motilidade no intervalo de temperatura de 20 °C a 25 °C, embora a temperatura ótima de crescimento esteja entre 30 °C e 37 °C. É um micro-organismo patogênico, um dos mais importantes veiculados por produtos comestíveis a partir da década de 80 (FUCHS e REILLY, 1992), sendo responsável por diversos recalls de alimentos de pescado ao redor do mundo, como o ocorrido nos Estados Unidos em 2000, onde 53.000 kg de salmão defumado foram rejeitados pelo FDA.

Este patógeno é frequentemente encontrado em produtos pesqueiros, inclusive nos cozidos e congelados, como no camarão, na carne de siri, na cauda de lagosta, nos filés de peixes cartilagosos, nos produtos derivados de surimi e nos mexilhões.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRO-ORGANISMO

Todas as cepas utilizadas no experimento foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical de Pesquisa Tecnológica André Tosello.

4.1.1. Micro-organismo produtor de bacteriocinas

A cepa de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) foi mantida em Agar MRS (DE Man Rogosa Sharpe - Difco), no Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

4.1.2. Micro-organismo indicador

A cepa de *Lactobacillus sakei* (ATCC 15521) foi mantida em Agar MRS, no Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Este micro-organismo foi utilizado como indicador para os testes de detecção de bacteriocinas *in vitro*.

4.1.3. Micro-organismo contaminante

A cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), foi mantida em Agar BHI (*Brain Heart Infusion*- Difco) no Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Foi utilizada para a contaminação das amostras *in vivo*.

4.2. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para o cultivo das cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus sakei*, foi o caldo MRS (Difco) e para o cultivo de *Listeria monocytogenes*, o caldo BHI (Difco).

4.3. CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO PARA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA

Lactobacillus plantarum foi cultivado em 3 litros de caldo MRS, em fermentador (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 2000) com

inóculo inicial de 10^6 UFC/mL, temperatura de $30\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ e agitação de 100 rpm por 16 horas (Figura 6) Este cultivo foi utilizado para obtenção de Caldo com Bacteriocinas (Tratamento A) aplicado as amostras de mexilhões.

Figura 6 - Cultivo de *Lactobacillus plantarum* em fermentador (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 2000), em caldo MRS.



Fonte: Autor

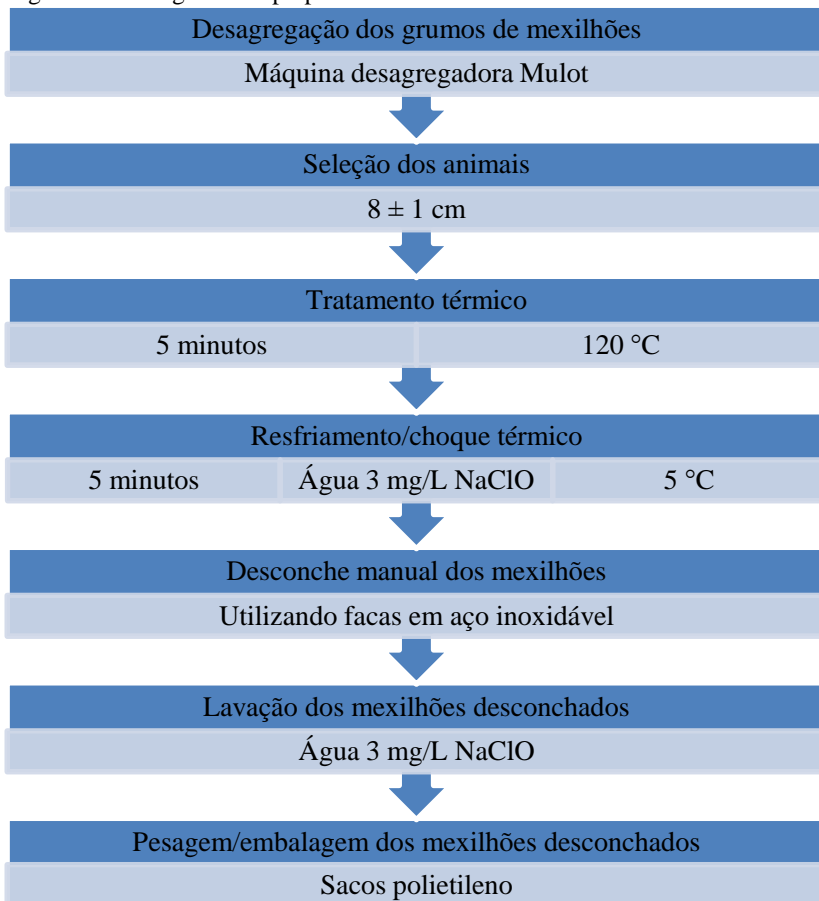
4.4. MEXILHÕES – AMOSTRA

Foram utilizados mexilhões da espécie *Perna perna*. Os animais foram provenientes de cultivo em coletores artificiais de sementes por um período de 10 ± 2 meses. Os mexilhões foram coletados nas áreas de cultivo localizadas na praia Armação da Piedade, município de Governador Celso Ramos, Santa Catarina, nos meses de janeiro de 2011 a agosto de 2011.

4.4.1. Preparo das amostras

Os mexilhões coletados foram levados a planta processadora da indústria, onde passaram pelo processo descrito na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma de preparo das amostras



Fonte: Autor

4.5. TRATAMENTOS

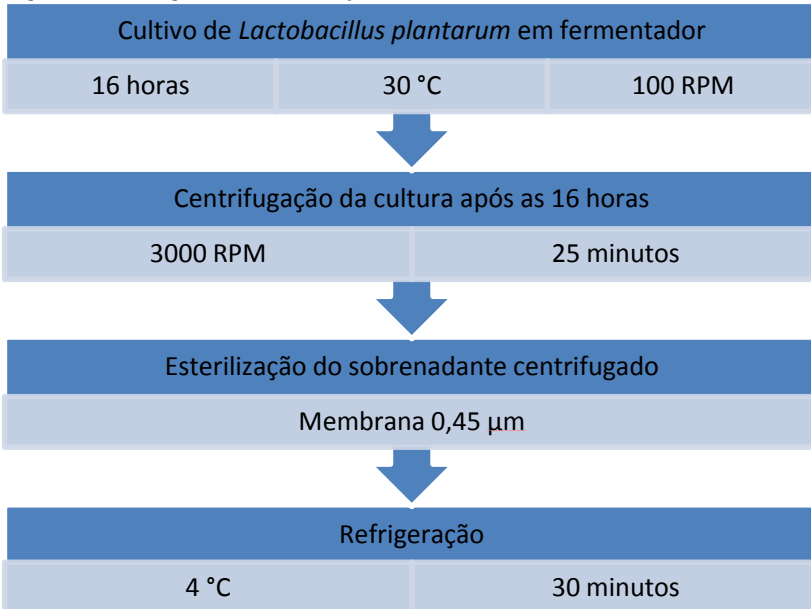
Foram utilizados 3 tratamentos (A, B e C) com duas repetições, aplicados as amostras de mexilhões.

4.5.1. Tratamento A – Caldo com Bacteriocinas

Após 16 horas de cultivo o caldo com bacteriocinas foi assepticamente retirado do fermentador, em sala asséptica, e transferido para um erlenmeyer de 3 litros previamente esterilizado. Deste erlenmeyer foi retirada uma alíquota para contagem do número de colônias viáveis.

O caldo foi centrifugado durante 25 minutos a 3.000 rpm, em centrífuga (Janetski, modelo S60). O sobrenadante foi esterilizado por filtração, em membranas filtrantes de éster de celulose (47 mm e 0,45 µm, Millipore, Bedford, USA). O filtrado foi conservado sob refrigeração durante 30 minutos ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) para posterior aplicação nos mexilhões e teste de detecção de bacteriocinas. A elaboração do caldo com bacteriocinas está sintetizado na Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma de elaboração de caldo com bacteriocinas



Fonte: Autor

4.5.1.1. Teste para verificação da presença de bacteriocinas

A presença de bacteriocinas no filtrado foi detectada utilizando a técnica de difusão em poços (*well diffusion assay*) (LEWUS e MONTVILLE, 1991). Alíquotas de 10 mL foram neutralizadas a pH 7,0 com NaOH 1 N e filtradas em membrana (0,45 μm). Em placas contendo caldo BHI com 1% de Agar, semeadas com *Lactobacillus sakei* (micro-organismo indicador, 10^4 a 10^5 UFC/mL), foram perfurados poços com aproximadamente 5 mm de diâmetro e inoculados com 40 μL do sobrenadante neutralizado e filtrado. As placas foram incubadas em anaerobiose (jarras Probac, 2,5 L e gerador de anaerobiose Anaerogen) a 30 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram observadas quanto à presença de halo de inibição em torno dos poços para comprovar a presença de bacteriocinas.

4.5.2. Tratamento b – Solução de ácido láctico

Foi preparada uma solução aquosa (6% v/v) de ácido láctico (Vetec). A concentração foi definida de acordo com FIORENTINI (1999). A solução foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose (0,45 μm) e conservada sob refrigeração (4 °C \pm 1 °C) durante 30 minutos.

