



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

HECTOR SUAREZ MAHECHA

UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus plantarum* LPBM10 NA QUALIDADE E VIDA ÚTIL DE FILETES DO HÍBRIDO DE PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*) x TAMBÁQUI (*Colosoma macropomum*), EMBALADOS A VÁCUO SOB RESFRIAMENTO.

Tese de Doutorado

Florianópolis - SC

Junho / 2008

HECTOR SUAREZ-MAHECHA

UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus plantarum* LPBM10 NA QUALIDADE E VIDA ÚTIL DE FILETES DO HÍBRIDO DE “PIRAPITINGA” (*Piaractus brachypomus*) x “TAMBAQUI” (*Colosoma macropomum*), EMBALADOS A VÁCUO SOB RESFRIAMENTO.

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Alicia de Francisco
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão

Florianópolis – SC
2008

UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus plantarum* LPBM10 NA QUALIDADE E VIDA ÚTIL DE FILETES DO HÍBRIDO DE “PIRAPITINGA” (*Piaractus brachypomus*) x “TAMBAQUI” (*Colosoma macropomum*), EMBALADOS A VÁCUO SOB RESFRIAMENTO.

Por

Héctor Suárez Mahecha

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor no programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pela comissão formada por:

Presidente:

Profª. Dra. Alicia de Francisco (UFSC)

Membro:

Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão (UFSC)

Membro:

Prof. Dr. Milton Espírito Santo (FURG)

Membro:

Prof. Dra. Betina Muelbert Esquivel (UNISUL)

Membro:

Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna (UFSC)

Coordenadora:

Profª. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz

Florianópolis, 02 de junho de 2008.

S939u Suarez Mahecha, Hector

Utilização de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 na qualidade e vida útil de filetes do híbrido de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) x tambaqui (*Colosoma Macropomum*), embalados a vácuo sob resfriamento / Héctor Suárez Mahecha ; orientadora Alicia de Francisco ; co-orientador Luiz Henrique Beirão. – Florianópolis, 2008.

105 f. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, 2008.

Inclui bibliografia

1. Bacteriocinas. 2. Peixe – Resfriamento. 3. *Lactobacillus plantarum* LPBM10. 4. Aqüicultura. 5. Resfriamento a vácuo. 6. Tecido conjuntivo. I. Francisco, Alicia de. II. Beirão, Luiz Henrique. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

CDU: 663/664

**À
Jeremías, David e Andréa.**

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Alicia de Francisco, pelo respaldo, amizade e ajuda incondicional desde o início da minha etapa na UFSC.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão pelo apoio, orientação e confiança oferecida durante o curso e pela paciência nas correções que em muito contribuíram para a minha formação.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos pela oportunidade e confiança oferecida.

Ao Prof. Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana e família meu eterno agradecimento pela continua companhia, solidariedade e acolhida em Florianópolis.

A Profa. Olga Inés Montoya, diretora do grupo de pesquisa em Biotecnologia Microbiana da Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, pelo aporte da cepa de *Lactobacillus plantarum* LPMB10 e sincera amizade.

Ao Carlos Isaquita Almanza pela inaliável ajuda nos testes da microscopia, além que sempre estiver apoiando a realização de meu trabalho.

Ao professor Víctor Julio Atencio García, diretor do Centro de Investigación Piscícola da Universidad de Córdoba - CINPIC, pela amizade e aporte dos peixes requeridos para o presente estudo.

Aos donos dos meus sonhos, aos meus criadores e às minhas criações, muito obrigado.

S939u Suárez Mahecha, Héctor. Utilização de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 na qualidade e vida útil de filetes do híbrido de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) x tambaqui (*Colosoma Macropomum*), embalados a vácuo sob resfriamento /Héctor Suárez Mahecha; orientadora Alicia de Francisco ; co-orientador Luiz Henrique Beirão. – Florianópolis, 2008. 105 f.: il. ; 30cm.

RESUMO

O potencial de biopreservação de uma cepa nativa produtora de bacteriocinas foi avaliada em filetes talhados de híbrido das espécies de peixe pirapitinga (*Piaractus braquypomus*) x tambaqui (*Colossoma macropomum*), procedentes da aquicultura, utilizando análises microbiológicas, físico-químicas, sensoriais e de microscopia óptica. Foram feitos três tratamentos: adição de extrato cru de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10, ácido láctico pH 6,53 e água destilada (controle) a filetes embalados a vácuo. Estes filetes foram armazenados a 3⁰C durante 30 dias. As provas microbiológicas não apresentaram diferença significativa na contagem total de mesófilos entre os tratamentos. A contagem total de psicrotrófilos alcançou valores de 5,2 ciclos log; 6,7 ciclos log e 6,4 ciclos log (P<0,05) para os filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas, ácido láctico e controle respectivamente, no dia 30 de armazenamento. Para coliformes totais a contagem inicial de 2.6 ciclos log, foi mantida até o final do armazenamento. A contagem de coliformes fecais, ao finalizar o período de armazenamento, diminuiu 1,5: 2,1 e 1,3 ciclos log para os filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas, ácido láctico e água destilada (controle) respectivamente. Análise físico-química de BVT-N apresentou o menor valor (19,3 mg BVT-N/100g) para o tratamento com extrato cru de bacteriocinas. O valor inicial do ácido tiobarbitúrico TBA foi de 0,93 mg malonaldeído/kg para todas as amostras, e teve o menor aumento para o tratamento com bacteriocinas (0,97 mg) no final do período. As observações microscópicas mostram a menor alteração na degradação do tecido conectivo e o menor incremento do espaço entre as fibras musculares dos filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas. A análise sensorial demonstrou que o talhado foi efetivo na diminuição da percepção das espinhas intramusculares, obtendo as melhores pontuações nos filetes talhados e tratados com bacteriocinas.

Palavras-chave: Bacteriocinas, peixes, *Lactobacillus plantarum* LPBM10, aquicultura, vida útil, tecido conjuntivo.

S939u Suárez Mahecha, Héctor. Utilização de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 na qualidade e vida útil de filletes do híbrido de pirapitinga (*Piaractus brachyomus*) x tambaqui (*Colosoma Macropomum*), embalados a vácuo sob resfriamento /Héctor Suárez Mahecha; orientadora Alicia de Francisco ; co-orientador Luiz Henrique Beirão. – Florianópolis, 2008. 105 f.: il. ; 30cm.

ABSTRACT

The biopreservation potential of a native bacteriocin producer strain was evaluated in gashed fillets of hybrid pirapitinga (*Piaractus braquypomus*) x tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed fish, using microbiological, physico-chemical, sensory and optical microscopy analysis. Three treatments were used: addition of crude bacteriocin extract produced by *Lactobacillus plantarum* LPBM10, lactic acid pH 6.53 and distilled water (control), to the vacuum packed fillets. These were stored at 3°C for 30 days. Microbiological assays did not show significant differences among the viable mesophilic counts for any of the treatments. Psychotropic total counts reached values of 5.2 cycles log; 6.7 cycles log and 6.4 cycles log ($P < 0.05$) for crude bacteriocin, lactic acid and control treatments respectively at the end of the period. For total coliforms the initial count of 2.6 cycles log was maintained until the end of storage. The count of fecal coliforms diminished 1.5, 2.1 and 1.3 cycles log by the end of the study for the fillets treated with crude bacteriocins, lactic acid, and distilled water (control) respectively. Physical-chemical analysis for total volatile basic nitrogen (TVB-N) showed the lowest value (19.3 mg TVB-N/100g) for bacteriocin treated fillets. The thiobarbituric acid TBA initial values of 0.93 mg malonaldehyde/kg for all samples, increased the least for the bacteriocin one (0.97 mg by the end of the period.) Microscopic observations showed the lowest alteration in the weakening of connective tissue and the smallest increment in the space among muscular fibers for the treatment with crude bacteriocin extract. Sensory analysis indicated that gashing the fish fillets was effective in decreasing the perception of intramuscular bones, yielding the best scores in gashed fillets treated with bacteriocin.

Key words: Bacteriocin, fish, *Lactobacillus plantarum* LPBM10, aquaculture, shelf-life, connective tissue.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1. Comportamento microbiológico do extrato cru de bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* LPBM10 em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3⁰C..... 45
- Figura 2. Mudanças em Bases Voláteis Totais (BVT) em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3⁰C..... 46
- Figura 3. Mudanças sensoriais em filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3⁰C. 47

Capítulo 2

- Figura 1. Mudanças em ácido tiobarbitúrico TBA em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3⁰C..... 71
- Figura 2. Mudanças em Bases Voláteis Totais (BVT) em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3⁰C. 72

Capítulo 3

- Figura 1. Cortes paralelos e perpendiculares à espinha dorsal nos filetes de híbrido de *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* para o controle de espinhas intramusculares..... 97
- Figura 2. Microscopia óptica de cortes transversais de músculo de filetes de híbrido de *Piaractus brachyipomus* x *Colossoma macropomum* durante o armazenamento a 3⁰C. Corado com Laranja G e Azul de metileno..... 98
- Figura 3. Alteração da área entre fibras musculares de filetes talhados de híbrido de *Piaractus brachyipomus* x *Colossoma macropomum* durante o armazenamento a 3⁰C..... 99

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Análises sensorial.....	44
-----------------------------------	----

Capítulo 2

Tabela 1. Análises sensorial.....	68
Tabela 2. Valores do pH para filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo armazenados a $3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias.....	69
Tabela 3. Perda de umidade para filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo e armazenados a $3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	70
Tabela 4. Atributos sensoriais para filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3°C	73

Capítulo 3

Tabela 1. Valores de textura medida como força a ruptura ($p < 0.0001$) para filetes talhados de híbrido de <i>Piaractus brachypomus</i> x <i>Colossoma macropomum</i> durante o armazenamento a 3°C	100
Tabela 2. Atributos sensoriais para filetes talhados de híbrido de <i>Piaractus brachypomus</i> x <i>Colossoma macropomum</i> embalados a vácuo e armazenados a $3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias.....	101

SUMÁRIO

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
INTRODUÇÃO.....	10
CAPÍTULO 1 - UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR <i>Lactobacillus plantarum</i> LPBM10 NA VIDA ÚTIL DE FILETES DO HÍBRIDO DE PIRAPITAINGA <i>Piaractus brachypomus</i> x TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i> EMBALADO A VÁCUO.....	
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
Tabelas.....	44
Figuras.....	45
CAPITULO 2- QUALIDADE FISICO-QUIMICA E ATRIBUTOS SENSORIAIS DE FILETES TALHADOS DE HÍBRIDO DE <i>Piaractus brachypomus</i> x <i>Ccolossoma macropomum</i> EMBALADO A VÁCUO SOB REFRIGERAÇÃO.....	
ABSTRACT	48
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4 CONCLUSÕES.....	62
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
Tabelas.....	67
Figuras.....	70
CAPITULO 3 - ANÁLISE ESTRUTURAL DE FILETES TALHADOS DE HÍBRIDO DE PIRAPITINGA (<i>Piaractus braquypomus</i>) X TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) UTILIZANDO BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> EMBALADO A VÁCUO.....	
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
1 INTRODUÇÃO.....	74
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
Figuras.....	95
Tabelas.....	98
Considerações finais.....	100
Referencias bibliográficas da introdução	101

1 INTRODUÇÃO

A aqüicultura é uns dos setores produtores de alimentos que mais rápido tem crescido e conseguido no mundo o reconhecimento de “*Alternativa para contribuir com a diminuição da pobreza, com segurança alimentar e com a geração de divisas para os países em desenvolvimento*” FAO, (2003).