4.5.3. Tratamento c – Solução de hipoclorito de sódio – NaClO – Água hipoclorada

Foi preparado uma solução aquosa (5 mg/L de hipoclorito de sódio) empregando o produto NIPPO-CLOREX (utilizado em frigoríficos, laticínios e indústrias alimentícias em geral para hipocloração da água de abastecimento) da empresa Nippon Chemical. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose (0,45 μm) e conservada sob refrigeração (4 °C \pm 1 °C) durante 30 minutos.

4.5.4. Tratamento d – Controle

Consistiu de água destilada esterilizada a 121 °C por 15 minutos.

4.6. APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS NOS MEXILHÕES DESCONCHADOS

Os procedimentos abaixo descritos foram realizados em sala asséptica.

As amostras de mexilhões previamente preparadas foram submetidas a um banho por imersão, nas soluções dos respectivos tratamentos, utilizando sacos de polietileno do tipo stomacher, esterilizados (Figura 9).

Figura 9 - Imersão dos mexilhões em solução controle



Fonte: autor

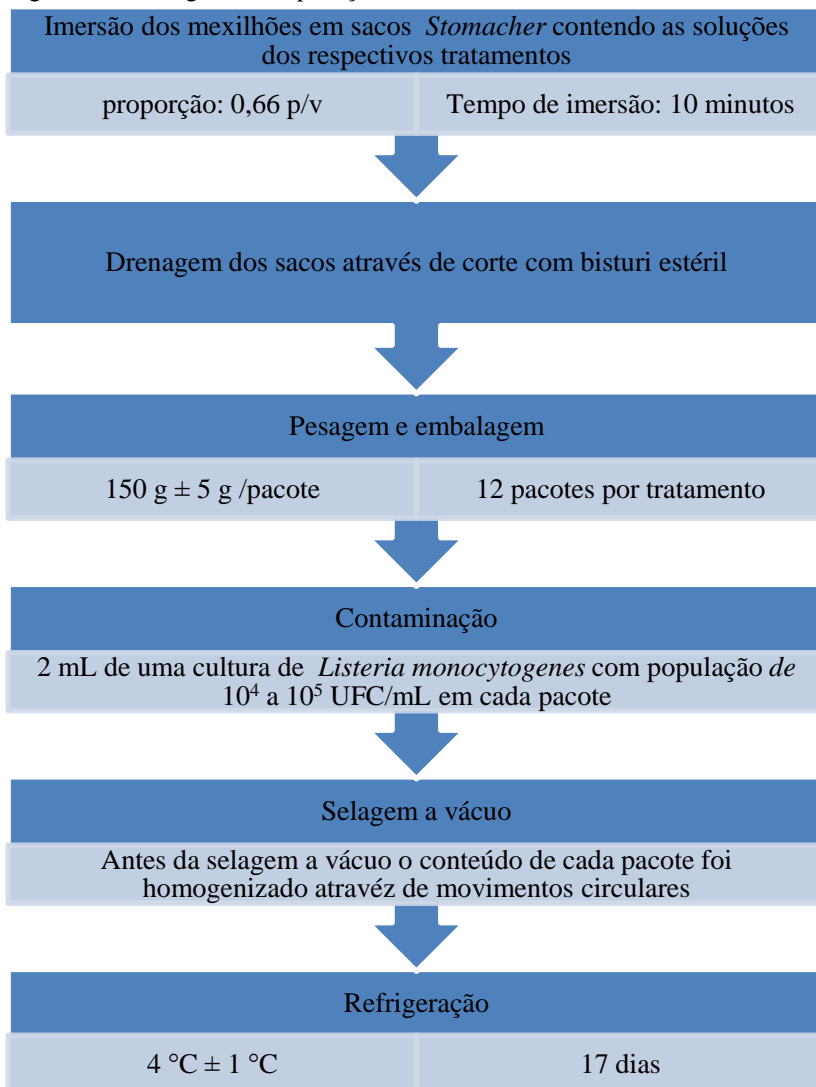
Para cada tratamento foram utilizados 2 kg de amostra e 3 litros de solução, resultando na proporção de 0,66 peso/volume.

Após 10 minutos de imersão a solução foi drenada através de um corte no saco utilizando uma lâmina de bisturi previamente esterilizada. Os mexilhões foram pesados em balança digital de precisão (Marte, modelo AS 2000C) acondicionados em sacos (12 por tratamento) de polietileno do tipo stomacher (estéreis) com peso final de $150 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$ de mexilhões por saco, totalizando 1800 g de amostra por tratamento.

Em cada uma das 12 amostras de cada tratamento foram inoculados 2 mL de uma cultura de *Listeria monocytogenes* com população de 10^5 UFC/ml. Após a contaminação das amostras, os sacos foram homogeneizados através de massagem manual, selados em seladora a vácuo, identificados e armazenados em refrigerador

termostatzado ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos, para análises posteriores. A aplicação dos tratamentos nos mexilhões desconchados está sintetizada na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma de aplicação dos tratamentos nas amostras



Fonte: Autor

4.7. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

As amostras foram submetidas a análises físico-químicas e microbiológicas seguindo cronograma conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Análises realizadas nas amostras, após aplicação dos tratamentos, ao longo de 17 dias de armazenamento sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)

ANÁLISES	DIA					
	0	3	6	10	13	17
MICROBIOLÓGICAS	0	3	6	10	13	17
Contagem de Psicrófilos ($7\text{ }^{\circ}\text{C}$)	x	x	x	x	x	x
Contagem de coliformes a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$	x	x	x	x	x	x
Contagem de mesófilos anaeróbios	x	x	x	x	x	x
<i>Listeria spp</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Salmonella spp</i>	x	x	x	x	x	x
FÍSICO-QUÍMICAS	0	3	6	10	13	17
pH (potencial hidrogeniônico)	x	x	x	x	x	x
Acidez em solução normal (NaOH)	x	x	x	x	x	x
Bases voláteis totais	x	x	x	x	x	x

Fonte: Autor

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises – LABCAL, do Departamento Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com os métodos indicados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2009). As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os métodos indicados pela American Public Health Association.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi efetuada pelo sistema Statistica 7.0. Os resultados referentes às análises microbiológicas e físico-químicas no tempo inicial (dia 0) e ao longo de 17 dias de estocagem a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram submetidos ao teste F para contrastes dos coeficientes angulares e lineares, com 5% de significância ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

A produção de bacteriocinas por *Lactobacillus plantarum* foi detectada através do teste de difusão em poços (*well diffusion assay*). Foi observada a formação de zonas de clareamento em torno dos poços contendo o micro-organismo produtor (*Lactobacillus plantarum*), indicando a produção de bacteriocinas e conseqüentemente a inibição do micro-organismo indicador (*Lactobacillus sakei*).

A fim de excluir outras substâncias causadoras de efeito inibitório, como ácido láctico e peróxido de hidrogênio, algumas medidas foram adotadas. Para a diminuição da formação de ácidos, foi utilizado o meio de cultura BHI o qual possui baixo teor de glicose e outros açúcares fermentescíveis. A utilização de *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 como micro-organismo indicador também diminuiu a possibilidade de inibição por ácido, pois este micro-organismo é acidúrico. A incubação das placas em anaerobiose reduziu a inibição devido à produção de peróxido de hidrogênio.

Segundo McMullen e Stiles (1996), para uma efetiva bioconservação, o organismo deve crescer e produzir substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas em carnes, e ter características psicotróficas. Estes dados acentuam a tese de que as bactérias lácticas, originalmente isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las, serão provavelmente as mais úteis por serem mais bem adaptadas, o que lhes confere uma vantagem competitiva quando comparadas as bactéria lácticas de outras origens (GARCIA et al., 1995; MCMULLEN e STILES, 1996).

5.2. EFEITO DOS TRATAMENTOS NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE MEXILHÕES *Perna perna* DESCONCHADOS

Neste trabalho, consideramos a inibição do crescimento bacteriano, condição fundamental para a promoção da qualidade nos mexilhões desconchados refrigerados. Utilizando-se desta premissa, o presente trabalho analisou o crescimento e inibição dos micro-organismos nos mexilhões no decorrer de 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Os micro-organismos psicrófilos são definidos como micro-organismos adaptados ao frio que se desenvolvem entre 0 e 20 °C, com temperatura ótima de crescimento entre 10 e 15 °C (FRANCO & LANDGRAF, 2005; BOURGEOIS et al. (1988) apud FRANÇA FILHO et al. 2006). E, possuem uma amplitude de temperatura de crescimento de -8 °C a 25 °C (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

Após a imersão da matéria prima nos tratamentos, à contagem inicial de micro-organismos psicrófilos foi de 3,69 log₁₀, 0,50 log₁₀, 3,68 log₁₀, 3,78 log₁₀, para os tratamentos A, B, C e D respectivamente, indicando qualidade sanitária aceitável dos mexilhões.

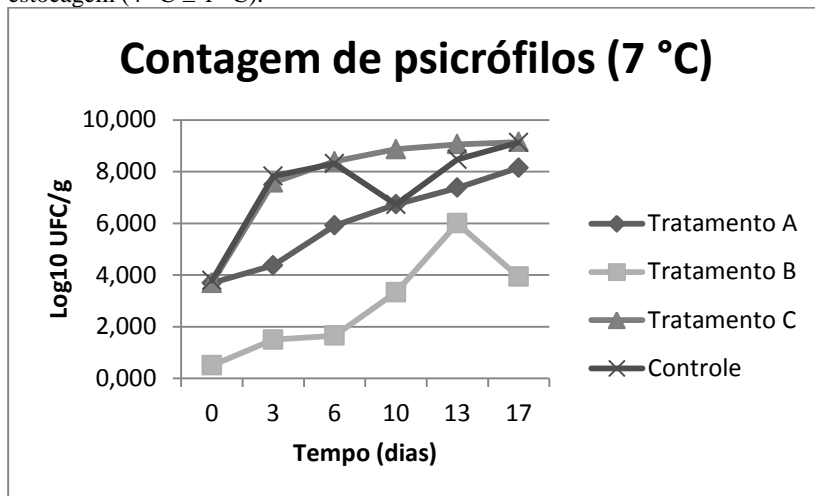
Após 3 dias de armazenamento, houve um aumento de 1,00, 3,89 e 4,04 ciclos logarítmicos nas amostras submetidas aos tratamentos B, C e D respectivamente, enquanto que no tratamento A houve um aumento de 0,68 ciclos logarítmicos em relação ao tempo inicial.

No sexto dia de armazenamento os valores das contagens do tratamento A, já conferiam qualidade marginal às amostras (5,91 Log₁₀ em média), enquanto que os tratamentos C e D apresentavam contagens elevadas indicando estágio de deterioração avançada (8,40 Log₁₀ e 8,31 Log₁₀ respectivamente). O tratamento B, ao sexto dia de armazenamento apresentou população de 1,65 Log₁₀, indicando baixa deterioração e pouca multiplicação destes micro-organismos nas amostras.

Estes resultados evidenciaram a possibilidade de problemas de contaminação da matéria-prima em função da água de cultivo e/ou do produto, devido às condições de processamento. A avaliação da carga microbiana permite descobrir se o produto está ou não susceptível a uma contaminação incipiente, que ocorre a partir de uma carga de 6 Log₁₀ UFC/g de psicrófilos e psicrotróficos. Isso significa que o alimento ainda não está deteriorado, mas está no limite para o início desse processo. Ao ultrapassar esse limite, a degradação é muito rápida. Entretanto, a velocidade da degradação depende do tipo de alimento, e pode ocorrer dentro de um dia ou dois para alimentos perecíveis, atingindo níveis de 8 Log₁₀ UFC/g (FRANÇA FILHO et al., 2006).

Ao décimo dia de armazenamento as contagens de psicrófilos sofreram leve acréscimo nos tratamentos A, B e C (0,82, 1,68 e 0,47 ciclos logarítmicos respectivamente) sendo que no tratamento D foi identificado um pequeno decréscimo (1,58 ciclos logarítmicos). Os demais resultados das contagens de micro-organismos psicrófilos realizadas estão demonstrados na Tabela 3. As curvas de crescimento destes micro-organismos para os 4 tratamentos testados estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11 - Contagem (Log_{10} UFC/g) de micro-organismos psicrófilos em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Autor

Através da análise estatística podemos identificar diferença significativa ao nível de 5 % ($P < 0,05$) na contagem inicial de micro-organismos psicrófilos no tratamento A para com o B e no tratamento B para com o C e D. Em relação à redução da carga bacteriana ao longo tempo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ao longo dos 17 dias de estocagem. No Quadro 1 estão apresentadas as diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação aos psicrófilos.

Quadro 1 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação a contagem de micro-organismos psicrófilos.

TRATAMENTO	COEFICIENTE ANGULAR	COEFICIENTE LINEAR
A	0,268304 a	3,845863 a
B	0,268207 a	0,628070 b
C	0,262942 a	5,640060 a
Controle	0,219656 a	5,577002 a

Fonte: autor

Nota: Coeficientes com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste F (Contrastes) ao nível de significância de 5 % ($P < 0,05$)

O coeficiente linear representa o valor onde a reta de crescimento encontra o eixo Y (valores das contagens em \log_{10} UFC/g), ou seja, representa o valor no tempo 0 corrigido estatisticamente. O coeficiente angular representa o teor de inclinação da reta e sua orientação (negativo ou positivo), ou seja, representa a variação dos valores das contagens dos micro-organismos ao longo do tempo.

Em relação aos micro-organismos mesófilos anaeróbios, as contagens iniciais apresentaram uma população de $5,62 \log_{10}$, $3,25 \log_{10}$, $6,17 \log_{10}$ e $6,47 \log_{10}$ para os tratamentos A B C e D respectivamente.

Ao longo dos 17 dias de armazenagem, os tratamentos C e D apresentaram pouca variação nas contagens de mesófilos anaeróbios com valores variando entre $6,17 \log_{10}$ e $8,30 \log_{10}$ para o tratamento C e entre $6,47 \log_{10}$ e $8,20 \log_{10}$ para o tratamento D, indicando pouca eficiência destes tratamentos no combate a estes micro-organismos.

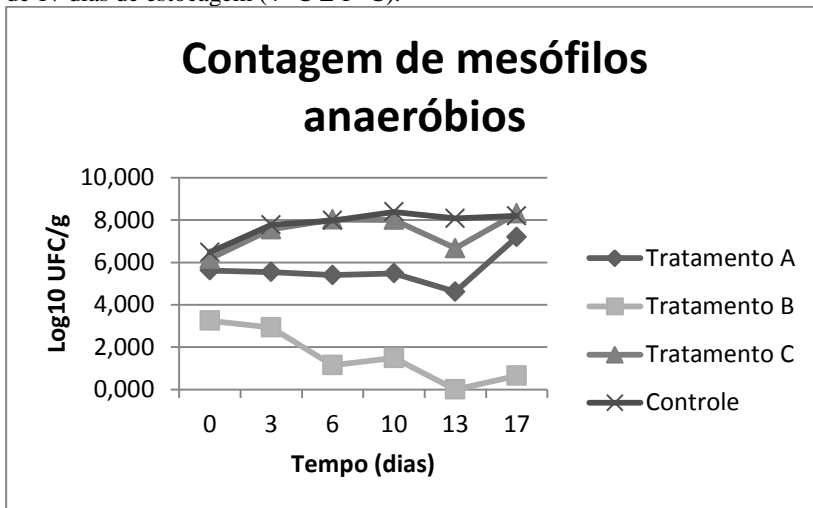
No tratamento A, a maior diferença pode ser observada entre o dia 13 e o dia 17 onde os valores variaram entre $4,62 \log_{10}$ e $7,19 \log_{10}$ apresentando uma leve ascensão. Apesar dos valores das contagens no 17º dia de estocagem apresentarem-se mais baixos que os valores dos tratamentos C e D em aproximadamente 0,88 ciclos logarítmicos, estatisticamente não foi observada diferença significativa para os tratamentos A, C e D, em relação à diminuição nas contagens, demonstrando baixa eficiência do caldo de bacteriocinas no combate as bactérias mesófilas anaeróbias.

De acordo com os resultados das análises, podemos constatar que o tratamento B foi o único dentre os testados que demonstrou efeito bactericida significativo ao nível de 5% ($P < 0,05$) reduzindo as contagens de bactérias mesófilas anaeróbias nas amostras ao longo do tempo e apresentado contagem média ao fim do 17º dia de estocagem de $0,65 \log_{10}$ UFC/g, aproximadamente 6,54 ciclos logarítmicos abaixo do tratamento A e 7,54 ciclos logarítmicos abaixo do tratamento D (controle). A tabela 4 resume as diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação aos mesófilos anaeróbios.

A Legislação atual não estabelece valores limites para o crescimento de psicrófilos e psicrotróficos em alimentos, porém a presença desse tipo de micro-organismo serve como referência para mostrar a capacidade de deterioração microbiana de pescado, por exemplo, através de processos proteolíticos, que reduz a sua vida útil, mesmo a baixas temperaturas (SANTOS, 2006).

As curvas de crescimento destes micro-organismos para os 4 tratamentos testados estão apresentadas na Figura 12.

Figura 12 - Contagem (Log₁₀ UFC/g) de micro-organismos mesófilos anaeróbios em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem (4 °C ± 1 °C).



Fonte: Autor

No Quadro 2 estão apresentadas as diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação aos psicrófilos.

Quadro 2 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação à contagem de micro-organismos mesófilos anaeróbios.