Segundo dados da FAO, (2004) a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) são espécies de alta produção em alguns países da América do Sul. A produção do híbrido obtido de estas duas espécies alcança notáveis vantagens na indústria da aqüicultura. Na Colômbia a produção da pirapitinga e do tambaqui de viveiro tem-se incrementado na última década, alcançando 12.023 toneladas para o ano 2003, sendo a segunda espécie mais utilizada pela piscicultura, depois da tilápia. Os países produtores da região como Argentina, Brasil, Bolívia, Peru e Venezuela reportam 18.4333 toneladas para esta mesma época. Este fato de particular significado, pelo crescimento em estes países tem sido constante. Em décadas passadas (1970 a 2000) o crescimento tem sido 7 vezes mais rápido que nos países desenvolvidos. Colômbia contribuiu com 61.786 ton, equivalente ao 7.1% da produção no ano 2000, os ingressos foram de US\$258 milhões equivalentes ao 8,6% do total em latinoamérica. Dentro dos organismos da aqüicultura cultivados em Latinoamérica, a FAO reporta a “Cachama” ou “pirapitinga” com 2.5% da produção total para esse mesmo ano.

O consumo *per capita* de produtos da aqüicultura tem aumentado mais de 8 vezes, de 0,71 kg em 1970 para 7,87 kg no ano 2004, com um incremento anual médio de 7,3%. O peixe como alimento tem algumas vantagens nutricionais quando comparada com outras carnes, sendo fonte de proteína animal de alta qualidade e energia altamente

digestiva, fonte rica de ácidos graxos poliinsaturados Omega-3 vitaminas A, D, E B, minerais e oligoelementos (Ca, P, Fe, I y Se), segundo FAO (2003).

Na América latina entre 1988 e 1997, os cultivos intensificaram-se através do uso de tecnologia mais avançada, manejo tecnicamente adequado, equipamento e adequações às normas e exigências para exportar o produto, aumentando de 53.000 t em 1988 para 203.000 t em 1997. A Colômbia contribuiu nesse período com 19,1% da tilápia (*Oreochromis spp*) e com o 65% da pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) produzida, sendo que de 1992 a 1997 o número de aqüiculturas dobrou. O cultivo da Cachama ou pirapitinga incrementou-se significativamente chegando a 12.000 t/ano, e toda esta produção foi comercializada no mercado doméstico, e a produção de tilápia foi de 16.000 t/ano, sendo que a produção total alcançou 37.000 t/ano (Hernandez-Rodríguez et al., 2001).

Colômbia é a quinta potência mundial em recursos hídricos continentais. Conta com 1.500 quilômetros de rios, 3 milhões de hectares de águas superficiais e 2,5 milhões de hectares de pantanais. Tem uma precipitação média anual de 3.000 milímetros, o que representa um aporte significativo para seus recursos hídricos, principalmente se confronta com a média de precipitação mundial que é de aproximadamente 900 milímetros, e com a de América do Sul que é de 1.600 milímetros. A pirapitinga é uma espécie de grande importância comercial, amplamente cultivada em sistemas intensivos e semi-intensivos em escala industrial (FAO, 1994; INPA, 1995).

Junto com o crescimento da piscicultura, também tem-se identificado sérios problemas no momento de comercializar os produtos da piscicultura de água doce, afetando diretamente a produtores e consumidores. Estes problemas têm a ver com as limitadas formas de comercialização dos produtos da aqüicultura. O peixe fresco é oferecido e comercializado unicamente como peixe inteiro, geralmente com escamas, com altos riscos de contaminação, deterioração e limitada vida útil. O fenômeno referido gera graves problemas de comercialização para a indústria piscícola,

dificultando seu crescimento e impedindo a geração de novos consumidores. Isto acontece especialmente em cidades populosas onde o consumo *per capita* é baixo, pois os atuais produtos provenientes da piscicultura oferecem poucas alternativas no relacionado com o desenvolvimento de novos produtos. Neste sentido seria conveniente para o desenvolvimento do setor da piscicultura, oferecer alternativas tecnológicas que possibilitem o comércio destes produtos através de apresentações diferenciadas, com valor agregado e em especial, com uso de biopreservantes.

Por outro lado, tem sido reportado em vários trabalhos, que cada espécie íctica uma vez oferecida como peixe fresco, apresenta variados tempos de vida útil, situação dada por aspectos fisiológicos, microbiológicos, químicos, histológicos, físicos, sazonais, condições de estocagem e atributos sensoriais, que devem ser estabelecidos para cada espécie na elaboração de protocolos de processamento e benefício de acordo com suas características (Genigeorgis e Riemann, 1979; Iwamoto et al., 1987; Liston, 1992; FAO 1995; Church, 1998; Bosknaes et al., 2001).

Atualmente, os sistemas de biopreservação para diferentes produtos alimentares merecem ampla pesquisa, pelas vantagens e segurança que oferecem a saúde dos consumidores. Além disso, existe uma pressão para diminuir e proibir cada vez mais o uso de preservantes e aditivos químicos nos alimentos. (European Union 1998; FAO 1995; ICMSF, 1998).

Alguns produtos da aquicultura para seu comércio e exportação são submetidos a severas regulações por parte de vários países. Para o Salmão defumado por exemplo, nos Estados Unidos é exigido “zero tolerância” para *Listeria monocytogenes* em 25 g de carne, e na França é proibido a utilização de preservativos, antioxidantes e estabilizadores (Duffes et al., 1999).

1.1 AS ESPÉCIES

A “Cachama”, é a denominação popular de *Piaractus brachypomus* e *Colossoma macropomum* na Colômbia, em outros países recebe os seguintes nomes: Pirapitinga e tambaqui (Brasil) e Paco (Peru).



Figura 1. Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) na parte superior e tambaqui, na parte inferior (*Colossoma macropomum*) obtidas de viveiro.

A pirapitinga e o tambaqui são espécies nativas dos rios Amazonas, Orenoco e seus afluentes. Podem alcançar 79 cm de comprimento e 18 a 20 kg de peso. Os exemplares desta espécie têm semelhança com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Em cativeiro alcança 0,9 a 1 kg de peso no primeiro ano.

A pirapitinga e tambaqui foram adaptadas com sucesso para o cultivo em cativeiro e são espécies indicadas para o policultivo, visto sua capacidade de aproveitar vários tipos de alimentos disponíveis no viveiro. É rústica e tolera baixos teores de oxigênio dissolvido na água. Atualmente, fazem parte das principais espécies nativas nos empreendimentos de piscicultura em virtude da disponibilidade de alevinos.

1.2 SISTEMAS DE CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

1.2.1 BIOPRESERVAÇÃO

As bactérias ácido lácticas têm uma importante função na conservação dos alimentos, assim como seus metabólitos. Varias destas bactérias isoladas de produtos lácteos, cárneos e peixes, foram detectadas por possuírem propriedades antibacterianas, atribuídas aos produtos finais de seu metabolismo, tais como ácido láctico, acético, diacetilo, acetaldeído, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Sakar e Bonerjee, 1996). Estes compostos antimicrobianos possuem propriedades para garantir segurança e extensão da vida útil dos alimentos (Luke e Earnshaw, 1994). Porém, a biopreservação proporciona condições para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos pelo uso de uma microbiota natural ou controlada e de seus produtos antimicrobianos (Lewus et al. 1991; Vescovo et al. 2006).

As bactérias ácido lácticas não necessitam oxigênio para crescer, são tolerantes a presença de CO₂, nitritos, fumaça, elevadas concentrações de sal e toleram baixos valores de pH (Garcia et al., 1995). Devido a estas características o pescado e carnes frescas e maturadas e embalados a vácuo favorecem o crescimento destes microrganismos. O crescimento de bactérias lácticas também tem sido associado à perda da capacidade de infecção de alguns vírus, como da peste africana em embutidos crus curados (McKercher et al., 1978).

Por outro lado, a ingestão de bactérias lácticas viáveis do gênero *Lactobacillus*, tem um efeito nutricional importante, porque estas incrementam a qualidade nutritiva dos alimentos, controlam as infecções intestinais, facilitam a digestão da lactose, são antimutagênicas, inibem o desenvolvimento de alguns tipos de câncer e estimulam a imunidade (Hilmi e Yusulf, 2000; Fernandez e Shahani, 1990; Gonzalez et al., 1993).

Tecnologicamente as bacteriocinas são as substâncias antimicrobianas mais interessantes produzidas pelas bactérias lácticas. Devido a sua natureza protéica se inativam pelas enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal e não parecem ser tóxicas nem imunogênicas em animais de experimentação, resultando em interessantes sistemas para ser utilizados como conservantes em alimentos (Hernandez et al., 1993; Requena e Pelaez, 1995). Geralmente as bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido lácticas são termo-resistentes, o que sugere que sua atividade depende de estruturas pequenas e pouco complexas, possivelmente sem estrutura terciária. De outra parte, as bacteriocinas são geralmente estáveis a pH ácido ou neutro. Existem exceções interessantes, por exemplo, a nisina produzida por *Lactococcus lactis*, foi a primeira bacteriocina descoberta em 1928 e aceita como aditivo para alimentos nos Estados Unidos a partir de 1988. Esta bacteriocina apresenta solubilidade e estabilidade ótima a pH 2 e diminui sua efetividade, na medida em que aumenta o pH até valores de 6. Este fato gera uma desvantagem tecnológica quando utilizado em alimentos não ácidos (Ross, 2002).

A nisina é utilizada em pelo menos 45 países. Embora sua utilização para aumentar a vida útil e qualidade sanitária de carnes e peixes está limitada por sua escassa solubilidade pelo pH destes produtos, sua interação com os fosfolipídios e a dificuldade para a sua produção *in situ*, já que, o *Lactococcus lactis* não se desenvolve nem produz nisina na carne refrigerada (Delves-Broughton, 1990).

Existem vários exemplos nos quais tem-se reportado a inibição de bactérias deteriorantes e patogênicas por parte de bacteriocinas (Klaenhammer, 1988, 1993). Considera-se que as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas agem geralmente sobre a despolarização das células da membrana ou através da inibição da síntese da parede celular (Higazi et al. 1996; Cleveland et al. 2001) ou pela inibição da atividade Rnase ou Dnase (Lazdunski, 1988).

As bacteriocinas mais interessantes produzidas por pediococos de origem cárneo incluem a pediocina AcH, produzida por *Pediococcus acidilactici* H, sendo antagonista de bactérias Gram-positivas como *Clostridium perfringes*, *Listeria monocytogenes* e *estafilococcus aureus* (Buhnia et al., 1988) e a pediocina PA-1 produzida por *Pediococcus acilactici* PAC 1.0, que é bactericida para outras bactérias lácticas e *L. monocytogenes* (Marugg et al., 1992). Ainda com a existência de proteases endógenas da carne, a pediocina PA-1 é ativa durante um período extenso de tempo em filetes de carne refrigerada contaminados com *L. monocytogenes*, reduzindo as contagens deste microrganismo entre 1-2,5 ciclos logarítmicos.

A utilização das bacteriocinas na conservação de carnes e pescados, tem tomado importância recentemente nos Estados Unidos, sendo patenteados diferentes bacteriocinas para prolongar a vida útil, como por exemplo, bacteriocina de *P. acidilactici* para produtos cárneos com pH entre 6 e 5.5, nisina com agentes quelantes e surfactante para inibir bactérias gram-positivas e gram-negativas em carnes, pescados, ovos e queijos, entre outras (Cleveland et al., 2001).

As bacteriocinas produzidas pelos gêneros *Leuconostoc* e *Carnobacterium*, inclui a leuconocina S produzida por *Leuconostoc paramesenteroides* (Lewus et al., 1992) e as carnobacteriocinas A e B de *Carnobacterium piscícola* LV17 (Ahn e Stiles, 1990) ativas contra espécies dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Porém as carnobacterias têm a vantagem de não serem muito acidúricas, apresentam o inconveniente de ser heterofermentativas, produzindo pequenas quantidades de CO₂. Este fato pode dificultar sua utilização para a produção *in situ* de bacteriocinas na carne e pescado.

Segundo estudos feitos com *Lactobacillus plantarum*, este organismo apresenta importância em alimentos fermentados como vegetais, produtos cárneos, pescado e

cereais (Rekhif et al. 1994; Fricourt et al. 1994), e muitas cepas estão relacionadas com o desenvolvimento da atividade antimicrobiana (Daeschell et al. 1990).

Os primeiros estudos com substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus plantarum* foram feitos por Kodama (1952), onde determinou-se que a bacteriocina lactolicina mostra diferentes propriedades e espectro de inibição quando comparada com nisina e diplococcina. Posteriores pesquisas demonstraram a eficácia de compostos antagonistas produzidos por cepas de *Lactobacillus plantarum* na inibição de *Estafilococcus aureus* (Andersson, 1986). Outros estudos feitos com diferentes cepas de *L. plantarum* identificaram e caracterizaram algumas bacteriocinas, entre elas plantaricina, que mostraram ação antagonista para determinadas cepas de bactérias ácido lácticas (Andersson et al., 1988; Jimenez-Diaz et al., 1990).

Em outro estudo feito por Fricourt et al., (1994) onde isolaram *Lactobacillus plantarum* BF001 do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) refrigerado, encontrou-se uma substância antimicrobiana denominada plantaricina F, ativa contra *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Estafilococcus*, *Salmonella* e *Pseudomonas*.

De outra parte, a cepa de *Lactobacillus plantarum* BN isolada da carne e peixe produz bacteriocinas ativas contra patógenos incluindo *Listeria monocitogenes* e *Aeromonas hydrophila* (Lewus et al. 1991), e *Clostridium botulinum* (Okereke e Montville, 1991; Lewus e Montville, 1992).

Estudos feitos por Feltrin (1997) e Fiorentini (1999) com *Lactobacillus plantarum* BN, demonstram como é possível cultivar este microrganismo, utilizando meios de fácil obtenção e baixo custo, para posteriormente utilizar seus produtos antimicrobianas na conservação de carnes refrigeradas.

1.2.2 EMBALAGEM COM ATMOSFERA CONTROLADA

O acondicionamento em embalagens com atmosfera controlada, modificada ou a vácuo (AC, AM, EV) é um processo tecnológico de preservação de alimentos, que consiste em expor os alimentos a ausência de ar (vácuo), controlando a multiplicação de microrganismos, a ação enzimática e oxidação, principais mecanismos de deterioração de alimentos. Junto ao processamento mínimo esta tecnologia permite um acréscimo significativo na oferta do pescado, com qualidade e baixo custo, proporcionando uma nova alternativa de renda para produtores e indústrias. Há 30 anos, toda a tecnologia é denominada de *atmosfera controlada*. Quando na realidade não se controla totalmente a atmosfera ao redor e dentro do produto, esta terminologia estava tecnicamente errada. Embora este termo tenha se consolidado e continue sendo utilizado habitualmente para descrever, de forma geral, as tecnologias que modificam o ambiente gasoso para manter durante um maior tempo a qualidade dos alimentos (Brody, 1996)

A embalagem a vácuo (EV) consiste na eliminação total do ar do interior da embalagem sem que seja substituído por outro gás. Na EV existe uma diferença de pressão entre o exterior e o interior da embalagem.

Os alimentos metabolicamente ativos embalados a vácuo, como o pescado, continuam com suas atividades respiratórias, consumindo assim, a pequena quantidade de oxigênio presente nos tecidos do produto, aumentando o vácuo e produzindo dióxido de carbono e vapor de água. Considera-se que depois de dois dias os níveis de CO₂ atingem níveis de 20-30% (Waites, 1988; Boknaes et al., 2002). Do ponto de vista prático, a EV de um produto metabolicamente ativo, se transforma, portanto, em uma embalagem com atmosfera modificada.

Quando pescados e carnes refrigerados são conservados em condições aeróbias, as *Pseudomonas* são os principais microrganismos deteriorantes, representando até 90% do total da população microbiana. Ao contrário, em condições anaeróbias, com elevados níveis de CO₂, como acontece nas embalagens a vácuo de pescados e carnes, o crescimento da microbiota aeróbia se inibe, ao passo que se estimula a microbiota láctica de crescimento mais lento. Na embalagem a vácuo predominam os microrganismos do gênero *Lactobacillus* e outras bactérias lácticas como *Leuconostoc sp.* e *Carnobacterium* (Randell et al. 1997).

Segundo Asensio et al., (1988) nas carnes e pescados embalados a vácuo e mantidos a temperatura entre 0-5°C, bactérias lácticas não produzem odores nem sabores desagradáveis, nem a mioglobina se oxida a metamioglobina. Também considera que o principal limitante da EV seja a influência na cor, possivelmente pela ação das bactérias acidoláticas.

A literatura relata várias pesquisas realizadas sobre EV em pescado. Têm-se estudado aspectos microbiológicos em varias espécies de peixe, e avaliado sensorial, química e fisicamente os atributos que são afetados por utilizar este sistema para prolongar a vida útil sob refrigeração.

As embalagens em atmosfera modificada e a vácuo têm-se convertido em prática popular, sendo utilizada como técnica para a preservação de alimentos, reduzir a deterioração e aumentar a vida útil dos produtos da aquicultura (Church, 1998).

1.3 MUDANÇAS MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS NA CARNE DE PEIXE

Os aspectos microbiológicos e sensoriais são fundamentais para avaliar a segurança e vida útil dos produtos da aquicultura embalados a vácuo. Na literatura encontram-se

estudos específicos que determinam o risco microbiológico de produtos pesqueiros e da aquicultura de consumo popular em diferentes países. Além disso, estes estudos são acompanhados de análises sensoriais que poderiam relacionar a deterioração microbiológica com alterações de sabor, odor, aparência e textura (Garcia et al., 1995). Em termos gerais considera-se que a extensão da vida útil de peixes e filetes embalados a vácuo depende da espécie de peixe, carga microbiológica inicial, tipos de organismos, temperatura de armazenamento e integridade da embalagem (Joffraud et al., 2006). Na pesquisa feita por Lyhs et al. (2001) trabalhando com a qualidade microbiológica e vida útil da truta arco íris “gravad” (com adição de NaCl e açúcar) embalada a vácuo e mantida em refrigeração de 3°C e 8°C, encontraram que a deterioração do produto aconteceu depois de 27 e 20 dias respectivamente. A contagem de bactérias mesófilas e psicrófilas foi 10^6 - 10^7 UFC/g a 3 °C e 10^7 – 10^8 UFC/g a 8 °C. As bactérias produtoras de H₂S constituíram a maior proporção para bactérias psicrófilas. A contagem para bactérias ácido lácticas foi baixa. Os resultados sensoriais determinaram impróprios para o consumo humano com contagens para mesófilos e psicrófilos superiores a 10^6 e 10^7 UFC/g para as amostras a 3°C e 8°C, respectivamente. A principal razão para o rejeito sensorial foi por odores amoniacais e mudanças na coloração. A vida útil foi determinada com base nas análises microbiológicas e sensoriais em 20 dias para 3°C e 18 dias para 8 °C.

As bactérias ácido lácticas (BAL) formam parte da composição da microbiota deteriorante dos peixes embalados a vácuo e resfriados. Magnússon e Traustadóttir (1982) encontraram dominância destas bactérias para “herring” defumado e Pauladan-Muller et al. (1998) para salmão defumado e truta arco-íris, entre outros vários autores. Embora, o efeito das BAL na deterioração dos produtos da aquicultura às vezes pode ser benéfico, como pôr exemplo, a produção de substâncias antagonistas naturais por BAL

pode prolongar a vida útil e inibir o crescimento de patógenos contaminantes (Sarkar e Banerjee, 1996; Hugas, 1998;). Este conceito é conhecido como biopreservação e recentemente tem surgido um grande interesse para colocar em prática esta tecnologia.