TRATAMENTO	COEFICIENTE ANGULAR	COEFICIENTE LINEAR
A	0,047446 a	5,254605 a
B	-0,176078 b	3,017300 b
C	0,066187 a	6,915394 c
Controle	0,081409 a	7,147688 c

Coefficientes com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste F (contrastes) ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$)

Os resultados das contagens de micro-organismos mesófilos anaeróbios realizadas estão demonstrados na Tabela 4.

A presença de coliformes serve como um indicador higiênico-sanitário do alimento, refletindo a qualidade da água de cultivo. Os

efeitos da contaminação bacteriana sobre os moluscos ainda é pouco conhecido, pois é específico para cada espécie de mexilhão e região de produção (PEREIRA et al., 2009). A presença de coliformes de origem fecal poderia ter correlação com a ocorrência de víbrios, embora este último seja natural do ambiente marinho (VIEIRA et al., 1997 apud PEREIRA et al., 2009). HENRIQUES et al. (2003, 2006, 2007) apud PEREIRA et al. (2009) tratam da possível influência da contaminação de mexilhão por coliformes no tempo de resistência do mexilhão à exposição ao ar, baixas salinidades e altas temperaturas da água.

No presente estudo, as contagens de coliformes a 45 °C e *Staphylococcus aureus* realizadas nas amostras, nos 3 tratamentos e no Controle, nas 2 repetições do experimento e no decorrer dos 17 dias de estocagem sob refrigeração, apresentaram valores inferiores a 1 Log₁₀ UFC/g, bem como as análises de *Salmonella* spp. apresentaram ausência em 25 g. Isto reflete a qualidade da água de cultivo dos mexilhões, bem como as condições higiênico-sanitárias durante a manipulação da matéria-prima, até a embalagem do produto final.

A bactéria *Staphylococcus aureus* é frequentemente pesquisada em alimentos processados. Os alimentos que em geral estão envolvidos em intoxicações estafilocócicas, são os que apresentam elevado teor protéico, altas concentrações de sal ou foram termicamente processados e posteriormente contaminados por manipuladores (Bryan, 19730)

A International Commission on Microbiological specifications for Foods - ICMSF (1998) recomenda à indústria de alimentos a utilização de matérias primas com condições iniciais adequadas, pois falhas no processamento podem determinar a sobrevivência de micro-organismos patogênicos de importância em saúde pública. PEREIRA et al. (2004) afirmaram que a contaminação inicial de mexilhões resulta também em produtos contaminados, mesmo quando submetidos aos processos de conservação. Essa contaminação, muitas vezes, não é eliminada por simples processos de conservação (MANOUSARIDIS et al., 2005).

Cordeiro et al., (2007) encontraram contagens de coliformes termotolerantes de 0,9 NMP/g para mexilhão cozido, ausência de coliformes e de *Salmonella*, 1 Log₁₀ UFC/g de estafilococos coagulase positivo e 1,49 Log₁₀ UFC/g de psicotróficos para mexilhões cozidos, congelados e estocados durante 90 dias .

O limite estabelecido pela Legislação (BRASIL, 2001) é de até 3 Log₁₀ UFC/g de estafilococos coagulase positiva para moluscos bivalves. Portanto, quanto a esse critério, as amostras analisadas estão dentro dos limites. Esse micro-organismo não faz parte da microbiota

natural de moluscos e crustáceos, mas pode ser incorporada a estes em virtude do contato com água contaminada ou por manipulação inadequada após a captura (JACABI et al. 1999, apud FARIAS, 2006).

FREITAS et al. (2006) apontam que no Rio de Janeiro 53,3% dos mexilhões cozidos não atendem à legislação, e concluem que o ambiente do qual o mexilhão provém interfere na carga microbiana, representando risco de infecções intestinais e de contaminação cruzada de equipamentos.

A incidência de *Salmonella* spp em frutos do mar é maior em países do Pacífico Central e da África (12 %), e menor na Europa (2 %), incluindo a Rússia e América do Norte (PONCE et al., 2008). Ribeiro et al., (2009) confirmam que o pescado é um veículo muito menos freqüente de *Salmonella* spp do que outros produtos, sendo o peixe e os mariscos responsáveis apenas por uma pequena percentagem do número total de casos de *Salmonella* spp. notificados nos Estados Unidos e em outros países. Fatores como a deposição de dejetos na água, bem como a temperatura desta, influenciam a presença desse micro-organismo. No Brasil a incidência de *Salmonella* spp em frutos do mar não é possível ser determinada com exatidão, pois apenas 10% do total de casos de surto alimentar são notificados, além da dificuldade em detectar o diagnóstico (SHINOHARA et al., 2008)

No decorrer do tempo de armazenagem, no presente estudo, as análises de *Listeria* spp. demonstraram a presença em 25 g. deste patógeno em todos os tratamentos, durante todos os períodos analisados, indicando a ineficiência dos tratamentos para impedir a sobrevivência de *Listeria* spp. nas amostras. Não foi possível a quantificação por número mais provável (NMP) de *Listeria* spp devido ao método utilizado nas análises, o qual expressa o resultado como ausência/presença em 25 gramas.

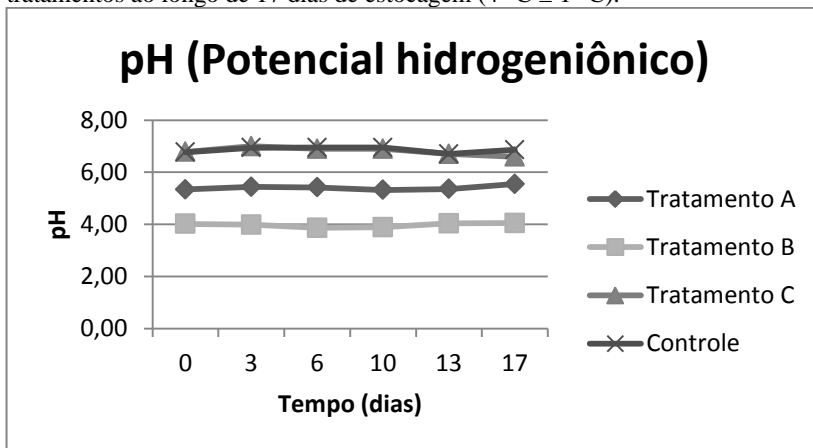
Os valores de pH estabelecidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1980), para pescado e derivados são inferiores a 6,5 na parte interna da carne e a 6,8 na parte externa da carne. Os valores encontrados ao final do 17º dia de estocagem foram de 5,5; 4,0; 6,6 e 6,8 para os tratamentos A, B, C e D respectivamente. Considerando que não há limites de pH estabelecidos exclusivamente para mexilhões e que o método utilizado para quantificar essa variável utiliza a parte interna e externa da carne simultaneamente, são aceitáveis os valores de pH obtidos neste trabalho, os quais encontram-se dentro da faixa estabelecida. Cabe salientar a necessidade de estudos específicos quanto aos limites de pH para moluscos bivalves, pois estes possuem

composição centesimal diversificada quando comparada a de outras espécies de pescado, e provavelmente, a decomposição e alteração do pH ocorrem de forma diferente. GALVÃO et al., (2006).

Os alimentos ricos em proteínas como as carnes e frutos do mar, apresentam degradação mais rápida e evidente, por serem altamente nutritivos, apresentarem alto conteúdo de umidade e pH próximo da neutralidade (HUIS IN'T VELD, 1996). O pH do alimento é um fator muito importante para a sua conservação, em consequência disto, tendo o pescado um pH próximo da neutralidade, este propicia o desenvolvimento tanto de microrganismos deterioradores quanto de patógenos, portanto, a matéria-prima requer cuidados especiais em sua conservação. GALVÃO et al., (2006) .

Os valores encontrados para o pH inicial nos tratamentos C e D estão de acordo com os valores iniciais obtidos por Salán (2005) para mexilhões processados, que variaram de 5,8 a 7,1, por outro lado, estão abaixo dos valores obtidos por Cordeiro et al., (2007), de 6,9 para mexilhões submetidos à cocção. Os valores iniciais de pH para os tratamentos A e B estão abaixo dos obtidos por Salán (2005) e por Cordeiro et al., (2007). Os valores obtidos para o pH em todos os tratamentos ao longo dos 17 dias de armazenagem estão sintetizados na Figura 13.

Figura 13 - Valores de pH em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Autor

Os valores de pH ao longo dos 17 dias de armazenagem estão sintetizados na Tabela 7. Os tratamentos testados no presente estudo não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à variação dos valores no decorrer do tempo. As diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação ao pH estão demonstradas no Quadro 3.

Quadro 3 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação aos valores de pH.

TRATAMENTO	COEFICIENTE ANGULAR	COEFICIENTE LINEAR
A	0,006039 a	5,355678 a
B	0,002975 a	3,952375 b
C	-0,015546 a	6,940296 c
D	-0,002375 a	6,881060 c

Coefficientes com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste F (contrastes) ao nível de significância de 5 % ($P < 0,05$).

VERGARA et al. (2003) e GOULAS e KONTOMINAS (2005) relataram que o tempo de armazenamento pode causar diferenças no pH de produtos cárneos. A decomposição de compostos nitrogenados, como amônia, tende a elevar o valor do pH (SIKORSKI, KOLAKOWSKA e BURT, 1994; RUIZ-CAPILLAS e MORAL, 2001) muitas vezes indicando perda da qualidade do produto (GÖKOLU, CENGIZ e YERLIKAYA, 2004).

Erkan (2005) estudou as mudanças na qualidade de mexilhão cozido da espécie *Mytilus galloprovincialis* durante o armazenamento em refrigeração a 4 °C, e obteve uma redução não significativa do pH em 6 dias de armazenamento (5,96 para 5,89), e não conseguiu correlacionar a variação de pH com a qualidade sensorial do produto (SOMBRIO et al.).

O coeficiente linear representa o valor onde a reta encontra o eixo Y (valores das análises), ou seja, representa o valor das análises no tempo 0 corrigido estatisticamente. O coeficiente angular representa o teor de inclinação e a sua orientação (negativo ou positivo), ou seja, representa a variação das análises de pH ao longo do tempo.

O mexilhão, como os demais tipos de pescado, é um produto de baixa acidez. Os dados de pH não são suficientes para determinar o frescor, de forma que outras análises são necessárias para complementar as condições físico-químicas do produto (FURLAN et al., 2007). Neste trabalho os valores de acidez se mostraram mais elevados no tratamento

B devido à aplicação da solução de ácido láctico nos mexilhões. No tratamento A os valores de acidez encontrados foram mais baixos que os do tratamento B, porém mais elevados que nos tratamentos C e D, este fato ocorreu devido ao caldo fermentado de bacteriocinas conter ácido láctico proveniente da fermentação dos carboidratos no cultivo da bactéria láctica *Lactobacillus plantarum*. A variação nos valores de acidez no decorrer do tempo não apresentou diferença significativa ao nível de 5 % ($P < 0,05$) para os tratamentos testados. No Quadro 4 estão demonstradas as diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação à acidez.

Quadro 4 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação aos valores de Acidez.

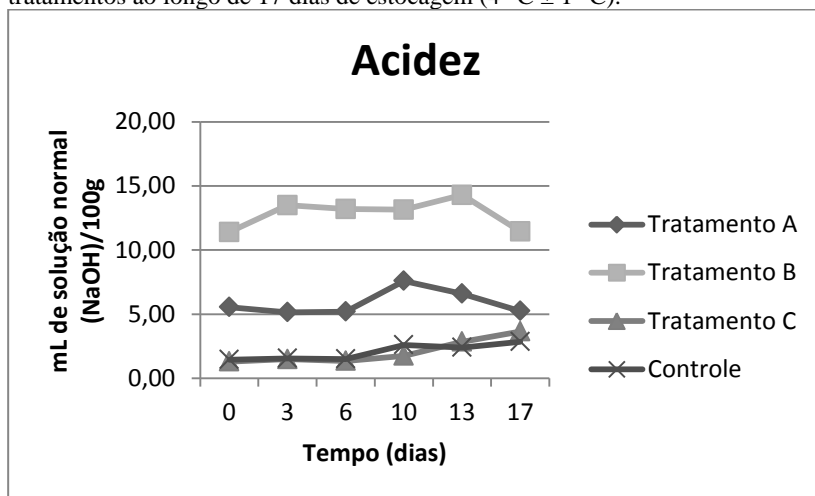
TRATAMENTO	COEFICIENTE ANGULAR	COEFICIENTE LINEAR
A	0,04441 a	5,52896 a
B	0,01438 a	12,71590 b
C	0,13797 a	0,93824 c
D	0,09092 a	1,31582 c

Coefficientes com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste F (contrastes) ao nível de significância de 5 % ($P < 0,05$)

Os tratamentos testados no presente estudo não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à variação dos valores de acidez em solução normal no decorrer do tempo. Os valores obtidos para acidez em solução normal ao longo dos 17 dias de armazenagem estão sintetizados na Figura 14.

Os valores de médios de acidez em solução normal e os valores das duas repetições do experimento estão sintetizados na Tabela 5.

Figura 14 - Valores de Acidez em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Autor

RUIZ-CAPILLAS e MORAL (2001), SCHERER et al. (2004) e MANOUSARIDIS et al. (2005) afirmaram que os teores de bases voláteis totais (N-BVT), assim como o pH, são indicadores de qualidade do pescado. SIMÕES et al. (1998) afirmaram que o uso dos teores de N-BVT como indicativo das alterações do pescado implica em considerar que ocorre o desdobramento das proteínas do pescado, resultando na formação de produtos de degradação nitrogenados com menor massa molar (tais como, amônia, aminas ou indol).

A deterioração do pescado estocado sob refrigeração é devida à ação enzimática e bacteriana e resulta na produção de vários compostos, sendo os mais frequentes: trimetilamina, dimetilamina, amônia e ácidos voláteis. A porcentagem de bases voláteis pode ser uma indicação do grau de conservação do pescado, dependendo da espécie. Normalmente, para espécies como cações, raias, siris, o valor de BVT é elevado sem que, necessariamente, estejam deterioradas.

Todos os teores de bases voláteis totais (N-BVT) (Tabela 11) obtidos, estavam abaixo do limite máximo estipulado pela legislação vigente (BRASIL, 1997) para pescados e derivados (teores menores do que 30 mg e 25 mg de N-BVT/100 g do produto, respectivamente). Também ficaram abaixo dos teores determinados por KYRANA e LOUGOVOIS (2002). GÖKOLU, CENGIZ e YERLIKAYA (2004) encontraram resultados similares, com aumento nos teores de N-BVT de

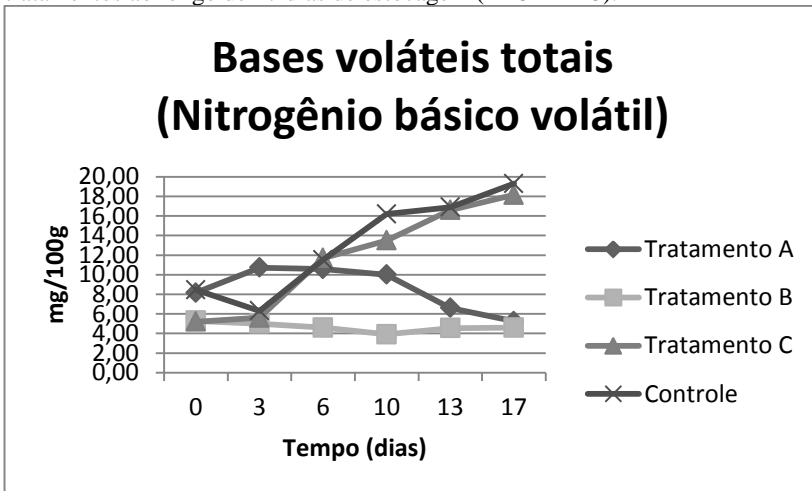
8,3 mg/100 g para 15,1 mg N-BVT/100 g em anchovas marinadas em solução de ácido acético a 2% estocadas por 150 dias. O mesmo comportamento foi verificado por JESUS, LESSI e TENUTA-FILHO (2001) para peixes amazônicos armazenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 150 dias.

Os teores de bases voláteis totais (N-BVT) indicam que não houve grande liberação de amônia e outras aminas voláteis decorrentes de danos no tecido, evidenciando bom estado de conservação. Comportamentos semelhantes foram observados por CASTRO et al. (2006).

Os valores de médios de bases voláteis totais (N-BVT) e os valores das duas repetições do experimento estão sintetizados na Tabela 6. Os tratamentos A e B não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre si, em relação à variação dos valores em função do tempo, bem como os tratamentos C e D. Os tratamentos A e B apresentaram diferença significativa ao nível de 5 % em relação aos tratamentos C e D, em função do tempo. As diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação às bases voláteis totais (N-BVT) estão demonstradas no quadro 6.

Os valores obtidos para bases voláteis totais (N-BVT) ao longo dos 17 dias de armazenagem estão sintetizados na Figura 15.

Figura 15 - Valores de Acidez em mexilhões desconchados, submetidos aos tratamentos ao longo de 17 dias de estocagem ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Autor

Quadro 5 - Comparação entre os coeficientes angular e linear. Diferenças estatísticas dos tratamentos em relação aos valores de N-BVT.

TRATAMENTO	COEFICIENTE ANGULAR	COEFICIENTE LINEAR
A	-0,23782 a	10,49055 a
B	-0,04589 a	5,03311 b
C	0,83102 b	5,00501 b
D	0,76589 b	6,85689 ab

Coeficientes com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste F (contrastes) ao nível de significância de 5 % ($P < 0,05$)

6. CONCLUSÃO

A aplicação do caldo de bacteriocinas nas amostras foi eficiente na redução inicial da carga bacteriana de mesófilos aeróbios viáveis, e podemos afirmar que a redução ao longo dos 17 dias de estocagem em refrigeração foi estatisticamente significativa em relação aos tratamentos.