Sobre outras bactérias deteriorantes e patogênicas, considera-se que o inadequado manejo da temperatura de armazenamento facilitam um rápido crescimento. Entre estas se encontram *Salmonella*, *Stafilococcus aureus* e *Escherichia coli* quando foi utilizada embalagem a vácuo em filmes de alta e baixa densidade (Genigeorgis, 1985). A temperatura mínima requerida para a produção de enterotoxinas aeróbias e anaeróbias considera-se de 10°C para peixes embalados a vácuo (Goepfert e kim, 1975; Genigeorgis, 1985).

De outra forma, os peixes dos trópicos são mais estáveis a temperaturas de refrigeração que peixes de climas temperados. Isto provavelmente acontece pela baixa incidência de microrganismos psicotróficos nos trópicos. Nestes casos a deterioração dos peixes pode ser demorada e seguida de toxigênese (Gonzalez-Rodriguez et al., 2002). De acordo com Liston (1992), a maior conservação de peixes provenientes de águas tropicais, seria devido a presença de uma microbiota tipicamente mesófila, pouco adaptada às temperaturas de refrigeração. Além disso, esta microbiota teria atividade metabólica diferente da psicotrófica, com menor produção de compostos de degradação.

1.4 ASPECTOS HISTOLÓGICOS SOBRE A TEXTURA DA CARNE "PÓS MORTEM"

A firmeza é considerada um fator importante para avaliar a qualidade da carne de peixe e fundamental no momento de comercializar o produto. Estudos demonstram que com alguma frequência, a carne de peixe amolece depois de 24 horas de estocagem sob

refrigeração (Montero e Borderias, 1990; Muchizuki e Sato, 1996; Suarez et al., 2006). Estudos nesse sentido são realizados principalmente em peixes marinhos para determinar a causa do amolecimento “pós morte” na carne dos peixes, embora poucos, os realizados nas espécies de água doce, sendo alguns em carpa (*Cyprinus carpio*) e truta (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo irideus*) (Ando et al. 1999; Suarez et al. 2007).

O colágeno constitui o maior componente do tecido conectivo no músculo dos peixes, e demonstra exercer uma importante função na textura da carne dos peixes (Sato et al. 1986). Por outro lado, estudos histológicos têm demonstrado que o tecido conectivo pericelular pode ser degradado mais intensamente durante a estocagem sob refrigeração que o tecido conectivo intersticial (Ando et al. 1991, 1995; Kubota et al. 1996). Suarez et al. (2007) determinou que a perda de textura da carne de matrinxã (*Brycon cephalus*) como efeito da super refrigeração depois de 24 horas de estocagem, foi devido à degradação do tecido conectivo pericelular e em menor grau à deterioração da linha Z. Segundo estas considerações, se faz necessário realizar observações histológicas na carne das espécies nativas, para determinar sua possível incidência na perda de qualidade durante o armazenamento sob refrigeração e utilizando embalagem a vácuo.

CAPÍTULO I.

UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus plantarum* LPBM10 NA VIDA ÚTIL DE FILETES DO HÍBRIDO DE PIRAPITINGA *Piaractus brachypomus* x TAMBAQUI *Colossoma macropomum* EMBALADO A VÁCUO

USE OF BACTERIOCINS PRODUCED BY *Lactobacillus plantarum* LPBM10 ON THE SHELF LIFE OF CACHAMA HYBRID FILLETS *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* VACUUM PACKAGED

Hector Suarez-Mahecha^{1*}, Alicia De Francisco², Luiz Henrique Beirão²

¹ Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia.

² Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.

*Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Bloque 14 oficina 400, Universidad Nacional de Colombia, Calle 59A #63-20 Medellín-Colombia

RESUMO

O potencial de biopreservação de uma cepa nativa produtora de bacteriocinas foi avaliada em filetes do peixe híbrido de pirapitinga x tambaqui, obtido da aqüicultura. Foi adicionado um extrato cru de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 a filetes de híbrido de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) x tambaqui (*Colossoma macropomum*) embalados a vácuo e armazenados a 3⁰C durante 30 dias. Foi realizada a avaliação da vida útil, tendo em conta três tratamentos, extrato cru de bacteriocinas, ácido láctico e controle. A contagem total de mesófilos não apresentou diferença entre os tratamentos. A contagem total de Psicotrófilos alcançou valores para

os filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas, ácido láctico e controle de 5,2 ciclos log; 6,7 ciclos log e 6,4 ciclos log ($p < 0.05$), respectivamente, no dia 30 de armazenamento. Para coliformes totais a contagem inicial foi de 2,6 ciclos log, mantendo este mesmo valor até o final do armazenamento. A contagem de coliformes fecais, ao finalizar o período de armazenamento, diminuíram 1,3, 1,5 e 2,1 ciclos log para os filetes controle, tratados com extrato cru de bacteriocinas e ácido láctico respectivamente. A análise de BVT-N mostra os melhores resultados para o tratamento com extrato cru de bacteriocinas e finalizando com 19,3 mg BVT-N/100g. Os resultados da análise sensorial demonstram que a maior faixa de aceitabilidade é encontrada no tratamento com extrato cru de bacteriocinas.

Palavras-chave: Bacteriocinas, peixes, *Lactobacillus plantarum* LPBM10, aquicultura, vida útil.

ABSTRACT

Biopreservatives for a native strain bacteriocin producer was evaluated on fillets of cachama hybrid. It was added a raw extract of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPBM10 to fillets of cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* hybrids vacuum-packed and stored at 30°C during 30 days. The evaluation was undertaken with three treatments, raw extract of bacteriocins, lactic acid and control. There were not differences among treatments in the Mesophylic count. The count of psychophylic reached values for the fillets treated with raw extract of bacteriocins, lactic acid and control of 5.2 cycles log, 6.7 cycles log and 6.4 cycles log ($P < 0.05$), respectively, for the day 30 of storage. For total coliforms an initial count of 2.6 cycles log was obtained, maintaining a same value until the end of storage. The

count of faecal coliforms, when concluding the period of storage diminished 1.3, 1.5 and 2.1 cycles log for the fillets control treaties with raw extract of bacteriocins and lactic acid, respectively. The analysis of BVT-N showed the best results on treatment with raw extract of bacteriocins and concluding with 19.3 mg BVT-N/100g. Sensorial analysis results showed the biggest acceptability range for the treatment with raw extract of bacteriocins.

Key words: Bacteriocins, fish, *Lactobacillus plantarum* LPBM10, Aquaculture, useful life.

1 INTRODUÇÃO

A pirapitinga *Piaractus brachypomus* e o tambaqui *Colossoma macropomum* são espécies de alta produção em alguns países da América do Sul. A produção do híbrido obtido a partir destas duas espécies, alcança notáveis vantagens na indústria da aquicultura. Na Colômbia, a produção da aquicultura da pirapitinga e do tambaqui têm incrementado na última década, alcançando 12.023 toneladas no ano de 2003, sendo a segunda espécie mais utilizada pela piscicultura, depois da tilápia. Os países produtores da região, como Argentina, Brasil, Bolívia, Peru e Venezuela, reportam 18.4333 toneladas para esta mesma época (1).

A carne de peixe e particularmente os filetes são altamente perecíveis, limitando principalmente a vida útil devido à deterioração microbiana. Neste sentido, o crescimento microbiano pode apresentar risco para a saúde dos consumidores quando existem organismos patogênicos envolvidos (2), especialmente durante a utilização de

refrigeração e embalagem a vácuo, onde alguns microorganismos podem sobreviver e crescer, incluindo salmonelas, coliformes e bactérias esporuladas.

A utilização de alguns dos gêneros das bactérias ácido lácticas (LAB) como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ou seus produtos antimicrobianos como as bacteriocinas, são alternativas na biopreservação de produtos minimamente processados e mantidos sob refrigeração (3). As bacteriocinas produzidas por LAB são peptídeos geralmente degradados por proteases intestinais, com específica atividade antimicrobiana e com diferentes aplicações no campo da proteção dos alimentos (4).

Diferentes autores destacam as espécies do gênero *Lactobacillus* como os principais antagonistas de microorganismos patogênicos e deteriorantes em produtos de pescado (5, 6, 7, 8).

As espécies de *Lactobacillus* produzem uma variedade de compostos antimicrobianos que diferem no seu espectro inibitório, modo de ação, estrutura e propriedades bioquímicas. Sabe-se que diferentes bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* possuem efeito antagônico em organismos gram-positivos e em alguns casos em gram-negativos. Neste sentido, a plantarricina F produzida por *Lactobacillus plantarum* BF001, microorganismo isolado do catfish (*Ictalurus punctatus*), é considerada um efetivo antagonista de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* e *Pseudomonas* (9). Ainda que vários estudos mostrem diferentes bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de carnes, pescados e produtos lácteos, só algumas poucas bacteriocinas tem sido testadas e aplicadas na biopreservação de filletes de peixe (10, 11, 12).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito das substâncias antimicrobianas tipo bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10, sobre a vida útil de filetes de peixe embalados a vácuo e armazenados a 3⁰C, usando parâmetros indicadores de qualidade microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de peixes

Os peixes híbridos de pirapitinga x tambaqui foram obtidos do Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba - CINPIC, Montería, Colombia, em setembro de 2006. Os peixes capturados do viveiro foram imediatamente abatidos por meio de punção no cérebro e transportados ao laboratório. O peso e comprimento médio dos peixes foi respectivamente 590±87 g e 32±1.7 cm. Os filetes com pele foram obtidos manualmente usando faca asséptica. O peso médio dos filetes foi 32.4% do peso inicial dos peixes.

O extrato concentrado de bacteriocinas foi adicionado à superfície de cada filete na quantidade de 1ml utilizando uma pipeta. Os tratamentos foram os seguintes:

T1: Extrato concentrado de bacteriocina: 1ml contendo 40mg de extrato concentrado de bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* LPBM10.

T2: Ácido láctico: 1ml de ácido láctico ajustado a pH 6.32, estimado previamente durante a embalagem a vácuo do filete.

T3: Controle: 1ml água destilada

Cada filete foi separadamente embalado a vácuo e armazenado sob refrigeração ($3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) durante de 30 dias.

As análises foram realizadas durante os seguintes dias de armazenamento: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias. Os filetes foram submetidos a análises microbiológicas, químicas e sensoriais, em triplicatas.

Produção e concentração de bacteriocinas a partir de *L. plantarum* LPBM10

A cepa nativa de *L. plantarum* LPBM10 foi subministrada pelo Laboratório de Biotecnologia microbiana da Universidad Nacional de Colômbia sede Medellín. Um inóculo inicial de 10^6 UFC/mL del *L. plantarum* LPBM10, foi cultivado em caldo MRS a 30°C por 72 horas em câmara de anaerobiose. Posteriormente centrifugado a 3000 rpm durante 20 minutos (13). Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membranas (Milipore, poro 0,45 mm/diámetro 47 mm) e tratados com ácido tricloroacético para obter a bacteriocina concentrada.

Determinação da atividade de extrato cru de bacteriocinas

A determinação da atividade do extrato cru de bacteriocinas foi avaliada sobre a *Listeria monocytogenes* mediante o método de difusão em poços (14). Foi utilizado $10^4 - 10^5$ UFC /mL de *Listeria monocytogenes* e semeados em caldo BHI e 1% de ágar, posteriormente abertos os poços e inoculados com 40mg do extrato cru de bacteriocinas neutralizado, filtrado e incubado a 30°C durante 24 horas. Depois do período de incubação a presença do halo inibitório comprova a atividade da bacteriocina.

Embalagem a vácuo e armazenamento

Os filetes de cada tratamento incluindo o controle foram embalados em sacolas de polietileno de baixa densidade com barreira de transmissão de oxigênio de 29-45 ml/O₂/m²/ 24h/atm medido a 23° C e barreira de permeabilidade a gases de 10–15 g /m² / 24h /medido a 38°C marca CRYOVAC, utilizando uma empacotadora a vácuo WEBOMATIC 82246 (West Germany).

Análises microbiológicas

Foram realizadas as seguintes determinações: contagem viável de microorganismos mesófilos (CVM), contagem viável para psicrotrófilos (CVP), coliformes totais, coliformes fecais, salmonella e sulfito redutor. A metodologia utilizada segundo as normas do Instituto Nacional de Vigilância de medicamentos e alimentos (15) da Colômbia.

Determinação de mesófilos e psicrotrófilos: 10g de amostra foram adicionadas em 90ml de água peptonada, homogeneizada e realizada a diluição 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³. Após, 1 ml de cada diluição foi semeado em 15 mL de Agar Plate Count e incubado a 35°C ± 2 °C durante 48 horas. O resultado foi expresso em UFC/g. Os psicrotrófilos foram incubados a 7°C ± 0.5 °C durante 5-7 dias.

Determinação da salmonella: 25g de mostra homogeneizada foi adicionada a 225ml de peptona buferada e incubada a 35 ± 2°C por 16 a 24 horas. Para o cultivo em caldo de enriquecimento seletivo foi tomado 1mL da solução de peptona incubada e colocada em caldo tetracionato, agregando 2 gotas de Lugol e 2 gotas de verde brilhante a 0.1%,

sendo então incubada a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. O meio de cultivo seletivo utilizado foi ágar XLD e ágar SS incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Determinação de esporas sulfito redutores: 10g de amostra homogeneizada foi adicionada a 90ml de peptona universal e foram então realizadas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . O meio de cultivo utilizado foi ágar SPS, colocado em anaerobiose e incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

Determinação de coliformes totais e fecais: 10g de amostra foi pesada, homogeneizada e semeada em caldo Fluorocult LMX. Nove tubos contendo 10mL de Fluorocult LMX foram subdivididos em três amostragens: três receberam 10mL da amostra; três receberam 1mL da amostra e três receberam 0.1mL de amostra. As amostras foram homogeneizadas utilizando-se vortex para cada tubo e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. A leitura foi realizada por fluorescência e reativo Kovac's e os dados reportados como número mais provável (NMP).

Os resultados microbiológicos em unidades formadoras de colônia (UFC g^{-1}) foram transformados em logaritmo.

Análises químicas

Para a determinação das bases voláteis totais de nitrogênio foi utilizado o método proposto por Goulas & Kontominas, (16) onde 10g de amostra da carne de peixe foi moída com 50ml de água destilada usando um picador Moulinex. O material foi adicionado a 200ml de água destilada em um becker de 500ml e destilado após a adição de 2g de MgO e uma gota de silicone para prevenir a formação de espuma. Um Erlenmeyer de 250ml contendo 25ml de solução 3% de ácido bórico, 0.04ml de

vermelho metilo e azul de metileno como indicadores para o tratamento do amônio foi utilizado para receber o destilado. A destilação foi continuada até atingir um volume final de 125ml do destilado obtido. A solução de ácido bórico vira a verde quando é alcalina pelo destilado de bases voláteis totais de nitrogênio (BVTN). A solução foi tratada posteriormente com solução 0.1 N de ácido hidrolórico. A destilação é concluída quando a cor do destilado vira a rosado pela adição gota a gota do ácido hidrolórico. A quantidade de BVTN em mg/100g da carne de peixe foi calculada do volume (V) de ácido hidrolórico adicionado e sua concentração (C) pela seguinte equação:

$$\%mg \text{ BVTN} = \frac{(V \times C \times 14 \times 100)}{10}$$

Avaliação sensorial

A análise sensorial foi realizada pelo método tradicional de julgar a qualidade dos filetes de peixe. Foram avaliadas as características sensoriais como aparência, cor e aroma por cinco julgadores treinados. A pontuação foi baseada sobre uma escala hedônica de nove pontos (Tabela 1) onde 1 corresponde a desgostei extremamente e 9 gostei extremamente. O valor sensorial de 4 foi tomado como a faixa mínima de aceitabilidade (17).

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O efeito dos diferentes tratamentos sobre os filetes embalados a vácuo e refrigerados a $3^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e aceito como diferença significativa $p < 0.05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mudanças microbiológicas

As mudanças na microbiota dos filetes do híbrido de pirapitinga x tambaqui durante a armazenagem a vácuo a 3^oC para os três tratamentos; bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* LPBM10, ácido láctico e controle, são apresentados na figura 1.

A contagem inicial para os Mesófilos (4.8 log UFC⁻¹) indica bom estado inicial de qualidade dos filetes. Os filetes embalados a vácuo e armazenados a 3°C ± 0.5^oC inoculados com 40mg de extrato cru de bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* LPBM10, alcançaram 5.7 ciclos log para mesófilos aos 30 dias de armazenamento, frente a os filetes tratados com ácido láctico 6.3 ciclos log e os filetes controle 6.6 ciclos log (Fig. 1). Ainda que não tenha sido apresentada diferença (P> 0,05) entre os tratamentos, observa-se que os filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas, diminuem em 0,9 ciclos log a contagem de mesófilos frente à amostra controle. No dia 10 de armazenamento, o extrato cru de bacteriocinas conseguiu diminuir a população inicial de mesófilos, mostrando atividade bactericida. A partir do dia 14 de armazenamento os mesófilos voltaram a crescer, embora o comportamento do extrato cru de bacteriocinas possa ser considerado bacteriostático para o final do período estudado.

A contagem inicial para Psicrotrófilos foi de 4.6 ciclos log, alcançando valores para os filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas, ácido láctico e controle de 5.2 ciclos log, 6.7 ciclos log e 6.4 ciclos log (P<0.05), respectivamente, para o dia 30 de armazenamento. Os filetes tratados com o extrato cru de bacteriocinas diminuíram no mínimo 1.2 ciclos log, controlando a população de psicrotrófilos, comparado com os

filetes controle e 1.5 ciclos log frente ao tratamento com ácido láctico, no final do período de armazenamento, mostrando um efeito bacteriostático. Nos primeiros 10 dias de armazenamento não se observou controle de psicrotrófilos (incremento de 1.3 ciclos log) por parte do extrato cru tipo bacteriocinas, embora se observasse um comportamento bactericida (diminuição de 0.47 ciclos log) a partir do dia 10 até o dia 25 de armazenamento.

Para coliformes totais se obteve uma contagem inicial de 2.6 ciclos log, mantendo este mesmo valor pelos 30 dias de armazenamento, logrando controlar esta população nos filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas. Para os filetes tratados com ácido láctico e o controle, o valor alcançado no final do período de armazenamento foi de 3 ciclos log. A partir do dia 5 de armazenamento os três tratamentos têm um comportamento bactericida frente a coliformes totais e um novo crescimento a partir do dia 15, embora nos filetes tratados com extrato cru de bacteriocinas, a população incrementada de coliformes totais tenha diminuído até valores similares ao dia 0, no final do período de armazenamento.

Os coliformes fecais iniciaram com contagem de 2.6 ciclos log, no final do período de armazenamento diminuíram 1.3 ciclo log, 1.5 ciclos log e 2.1 ciclos log nos filetes controle, tratados com extrato cru de bacteriocinas e ácido láctico, respectivamente. É evidente que a diminuição ao longo do tempo foi devido às condições geradas dentro da embalagem a vácuo, como no caso do efeito do CO₂ produzido pelos filetes, devido à respiração anaeróbica e pelo desenvolvimento de bactérias ácido-lácticas que seriam antagonistas de coliformes fecais.

Durante o desenvolvimento do trabalho não se detectou *Salmonella* nem organismos sulfito-redutores nos filetes de pirapitinga x tambaqui.

Ainda que a deterioração dos filetes de peixe nas condições anaeróbicas geralmente possa ser atribuída as bactérias ácido-lácticas BAL (18), existe uma considerável confusão sobre o rol deste grupo nos filetes de peixe embalados a vácuo. Trabalhos de inoculação de espécies de *Carnobacterium* e *Lactobacillus* (19, 7) sugerem que o potencial deteriorador das BAL é variável e as enzimas autolíticas podem levar a deterioração. A utilização de extratos crus de substâncias bacteriocinas, bacteriocinas ou associação de BAL para preservar a carne de peixe, mostra efetividade na extensão da vida útil e maior variabilidade no efeito sobre alguns microorganismos. A utilização de salmão defumado embalado a vácuo (13), demonstrou efeito bactericida ou bacteriostático dependendo do número de células utilizadas, *Lactobacillus casei* foi bacteriostático quando inoculado a 6 log UFC/g e mais bactericida a 8 log UFC/g, embora os melhores resultados tenham sido obtidos na associação de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* com 6 log UFC/g de inoculo (20).

O efeito bacteriostático ou bactericida observado nos filetes de pirapitinga x tambaqui usando o extrato cru de bacteriocinas, mostra uma cinética que poderia ser explicada pela interferência na matriz alimentar de compostos tais como gordura ou enzimas proteolíticas, junto à presença de CO₂ gerado na embalagem a vácuo. Vários autores consideram a embalagem a vácuo depois de 48 horas, para carnes e peixes frescos, como uma embalagem de atmosferas modificadas (21, 22). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os obtidos por outros autores, quando utilizaram amostras de carne de salmão defumado embalado a vácuo, mantido armazenado por 20 dias a 3.5⁰C e tratados com uma substância tipo bacteriocina (STB) produzida por *C.*

piscicola. No meio de crescimento TSB não observou-se inibição e a microbiota psicrotrófica apresentou o mesmo perfil de desenvolvimento que o controle sem bacteriocina. Entretanto, quando utilizado em salmão, apresentou uma demora inicial no crescimento até os cinco dias, mostrando um efeito bacteriostático até 15 dias de armazenamento (23). O fenômeno de novo crescimento de psicrotróficos logo após 48h também foi observado quando foi testada a adição de nisina, lactocina 705 e enterocina CRL35 frente a diferentes microorganismos psicrotróficos no meio TSB (24).