A solução de ácido láctico a 6% foi o tratamento mais eficiente na redução da carga microbiana inicial de psicrófilos e de mesófilos, nos quais foi também mais eficiente na redução no decorrer do tempo de refrigeração.

O tratamento A manteve a qualidade microbiológica aceitável para o consumo até o período entre o 7º dia e o 10º dia. Este resultado também pode ser alcançado pelo tratamento b, porém com uma acidificação do meio mais pronunciada.

A solução de hipoclorito de sódio (tratamento C) não se mostrou eficiente na redução da carga bacteriana, não diferindo estatisticamente da solução controle com água destilada, acendendo um alerta para as indústrias alimentícias as quais utilizam este tratamento como medida profilática antibacteriana.

Os valores de N-BVT mais elevados foram identificados nos tratamentos C e D, provavelmente devido à maior multiplicação bacteriana, causadora de deterioração precoce nas amostras e liberação do nitrogênio através das bases voláteis.

Os valores de pH não variaram significativamente. Foram encontrados valores menores para os tratamentos B e A respectivamente, devido à acidificação das amostras em virtude da quantidade de ácido láctico adicionado na solução do tratamento B e do ácido láctico (em menor quantidade) produzido por *Lactobacillus plantarum* no caldo MRS para produção de bacteriocinas (tratamento A).

Em relação à *Listeria monocytogenes* podemos concluir que a aplicação do tratamento A contendo bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 não foi eficaz para inativação deste patógeno, nas condições deste experimento.

7. APÊNDICE

Tabela 3 - Contagem (Log10 UFC/mL) de micro-organismos psicrófilos em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo (dias)	Tratamentos	Repetição 1	Repetição 2	Médias*
0	A	2,30	5,08	4,78
	B	< 1,0	1,00	0,70
	C	3,11	4,26	3,98
	D	3,15	4,41	4,14
3	A	4,40	4,34	4,37
	B	2,00	1,00	1,74
	C	6,90	8,26	7,97
	D	7,23	8,41	8,14
6	A	6,36	5,46	6,11
	B	2,30	1,00	2,02
	C	8,68	8,11	8,48
	D	8,67	7,94	8,44
10	A	7,04	6,41	6,83
	B	4,36	2,30	4,06
	C	8,97	8,76	8,88
	D	8,84	4,61	8,54
13	A	7,45	7,30	7,38
	B	6,00	6,00	6,00
	C	9,11	9,00	9,06
	D	8,61	8,32	8,49
17	A	7,76	8,53	8,30
	B	4,90	2,95	4,61
	C	9,08	9,20	9,15
	D	9,04	9,20	9,13

* Média das 2 repetições

Fonte: Autor

Tabela 4 - Contagem (Log₁₀ UFC/mL) de micro-organismos mesófilos anaeróbios em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração (4 °C ± 1 °C).

Tempo (dias)	Tratamentos	Repetição 1	Repetição 2	Médias*
0	A	5,26	5,99	5,62
	B	2,72	3,79	3,25
	C	5,57	6,78	6,17
	D	6,08	6,86	6,47
3	A	5,04	6,04	5,54
	B	2,32	3,54	2,93
	C	7,04	8,08	7,56
	D	7,43	8,11	7,77
6	A	5,23	5,57	5,40
	B	2,30	0,00	1,15
	C	7,92	8,11	8,02
	D	8,11	7,84	7,98
10	A	5,00	5,96	5,48
	B	0,00	2,98	1,49
	C	7,94	8,08	8,01
	D	8,46	8,30	8,38
13	A	4,76	4,48	4,62
	B	0,00	0,00	0,00
	C	6,81	6,53	6,67
	D	8,11	8,04	8,08
17	A	6,60	7,78	7,19
	B	0,00	1,30	0,65
	C	8,04	8,57	8,30
	D	8,48	7,91	8,20

* Média das 2 repetições

Fonte: Autor

Tabela 5 - Valores de acidez em solução normal (NaOH) em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo (dias)	Tratamentos	Repetição 1	Repetição 2	Médias*
0	A	4,30	6,20	5,25
	B	10,40	12,40	11,40
	C	5,00	1,40	3,20
	D	1,40	1,50	1,45
3	A	4,50	5,80	5,15
	B	15,30	11,70	13,50
	C	5,90	1,39	3,65
	D	1,50	1,60	1,55
6	A	4,60	5,80	5,20
	B	15,00	11,40	13,20
	C	14,30	1,20	7,75
	D	1,60	1,40	1,50
10	A	5,40	9,80	7,60
	B	15,00	11,30	13,15
	C	16,70	1,40	9,05
	D	2,70	2,50	2,60
13	A	6,00	7,20	6,60
	B	15,90	12,70	14,30
	C	4,00	1,70	2,85
	D	2,40	2,40	2,40
17	A	4,60	5,90	5,25
	B	12,60	10,30	11,45
	C	4,30	3,00	3,65
	D	3,40	2,30	2,85

* Média das 2 repetições

Fonte: Autor

Tabela 6 - Valores de bases voláteis totais (N-BVT) em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias de armazenagem sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo (dias)	Tratamentos	Repetição 1	Repetição 2	Médias*
0	A	5,10	11,20	8,15
	B	5,50	5,10	5,30
	C	5,00	5,40	5,20
	D	11,40	5,50	8,45
3	A	10,80	10,65	10,73
	B	5,60	4,47	5,04
	C	5,90	5,31	5,61
	D	7,40	5,21	6,31
6	A	11,00	10,14	10,57
	B	5,60	3,68	4,64
	C	14,30	9,11	11,71
	D	14,50	8,54	11,52
10	A	11,90	8,10	10,00
	B	4,90	2,90	3,90
	C	16,70	10,30	13,50
	D	20,90	11,50	16,20
13	A	13,90	10,80	12,35
	B	5,40	3,70	4,55
	C	21,10	12,10	16,60
	D	21,50	12,30	16,90
17	A	15,70	12,70	14,20
	B	4,80	4,60	4,70
	C	20,50	15,80	18,15
	D	23,80	14,80	19,30

* Média das 2 repetições

Fonte: Autor

Tabela 7 - Valores de pH (potencial hidrogeniônico) em mexilhões desconchados, após aplicação dos tratamentos, durante 17 dias sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo (dias)	Tratamentos	Repetição 1	Repetição 2	Médias*
0	A	5,5	5,0	5,3
	B	4,0	3,9	4,0
	C	6,6	6,8	6,7
	D	6,6	6,8	6,7
3	A	5,5	5,3	5,4
	B	3,9	4,0	3,9
	C	7,0	6,9	7,0
	D	6,8	7,0	6,9
6	A	5,5	5,2	5,4
	B	3,8	3,9	3,9
	C	6,9	6,9	6,9
	D	6,9	6,9	6,9
10	A	5,5	5,1	5,3
	B	3,8	3,9	3,9
	C	6,8	7,1	6,9
	D	6,8	7,1	6,9
13	A	5,6	5,0	5,3
	B	4,0	3,9	4,0
	C	6,4	6,9	6,6
	D	6,4	6,9	6,7
17	A	5,8	5,3	5,5
	B	4,0	4,0	4,0
	C	6,5	6,7	6,6
	D	6,6	7,0	6,8

* Média das 2 repetições

Fonte: Autor

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HOLY, M.; RUITER, J.; LIN, M.; KANG, D.H.; RASCO, B. Inactivation of *Listeria innocua* in nisin-treated salmon (*Oncorhynchus keta*) and sturgeon (*Acipenser transmontanus*) caviar heated by radio frequency. *Journal of Food Protection*, v. 67, p. 1848 – 1854, 2004.

ANDREU, B. El mejillón en Europa. II – Aspectos biológicos y ecológicos; enemigos y parasitos. *Anais Acad. Bras. Ciênc.*, v. 47, p.23 – 36, 1976.

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

BAYNE, B. L. *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p. 506.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos*. Forvisão: Guimarães, Portugal, 2003. 109 p

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal RIISPOA*. Brasília, DF, 1980. 165 p. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>> Acesso em: 12 fev. 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Resolução CONAMA n° 20*, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação das águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, DF, 30 JUL. 1986.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Resolução – RDC n°12*, de 02 de janeiro de 2001. *Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos em Alimentos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm> Acesso em: 21 jun. 2010.

BRASIL, *Resolução CONAMA n°357*, de 17 de março de 2005. *Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional*. Publicado no D.O.U.

BRASIL. ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997: Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtor/industrializadores de alimentos. 1997.

BRYAN, F. L. Activities of the center of disease control in public health problems related for the consumption of fish and fishery products. In: CHICHESTER, C. O.; GRAHAM, H. D. Microbial Safety of Fishery products. New York: Academic Press. 1973. P. 275-301.

BRILLET, A.; PILET, M.-F.; PREVOST, H.; CARDINAL, M.; LEROI, F. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, v.104, p.309–324, 2005.