A cinética de inibição com diminuição de colônias viáveis no início ou durante o período de armazenamento, seguido de um novo crescimento dos sobreviventes, também tem sido reportada quando se adicionam bacteriocinas ou extratos cru de bacteriocinas individualmente, relatando-se que em presença da mistura de várias substâncias antimicrobianas é produzida imediata inibição das cepas indicadoras testadas. Estes resultados poderiam sugerir a aparição de células resistentes na população (25, 26). Por outro lado, a atividade do extrato cru de bacteriocinas (40mg/ml) poderia ter sido insuficiente para inibir mesófilos e coliformes fecais. Outros autores (27) consideram que os fatores intrínsecos e extrínsecos associados aos alimentos podem interferir na efetividade das bacteriocinas: elas podem ser inativadas por componentes como proteases, lipídios e microorganismos ou sua atividade pode ser afetada durante o processamento (temperatura, exsudação). Além disso, a produção e persistência de atividade das bacteriocinas nos alimentos é muito difícil de medir, provavelmente devido à interação “produto-embalagem”, onde a transferência da atividade poderia ser observada da carne de peixe a embalagem no período de armazenamento (27, 28).

Mudanças nas bases voláteis totais de nitrogênio (BVT-N)

Os resultados das mudanças nas bases voláteis totais de nitrogênio (BVT-N) de filletes de híbrido pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3⁰C são mostrados na figura 2.

As bases voláteis totais incrementaram seu valor inicial 15.7mg BVT-N/100mg tratamento controle e ácido láctico o dia 15, o limite (30mg BVT-N/100g) (29). entretanto, uma diminuição nos valores é observada a partir do dia 15 com um leve aumento no final do período de armazenamento. Pelo contrário, no tratamento com extrato cru de bacteriocinas os valores foram estáveis até o dia 20 de armazenamento, incrementando no dia 25 e finalizando com 19.3 mg BVT-N/100g ($p < 0.05$).

O incremento dos valores de BVT-N nos tratamentos com ácido láctico e controle, frente ao tratamento de extrato cru de bacteriocinas, ao longo do período de armazenamento, poderia estar influenciado pela interação entre as bactérias ácido-lácticas, originadas na embalagem a vácuo, e na contaminação bacteriana inicial (30). além disso, outros autores atribuem baixos valores BVT-N obtidos no salmão defumado pela interação entre populações de bactérias, quando foi inoculado com *L. sakei* frente a psicrotrófilos produtores de BVT-N (31). No presente estudo o tratamento com extrato cru de bacteriocinas mostra esta tendência, ao manter controlada a população de bactérias psicrotrófilas. De outra parte nossos resultados não concordam com os obtidos por outros autores (32) onde altos valores para aminas biogênicas são obtidos com substâncias bacteriocinas produzidas por *L. sakei* no salmão defumado.

Uma compreensão sobre a ecologia microbiana é essencial para o desenvolvimento de técnicas de biopreservação que objetivem melhorar a vida útil e seguridade dos alimentos. A identificação do comportamento de bactérias deterioradoras em peixe

submetido à biopreservação tem sido difícil, provavelmente porque diferentes grupos de bactérias estão envolvidas em diferentes condições (33), onde o substrato, a composição de nutrientes, os parâmetros físicos e químicos são determinantes na seleção, crescimento e atividade deterioradora de microorganismos na carne de peixe biopreservada. Além disso, a interação entre microorganismos determina a seleção, metabolismo e subsequente via de atividade dos organismos deterioradores, dificultando sua compreensão.

Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial de filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3⁰C são mostrados na figura 3. Com o incremento do período de armazenamento, a vida útil dos filetes diminuiu. As características do deterioro avaliadas pelos julgadores foram: aparência, cor e aroma. As pontuações obtidas para os atributos de aparência e cor, foram superiores ao limite de aceitabilidade estimado em 4. Não obstante, o tratamento com extrato cru de bacteriocinas conseguiu a melhor pontuação no final do período de armazenamento ($p < 0.05$). Para o atributo aroma, o tratamento com ácido láctico e controle esteve fora da faixa de aceitabilidade, embora o tratamento com extrato cru de bacteriocinas tenha registrado um alto grau de aceitabilidade por parte dos julgadores ($p < 0.05$) no final do período de armazenamento. Para os atributos de aparência e cor a pontuação obtida foi superior ao limite estabelecido para o final do período, sendo superior no tratamento com extrato cru de bacteriocinas ($p < 0.05$).

A cor opaca, a opacidade, descoloração da pele e a presença de “off odour” foram as principais causas atribuídas às pontuações obtidas nos tratamentos. Em concordância

com os resultados da avaliação microbiológica e sensorial, poderia considerar-se as enzimas proteolíticas como responsáveis pelo impacto sobre a perda de qualidade dos filetes de peixe, mas não sempre são responsáveis pelos característicos “off flavor” e “off odour” que são típicos da atividade microbiana (34). Também é possível que as bactérias psicotróficas, ainda que presentes em baixo nível, participem no deterioro porque estes microorganismos podem produzir fortes “off odour” quando foram inoculados em salmão defumado e refrigerado (35, 36). Similares resultados foram reportados por outros autores (30) quando utilizaram extrato cru de bacteriocinas produzidas por *C. divergens* V41 em salmão defumado mantido sob refrigeração, onde fortes “off flavor” e “off odour” foram detectados pelos julgadores. Entretanto, outros autores (37) relatam que não há uma clara relação entre alguns microorganismos e mudanças sensoriais em produtos da piscicultura embalados a vácuo. No presente estudo somente o tratamento com ácido láctico e controle, no dia 25 de armazenamento apresentou rejeição sensorial no atributo aroma, mostrando diferença estatística em relação ao tratamento com extrato cru de bacteriocinas. Esta rejeição sensorial não coincide com a contagem de bactérias, porque não excede o limite considerado como deteriorado ($< 10^7$ UFC/g), embora o desenvolvimento de “off odour” seja o resultado da atividade microbiana (6). Neste estudo foram utilizados filetes com pele, possivelmente incrementando as contagens bacterianas iniciais e incidindo no aroma com produtos do metabolismo microbiano, onde se demonstra que o tratamento com extrato cru de bacteriocinas foi efetivo.

O presente estudo contribui para o reconhecimento do comportamento de bactérias deteriorantes em filetes de pirapitinga x tambaqui biopreservados com um extrato cru de

bacteriocinas, sendo importante observar que os efeitos preservativos não influíram negativamente sobre as características sensoriais.

A atividade antagônica mostra ser um importante agente biopreservante, que poderia ser utilizado em filetes de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo e refrigerados. Esta consideração tem validade uma vez que matriz e temperatura utilizadas facilitam a atividade das substâncias bactericidas.

4 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à professora Olga Inés Montoya, diretora do grupo de pesquisa em Biotecnologia Microbiana da Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, pelo aporte da cepa de *Lactobacillus plantarum* LPMB10 e ao professor Víctor Julio Atencio García, diretor do Centro de Investigación Piscícola da Universidad de Córdoba- CINPIC, pelo aporte dos peixes requeridos para o presente estudo.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Italia; 2004.
2. Zuckerman H, Avraham RB. Control of growth of *L. monocytogenes* in fresh salmon using microgardtand nisin. *Llebensm.-Wiss. U.-Technol.* 2002; 35:543–548.
3. Al-zoreky N, Ayres JW, Sandine WE. Characterization of propionibacterial growth metabolites inhibitory for gram negative bacterial. *J. Cultura and Dairy Prod.* 1993; 184: 4–13.
4. Vázquez JA, González MP, Murado MA. Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources factorial and kinetic studies. *Bioresource Techn.* 2006; 97:605–613.

5. Tomé E, Teixeira P, Gibbs PA. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. *Food Microbiol.* 2006; 23:399–405.
6. Dondero M, Cisternas F, Carvajal L, Simpson R. Changes in quality of vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chem.* 2004; 87: 543–550.
7. González-Rodríguez MN, Sanz JJ, Santos JA, Otero A, García-López, ML. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 77:161–168.
8. Lyhs U, Lahtinen J, Fredriksson-Ahomaa M, Hyytia-Trees E, Elfing K, Korkeala H. Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged ‘gravad’ rainbow trout stored at 3 and 8 °C. *Int. J. Food Microbiol.* 2001;70:221–230.
9. Fricourt BV, Barefoot SF, Testin RF, Hayasaka SS. Detection and activity of plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated de processed channel catfish. *J. Food Protection.* 1994; 57:698-702.
10. Campos CA, Rodríguez O, Calo-Mata P, Prado M, Barros-Velazquez J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Rese. Int.* 2006; 39: 356–364.
11. Yamazaki K, Suzuki M, Kawai Y, Inque N, Montville T. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J. Food Protec.* 2003; 66:1420–1425.
12. Duffès F, Leroi F, Boyaval P, Dousset X. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4 °C. *Int. J. Food Microbiol.* 1999; 47:33–42.

13. Ogunbanwo S.T, Sanni A.I, Onilude A A. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (8), 2003; 219-227.
14. Lewus CB, Kaiser A, Montville TJ. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57:1683-1688.
15. INVIMA. Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológica de alimentos para consumo humano. Bogotá; 1998.
16. Goulas AE, Kontominas MG. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. Food Chem. 2005; 93:511–520.
17. Amerine MA, Pongborn RH, Roescler EB. Principles of sensory evaluation of food. New York: Academic press; 1965.
18. ICMSF. Microorganisms in foods: 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie academic & professional. Baltimore; 1998.
19. Hansen LT, Huss HH. Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. Food Res. Int. 1998; 31: 703–711.
20. Vescovo M, Scolari G, Zacconi C. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. Food Microbiol. 2006; 23:689–693.
21. Garcia T, Martín R, Sanz B, Hernandez PE. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 1995; 35(1)1-18.
22. Quintavalla S, Vicina L. Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat Sci. 2002; 62:373-380.