BUCIO, A.; HARTEMINK, R.; SCHRAMA, J.W.; VERRETH, J.; ROMBOUITS, F.M. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. *Food Microbiology*, v.23, p.476–482, 2006.

CALO-MATA, P.; ARLINDO, S.; BOEHME, K.; DE MIGUEL, T.; PASCOAL, A.; VELAZQUEZ, J.B. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technology*, v.1, p.43–63, 2007.

CAMPOS, C.A.; RODRÍGUEZ, O.; CALO-MATA, P.; PRADO, M.; BARROS-VELÁSQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International*, v.39, p.356–364, 2006.

CARVAJAL, G. Peligros reales de *Listeria* em productos pesqueros. Infopesca internacional, Montevideo, n.4, p.34 – 38, 2000.

CASTRO, P.; PADRÓN, J. C. P.; CANSINO, M. J. C.; VELÁZQUEZ, E. S.; LARRIVA, R. M. Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, v.17, n.4, p.245–248, 2006.

CEDAP/EPAGRI, Síntese informativa da produção de moluscos em 2009. Florianópolis, 2009.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.2, p.81–100, 2003.

CHILL, D.; MAIDA, N.; CARR, F.J. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, V.28, p.281–370, 2002.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, v.7, p.281–305, 2001,

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v.71, p.1–20, 2001.

COCHÔA, A. R., Perda de sementes de mexilhão *Perna perna* (L., 1758), cultivado na baía Norte – Ilha de Santa Catarina/SC. 45p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2005.

CORDEIRO, D.; LOPES, T. G. G.; OETTERER, M.; PORTO, E. GALVÃO, J. A. Qualidade do Mexilhão *Perna perna* Submetido ao Processo Combinado de Cocção, Congelamento e Armazenamento. *Boletim CEPPA*, Curitiba, v. 25, n.1, p. 165-179, jan.-jun. 2007.

COSTA, R. L. Prevalência de enfermidades e histopatologia de *Perna perna* (Mollusca) em Florianópolis/SC, Brasil. 31p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2007.

DAYTON, P. K., Dispersion, dispersal and persistence of the annual intertidal alga, *Postelsia palmaeformis* Ruprecht. *Ecology*, v.54, p.433 – 38, 1973.

DeGRAAF, J. D.; TYRREL, M. C. Comparison of the feeding rates of two introduced crab species, *Carcinus maenas* and *Hemigrapsus sanguineus*, on the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Northeastern Naturalist*, v.11-2, p.163-166, 2004.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de Alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e sua bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.29, p.114-119, 2003.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. In: De Vuyst, L., Vandamme, E. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp. 1-12. 1994

ELOTMANI, F.; ASSOBBHEI, O. In vitro inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. *Letters of Applied Microbiology*, v.38, p.60-65, 2004.

ENNAHAR, S.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.87 (6), p.705-716, 1999.

FAO, 2005. Disponível em [HTTP://www.fao.org](http://www.fao.org) Acesso em 25/03/2005

FARIAS, M.C.A. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém-Pará . 64P. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, Pará, 2006.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A.R.M. Cultivo de Mexilhões. Em: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. *Aqüicultura – Experiências Brasileiras*. Florianópolis: Multitarefa, 2004, 456 p.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. 1997. Mexilhões, biologia e cultivo. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 58 pp.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A.R.M. O cultivo de mexilhões em Santa Catarina – uma realidade. ENCONTRO CATARINENSE DE AQUICULTURA. Joinville: Anais ACAq – Associação Catarinense de Aquicultura. P.40-42, 1989.

FIORENTINI, A.M. Influências de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN na vida útil de carne bovina refrigerada. 53 p. Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 1999.

FRANÇA FILHO, A. T. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M. V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n. 3, p. 315-325, jul./set. 2006.

FRANCO, B. D. G. M. ; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo :Editora Atheneu, 2005. 196 p

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.

FURLAN, É. F ; GALVÃO, J. A. ; SALÁN, E. O. ; YOKOYAMA, V. A. ; OETTERER, M. Estabilidade físico-química e mercado do mexilhão (*Perna perna*) cultivado em Ubatuba – SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 3, p. 516-523, jul.-set., 2007.

GALVÃO, J. A. ; FURLAN, É. F. ; SALÁN, E. O. ; PORTO, E. ; OETTERER, M. Características Físico-químicas e Microbiológicas

(*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da Água e dos Mexilhões Cultivados na Região de Ubatuba, SP. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.30, n.6, p. 1124-1129, nov./dez., 2006.

GARCIA, T.; MARTIN, R.; SANZ, B.; HERNANDEZ, P. E. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: Envasado em atmosfera modificadas e utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista Española de Ciência y Tecnol. De Alimentos*, v.35, n.1, p.1-18, 1995.

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, v.92, n.3, p.511-520, 2005

GÖKOLU, N.; CENGİZ, E.; YERLIKAYA, P. Determination of the shelf life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4°C. *Food Control*, v.15, n.1, p.1-4, 2004.

GRIFFITHS, R. J. Population dynamics and growth of the bivalve *Choromytilus meridionalis* at different tidal levels. *East Coast Shellfish Science.*, v.12, p.465 – 10, 1992.

GRUPO DE ESTUDOS PESQUEIROS, UNIVALI. Disponível em: <<http://siaiacad04.univali.br/404.html>> Acesso em: 24 ago. 2009.

GUINAME, C. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Microbial solutions for microbial problems; lactococcal bacteriocinas for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.1316 – 1325, 2005.

HAMILTON, D. J.; NUDDS, T. D. Effects of the predation by common eiders (*Somateria mollissima*) in an intertidal rockweed bed relative to an adjacent mussel bed. *Marine Biology*, Berlin, v.142(1), p.1 – 12, 2003.

HAMMES W.P.; BANTLEON A.; MIN S., Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev*, v.87 p.165–174, 1990.

HICKMAN, R. W. Mussel Cultivation. In: GOSLING, E. *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. London: Elsevier, 1992. P.465 – 510.

HOLTZEL, A.; GANZLE, M.G.; NICHOLSON, G.J.; HAMMES, W.P.; JUNG, G. The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. *Angewandte Chemie. International Edition*, v.39, p.2766–2768, 2000.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, v.24, p.343–362, 1995.

INGLIS, G. J., GUST, N. Potential indirect effects of shellfish culture on the reproductive success of benthic predators. *Journal of Applied Ecology*, v.40-6: 1077–1089, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo, 2009.

ITOI, S.; ABE, T.; WASHIO, S.; IKUNO, E.; KANOMATA; SUGITA, H. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology*, v.121, p.116–121, 2008.

JACABI, M. ; BUZZO, A. A. ; RISTORI, C. A. ; TAVECHIO, A. T.; SAKUMA, H.;

PAULA, A. M. R.; GELLI, D. S. Observações Laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* ocorridos na grande São Paulo no período de 1994 a 1997, *Revista do Instituto Adolfo Luz*, São Paulo. v.58, n. 1. p. 47 – 51. fev. 1999.

JESUS, R. S.; LESSI, E.; TENUTA-FILHO, A. Estabilidade química e microbiológica de “minced fish” de peixes amazônicos durante o congelamento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.2, p.144-148, 2001.

KATLA, T., MØRETRØ, T., AASEN, I.M., HOLCK, A., AXELSSON, L., NATERSTAD, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold

smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. Food Microbiology, v.18, p.431–439, 2001.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, v.70, p.337–349, 1988.

KLEIN G.; DICKS L.M.T.; PACK A.; HACK B.; ZIMMERMAN K.; DELLAGLIO F.; REUTER G. Emended description of *Lactobacillus sake* (Katahira, Kitatara and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnega Kandler): Numerical classification revealed by protein fingerprinting and identification based on biochemical patterns and DNA–DNA hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol., v.46, p.367–376, 1996.

KYRANA, V. R.; LOUGOVOIS, V. P. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. International Journal of Food Science and Technology, v.37, p.319–328, 2002.

LANGELLA P.; ZAGOREC M.; EHRLICH S.D.; MOREL-DEVILLE F. Intergeneric and intrageneric conjugal transfer of plasmids pAM β 1, pIL205 and pIP501 in *Lactobacillus sake*. FEMS Microbiol. Lett., v.139, p.51–56, 1996.

LAPPALAINEN, A.; WESTERBOM, M.; VESALA, S. Blue mussels (*Mytilus edulis*) in the diet of roach (*Rutilus rutilus*) in outer archipelago areas of the western Gulf of Finland, tic Sea. Hidrobiologia, v.514(1-3), p.87–92, 2004.

LEITE, L. A. Influência na predação, parasitismo e densidade de sementes nas perdas de mexilhões *Perna perna* (L. 1758), cultivados na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. 39p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2007.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology, v.15, p.67–78, 2004.

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

LIMA, F. C. Vibrios marinhos: *Vibrio parahaemolyticus*. *Higiene Alimentar*, São Paulo: v.11, n.47, p.14-22, 1997. apud: VALENTE, A. M.; Efeito da irradiação sobre mexilhões [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]: Coliformes termotolerantes e *Enterococcus*; ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras”. 85p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, 2004.

LUNETTA, J. E. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* – Mollusca Lamellibranchia) *Bol. Fac. Filos. Ciênc. Univ. São Paulo*, v. 23, p.33 – 111, 1969.

MANOURSARIDIS, G.; NERANTZAKI, A.; PALEOLOGOS, E. K.; TSIOTSIAS, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiology*, v. 22, p. 1-9, 2005

MARQUES, H. L. A. Criação comercial de mexilhões. São Paulo: Nobel. 1998, 111p.

McMULLEN, L. M. E STILES, M. E. Potencial for use of bacteriocin-producer lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection*, suplemento, p.64-71, 1996

MICHEL, C. ; PELLETIER, C. ; BOUSSAHA, M. ; DOUET, D.-G. ; LAUTRAITE, A. ; TAILLIEZ, P. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73 (9), p.2947–2955, 2007.

NETTLES C.G.; BAREFOOT S.F., Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Protection*, v.56, p.339–356, 1993.

NILSSON, L.; NG, Y.Y.; CHRISTIANSEN, J.N.; JØRGENSEN, B.L.; GRÓTUNUN, D.; GRAM, L. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p.133–143, 2004.

OLIVEIRA, M. P. As conchas. Introdução ao seu estudo. Juiz de fora: Sociedade Propagadora Esdeva, 96p, 1969.

PAINE, R. T., Biological observations on a subtidal *Mytilus californianus* bed. *Veliger*. V.19, p. 125 – 130, 1976.

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANNA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) pré-cozidos no rio de Janeiro, RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. V.24, n.4, p.562-566p, 2004.

PEREIRA, M. M. D.; FERREIRA, V. M.; VALADÃO, R. C.; OLIVEIRA, G. M.; ALENCAR, T. A.; RIBEIRO, A. L. M. S.; SILVA, P. P. O.; BARBOSA, C. G. Utilização da análise de coliformes como indicativo de sanidade dos mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na ilha Guaíba, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 16, n.2, p.95-99, maio/ago, 2009.

PILET, M.-F., DOUSSET, X., BARRÉ, R., NOVEL, G., DESMAZEAUD, M., PIARD, J.-C. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, v.58(3), p.256–262, 1995.

PINTO, A. L.; FERNANDES, M.; PINTO, C.; ALBANO, H.; CASTILHO, F.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International Journal of Food Microbiology*, v.129, p.50-58, 2009.

PONCE, E.; KHANA, A. A.; CHENG, C.; SUMMAGE-WEST, C.; CERNIGLIA, C. E. Prevalence and characterization of *Salmonella*

enterica serovar Weltevreden from imported seafood. Food Microbiology, v. 25, p. 29-35, 2008.

RIBEIRO, A. L. M. S.; OLIVEIRA, G. M.; FERREIRA, V. M.; PEREIRA, M. M. D.; SILVA, P. P. O. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. Revista de Ciência Veterinária, v.16, n. 3, p. 109-112, set./dez. 2009

ROBERTSON, A., TIRADO, C., LOBSTEIN, T., JERMINI, M., KNAI, C., JENSEN, J.H., FERRO-LUZZI, A., JAMES, W.P.T. (Eds.), 2004. Food and health in Europe: a new basis for action. WHO Regional Publications, European Series, vol. 96. Geneva.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. Food control, v. 7(4/5), p. 195 – 202. 1996.

ROCKZANSKI, M.; COSTA, S. W.; BOLL, M. G. e OLIVEIRA NETO, F. M. A evolução da aqüicultura no estado de Santa Catarina – Brasil. In: AQUICULTURA BRASIL 2000, Florianópolis, 2000. Anais... CD-ROM.

ROSA, R. C. O Mexilhão. Em: Manual de Cultivo do Mexilhão *Perna perna*. Florianópolis. 1994, 115p.

RINGØ, E.; GATESOUBE, F. J. Lactic acid bactéria in fish: a review. Aquaculture, v.160, p.177–203, 1998.

RIOS, ELIEZER. Compendium of Brazilian Sea Shells. 1º edição. Rio Grande, Fundação Universidade do Rio Grande, 2009. 668p.

RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, A. Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. Food Research International, v.34, n.5, p.441-447, 2001.

SANTO, M. L. P. E. Efeito da bacteriogenicidade do *Lactobacillus sakei* 2a na qualidade microbiológica da sardinha – verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) fermentada. 201 p. Tese (Doutorado em Ciência

dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2003.

SALÁN, E. O. Tratamento térmico de mexilhões *Perna perna* como forma de assegurar a qualidade: validação do crescimento de *Bacillus cereus* e de *Staphylococcus aureus*. Piracicaba, 2005. 88 p. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo – USP.

SANTOS, T. M. Avaliação Bacteriológica e Físico-Química (pH e N-BVT) da Carne de Piramutaba, *Brachyplatistoma vaillanti* (Siluriformes, Pimelodidae), Congelada Comercializada em Belo Horizonte – MG. Belo Horizonte, MG. 2006. 27 p. Dissertação de mestrado. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

SEED, R. 1976. Ecology. In: Bayne, B. L., Marine Mussels: Their ecology and physiology. Cambridge: Cambridge Univ. Press, p. 13-65.

SCHERER, R.; DANIEL, A. P.; AUGUST, P. R.; LAZZARI, R.; LIMA, R. L.; FRIES, L. L. M.; RADUNZ NETO, J.; EMANUELLI, T. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.24, n.4, p. 680-684, 2004,

SILVA, J.; CARVALHO, A. S.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. Letters in Applied Microbiology, v.34(2), p.77–81, 2002.

SIMÕES, D. R. S.; PEDROSO, M. A.; AUGUSTO RUIZ, W.; ALMEIDA, T. L. Hambúrgueres formulados com base protéica de pescado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.18, n.4, p.410-413, 1998.

SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A.; BURT, J. R. Cambios bioquímicos e microbianos subsiguientes a la captura. In: SIKORSKI, Z.E. (Ed.). Tecnología de los productos del mar: recursos, composition y conservation. Zaragoza: Acribia, 1994. p.73-101.

SOMBRIO, P. S; PRUDENCIO, E.S.; AMBONI, R.M.C.; BARRETO,P.L.M.;AMANTE, E.R. Avaliação tecnológica,

microbiológica, química e física de conservas de mexilhões (*Perna perna*) emadas a vácuo. B.CEPPA, Curitiba v. 26, n. 2. 2008

STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.70, p.331–345, 1996.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, v.36, p.1–29, 1997.

SHINOHARA, N. K. S.; BEZERRA, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* sp., importante agente patogênico vinculado em alimentos. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, 2008.

SUCHANEK, T. H. Mussels and their role in structuring rocky shore communities. In: MOORE, P. G.; SEED, R. *The Ecology of rocky coasts*. Great Britain: Columbia University Press, 1986. P. 70-96

SUCHANEK, T. H. Mussels and their role in structuring rocky shore communities. In: MOORE, P. G.; SEED, R. *The Ecology of rocky coasts*. New York: Columbia University Press, 1986. p. 70 – 96.

TAHIRI, I.; DESBIENS, M.; BENECH, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; THIBAUT, S.; OUELLET, D.; FLISS, I. Purification, characterization and amino acid sequencing of divercin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International Journal of Food Microbiology*, v.97, p.123–136, 2004.

THOMAS, L. V.; CLARKSON, M. R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. Em *Natural Food Antimicrobial Systems*, editado por A. S. Naidu. CRC Press. Boca Raton, USA, pp. 463-524. 2000

TOMÉ, E.; PEREIRA, V.L.; LOPES, C.I.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P.C. In vitro tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control*, v.19(5), p.535–543, 2008.

TOMÉ, E., GIBBS, P.A., TEIXEIRA, P.C. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold smoked salmon by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.121, p.285–294, 2008.

VALENTE, A. M.; Efeito da irradiação sobre mexilhões [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]: Coliformes termotolerantes e *Enterococcus*; ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras”. 85p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, 2004.

VERGARA, H.; GALLEGRO, L.; GARCÍA, A.; LANDETE-CASTILLEJOS, T. Conservation of *Cervus elaphus* meat in modified atmospheres. *Meat Science*, v.65, n.2, p.779-783, 2003.

VERGÈS, M. C. C.; CHAILLOU, S.; CORNET, M.; ZAGOREC, M. *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Res. Microbiol.*, v.152, p.839-848, 2001.

YAMAZAKI, K.; SUZUKI, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection*, v.66 (8), p.1420–1425, 2003.

ZUCKERMAN, H., BEM AVRAHAM, R. Control of growth of *Listeria monocytogenes* in fresh salmon using Microgard™ and nisin. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v.35, p.543–548, 2002.

ZUÑIGA M.; CHAMPOMIER-VERGÈS M.C.; ZAGOREC M.; PEREZ-MARTINEZ G., Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sakei*, *J. Bacteriol.*, v.180, p.4154–4159, 1998.