23. Schöbitz R, González J, Vignolo G, Molina LH. Control de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado mediante la aplicación de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. *La alimentación latinoamericana*. 2006; 264:64-69.
24. Vignolo G, Palacios J, Fariás ME, Sesma F, Schillinger U, Holzapfel W, Oliver G. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 2000; 41:410-416.
25. Crandall D, Montville T, Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 231-237.
26. Schillinger U, Chung H, Keppler K, Holzapfel W. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. *Appl. Microbiol.* 1998; 85:657-663.
27. Duffes F, Corre C, Leroi F, Dousset X, Boyaval P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Protection.* 2000; 62:(12)1394–1403.
28. Vaz-velho M, Todorov S, Ribeiro J, Gibbs P. Growth control of *Listeria innocua* 2030C during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant. *Food Control.* 2005; 16:541–549.
29. Leroi F, Joffraud JJ, Chevalier F, Cardinal M. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physicochemical parameters. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 90: 578– 587.
30. Brillet A, Pilet M, 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. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 104: 309– 324.
31. Joffraud JJ, Cardinal M, Cornet J, Chasles JS, Léon S, Gigout F, Leroi L. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 112: 51–61.
 32. Jorgensen LV, Huss HH, Dalgaard P. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89:920–934.
 33. Gram, L. & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121–137.
 34. Truelstrup L, Gill T, Drewes S, Huss H. Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 1996; 29:(2)181–188.
 35. Joffraud JJ, Leroi F, Roy C, Berdague JL. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 66:175–184.
 36. Stohr V, Joffraud JJ, Cardinal M, Leroi F. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 2001; 34:797– 806.
 37. Lyhs U, Korkeala H, Björkroth J. Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged ‘gravad’ rainbow trout using ribotyping. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 72:147– 153.

Tabela 1. Análise sensorial

Observação (amostra do filete)	Valor
Gostei extremadamente	9
Gostei muito	8
Gostei moderadamente	7
Gostei ligeiramente	6
Me é indiferente (não gostei, não desgostei)	5
Desgostei ligeiramente	4
Desgostei moderadamente	3
Desgostei muito	2
Desgostei extremadamente	1

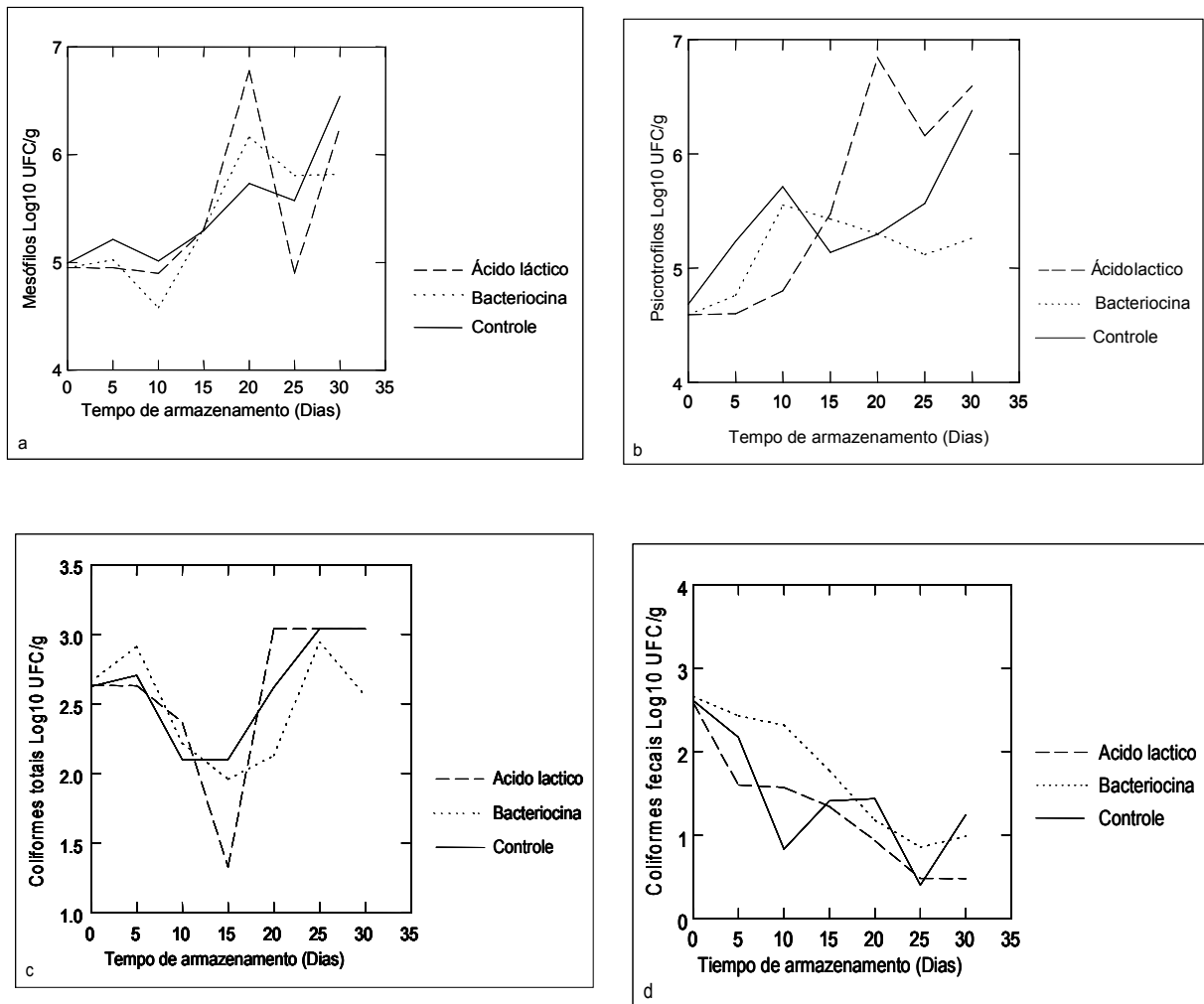


Figura 1. Comportamento microbiológico do extrato de bacteriocinas produzidas por *L. plantarum* LPBM10 em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3 °C para Mesófilos (a), Psicrotófilos (b), Coliformes totais (c) e Coliformes fecais (d).

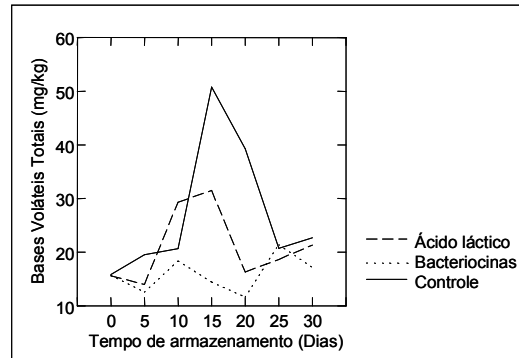


Figura 2. Mudanças em Bases Voláteis Totais de Nitrogênio (BVT-N) em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3 °C.

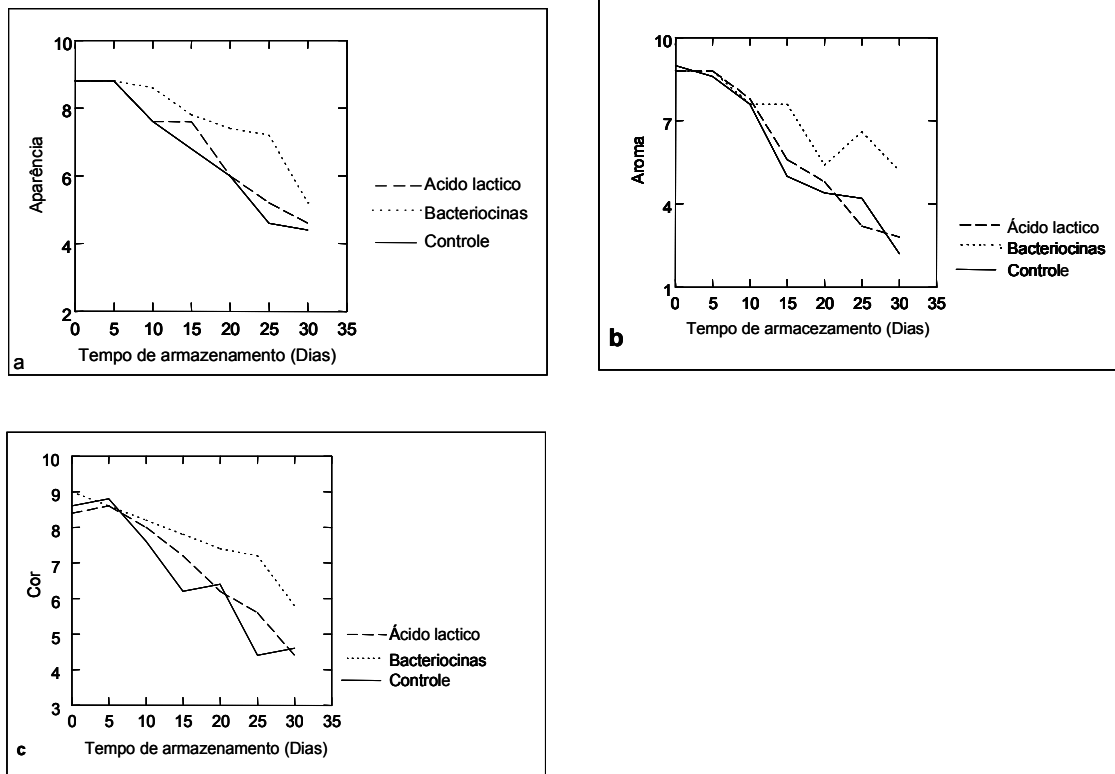


Figura 3. Mudanças sensoriais em filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3 °C. Aparência (a), aroma (b), cor (c).

CAPITULO II.

Caracterização físico-química e atributos sensoriais de filletes talhados de híbrido de *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* embalados a vácuo sob refrigeração

H. Suárez-Mahecha^{a,1}, A. De Francisco^b, L. H. Beirão^b, S. Pardo-Carrasco^c

^a Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Calle 59A #63-20 Medellín, Colombia.

^b Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88040-900 - Florianópolis - SC - Brasil.

^c Departamento de Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia.

Abstract

Physicochemical and sensory changes were evaluated to cachama hybrid fillets *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* biopreserved with a crude bacteriocin extract produced by *Lactobacillus plantarum* LPBM10, vacuum-packed and stored at 30°C during 30 days. The evaluation was performed with three treatments, crude bacteriocin extract, lactic acid and control. The pH values decrease throughout the entire storage period reaching levels of 6.20 at the end of the period. The initial value of TBA for the fillets was of 0,93 mg malonaldehyde/kg, the highest values in TBA were obtained up the day 10 of storage. For this period the lactic acid treatment reached the

¹ Corresponding author. Address: Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Calle 59A #63-20 Medellín, Colombia.
Fax: +55 094 4309067.

E-mail address: (Hector Suarez).

highest value and the lower were observed for the control treatment. The analysis of TVB-N showed the best results for bacteriocin treatment and concluded with 19.3 mg TVB-N/100g. The results of sensory analysis for fresh and cooked cut fillets showed the best acceptability scores for the crude bacteriocin extract treatment.

Key words: Bacteriocins; *Lactobacillus plantarum* LPBM10; Modified atmosphere packaging; Quality changes; Shelf life.

1. Introdução

O frescor da carne é um parâmetro de qualidade que pode se deteriorar rapidamente. Devido ao incremento na demanda por produtos da aquicultura de alta qualidade, têm-se intensificado a procura de métodos e tecnologias que preservem as características sensoriais e vida útil da carne fresca de peixe. Alimentos embalados a vácuo ou em atmosferas modificadas apresentam maior durabilidade (Manju et al 2007). Ainda que esta tecnologia ofereça um risco potencial de segurança nos produtos da aquicultura por estar relacionada ao *Clostridium botulinum* tipo E, os consumidores mostram preferências pelo manuseio destes produtos devido ao bom aspecto, embalagem com seguridade, atrativa, aparência higiênica e extensão da vida útil, características que favorecem o contínuo incremento de produtos da aquicultura (Özogul & Özogul, 2006). Este método de embalagem pode ser complementar à utilização de métodos de biopreservação juntamente com a refrigeração para manter a alta qualidade, proporcionando segurança, reduzindo as perdas econômicas e favorecendo a oferta de novos produtos, como os filetes de alguns peixes que até o momento não eram destinados a este propósito. A utilização de agentes biopreservantes como as bacteriocinas têm sido consideradas um método ideal pela inocuidade, segurança e efetividade no controle de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Vázquez,

González, & Murado, 2006; Degenhardt e Sant'anna, 2007) se apresentando na atualidade como uma alternativa para diminuir a utilização de aditivos e compostos preservativos de origem química.

Em relação à preferência de consumo, parte da população que consome peixe não está habituada ao consumo de espécies que apresentem espinhas intramusculares, dificultando a comercialização e consumo das mesmas. Nesse sentido, embora o híbrido de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresentem espinhas intramusculares, são espécies economicamente importantes na aqüicultura e de grande demanda em alguns setores da população de diversos países da América do Sul. O filete é a porção comestível de maior demanda por parte dos consumidores, entretanto, a oferta de filetes de espécies que apresentam espinhas intramusculares se torna complexo devido à escassez de tecnologias para mitigar o efeito indesejável ocasionado no momento do consumo da carne de peixe. O propósito do presente trabalho foi valorizar os filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo num sistema de biopreservação e refrigeração, através de testes sensoriais e físico-químicos.

2. Material e métodos

2.1 Empacotamento e condições de armazenamento

Os peixes híbridos de pirapitinga x tambaqui *Piaractus brachypomus x Colossoma macropomum* foram obtidos do Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba - CINPIC, Montería, Colômbia em setembro de 2006. Os peixes capturados do viveiro foram imediatamente abatidos por meio de punção no cérebro e transportados ao laboratório. O peso e comprimento médio dos peixes foi de 590 ± 87 g e 32 ± 1.7 cm respectivamente. Os filetes com pele foram obtidos manualmente usando uma faca

asséptica. O peso médio dos filetes foi 32.4% do peso inicial dos peixes. Em cada filete em posição lateral interna foram realizados cortes profundos, paralelos e perpendiculares a espinha dorsal (talhado), a uma distância de 3 mm entre cada corte, em sentido antero-caudal. A pele foi conservada intacta para proporcionar estabilidade ao filete.

O extrato concentrado de bacteriocinas produzida por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 foi fornecido pelo laboratório de Microbiologia Industrial do grupo de pesquisa em Biotecnologia Microbiana da Universidad Nacional de Colômbia sede Medellin. Este extrato, contendo 40mg de proteína tipo bacteriocinas, foi adicionado a superfície de cada filete em quantidade de 1 mL utilizando uma micropipeta.

Os tratamentos foram os seguintes:

T1: Extrato concentrado de bacteriocina: 1mL contendo 40mg de extrato concentrado de bacteriocina produzidas por *L. plantarum* LPBM10.

T2: Ácido láctico: 1mL de ácido láctico ajustado a pH 6,32, estimado previamente durante a armazenagem a vácuo do filete.

T3: Controle: 1mL água destilada

Cada filete talhado foi empacotado a vácuo em sacolas de polietileno de baixa densidade com barreira de transmissão de oxigênio de 29-45 ml/O₂/m²/ 24h/atm medido a 23°C e barreira de permeabilidade a gases de 10–15 g /m² / 24h /medido a 38°C marca CRYOVAC, utilizando uma empacotadora a vácuo WEBOMATIC 82246 (West Germany), e armazenado sob refrigeração (3 ± 0.5⁰C) por um período de 30 dias. As análises foram realizadas aos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias da armazenagem. Os filetes em triplicatas foram submetidos à análise físico, químico e sensorial.

2.2 Análise físico-química

Composição bromatológica: a composição proximal foi determinada pelo método da AOAC (1998).

Determinação do pH: O pH foi determinado usando um eletrodo de 6-mm inserindo diretamente o eletrodo no filete (Crison, Barcelona, Spain).

Perda de água: A perda de água foi determinada modificando a equação proposta por Roth, Slinde, e Arildsen (2006) onde os filetes são pesados nas diferentes datas de avaliação, determinando o peso inicial e final mediante a equação a seguir:

$$\text{Perda de água} = \frac{\text{Peso inicial filete} - \text{Peso final filete}}{\text{Peso inicial filete}} \times 100$$

Determinação de bases voláteis totais de nitrogênio: Para a determinação das bases voláteis totais de nitrogênio foi utilizado o método proposto por Goulas & Kontominas, (2005) onde 10g de amostra da carne de peixe foi moída com 50 mL de água destilada usando um picador Moulinex. O material foi transferido com 200 mL de água destilada a um becker de 500 mL e destilado depois da adição de 2g de MgO e uma gota de silicone para prevenir a formação de espuma. Um Erlenmeyer de 250 ml contendo 25mL de solução de ácido bórico 3%, 0.04 mL de vermelho metilo e azul de metileno como indicadores para o tratamento do amônio foi utilizado para receber o destilado. A destilação foi continuada atingindo um volume final de 125 mL do destilado obtido. Através do destilado de bases voláteis totais de nitrogênio (BVTN), a solução de ácido bórico torna-se verde quando alcalina. A solução foi tratada posteriormente com solução 0.1 N de ácido hidrolórico. A destilação foi concluída quando a cor do destilado passou a rosado pela adição gota a gota do ácido hidrolórico. A quantidade de BVTN em

mg/100 g da carne de peixe foi calculada a partir do volume (V) de ácido hidroclórico adicionado e sua concentração (C) pela seguinte equação:

$$\%mg\ BVTN = \frac{(V \times C \times 14 \times 100)}{10}$$

Determinação de ácido 2-tiobarbitúrico: Para a determinação de ácido 2-tiobarbitúrico foi utilizado o método baseado na quantificação espectrofotométrica do complexo rosado depois da reação de uma molécula de malonaldeído produto da destilação, com duas moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico adicionado no destilado (Goulas & Kontominas, 2007).

Preparação da solução de ácido tiobarbitúrico TBA: A solução de TBA foi preparada pesando 0.3 g de TBA (Merck, Germany) adicionada a um becker de 100 mL com 90 mL de água destilada. O becker foi colocado num banho-maria à 80°C até a completa dissolução. 100mL da solução foi transferida a outro recipiente e completada com água destilada até atingir a concentração de 0.021 M.

Determinação de TBA: A amostra da carne de peixe (50 g) foi picada após a adição de 6 ml de solução etanólica de hidroxitolueno butilado (BHT, 1 g l⁻¹) para prevenir a oxidação. Uma fração homogeneizada de 10 g foi transferida a um becker onde foi adicionada uma gota de agente antiespumante de silicone (Merck, Germany), 2.5 mL de HCl 4 N e 97,5 mL de água destilada. Esta amostra foi destilada e os primeiros 50 mL do destilado foram coletados. A destilação foi realizada por triplicata. Posteriormente, foi acrescentado 0.6ml de BHT (1g l⁻¹) a 5ml do destilado e, 5ml de 0.021 M TBA foram colocados em tubo de ensaio com tampa rosca e aquecidos em banho-maria (90°C) por 40 minutos para o desenvolvimento de cor rosada. Posteriormente foi

determinada a densidade óptica a 532 nm num espectrofotômetro SECOMAM ANTHELIE modelo 70ST0375 (Secomam, France) usando como controle a solução contendo 5 ml de água destilada, 5 ml de solução de TBA e 0.6 ml BHT (1 g l^{-1}). Os valores de TBA foram expressos como mg de malondialdeído (MDA)/kg de mostra. A concentração MDA foi calculada da curva padrão usando 1,1,3,3-tetraethoxy- propane (TEP) como composto padrão (Goulas & Kontominas, 2007).

2.3. Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada pelo método tradicional de julgar a qualidade de filetes de peixe em amostras de 90g por cinco julgadores treinados. Em filetes frescos foram avaliados os atributos sensoriais aparência, cor e aroma. Em filetes cozidos foi avaliado o atributo sabor, onde a mostra foi cozida individualmente em um microondas na potência máxima durante 3 minutos. A pontuação foi baseada sobre uma escala hedônica de nove pontos classificados da seguinte forma: Gostei extremamente 9, Gostei muito 8, Gostei moderadamente 7, Gostei ligeiramente 6, É indiferente (não gostei, não desgostei) 5, Desgostei ligeiramente 4, Desgostei moderadamente 3, Desgostei muito 2, Desgostei extremamente 1, descrita por Amerine, Pongborn, e Roescler (1965). O valor sensorial de 4 foi tomado como a faixa mínima de aceitabilidade.

2.4 Desenho experimental e análise de dados

Para o estudo do efeito de três tratamentos de conservação: ácido láctico, bacteriocinas, controle e tempo de armazenamento sobre os atributos de qualidade dos filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui, foi realizado um desenho fatorial com dois fatores (tempo e conservação). Foram empregados três níveis de conservação e sete níveis de

tempo de armazenamento (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias). Foram utilizadas três réplicas para cada experimento para um total de 63 amostras. Foi utilizada ANOVA sobre os resultados para avaliar o efeito de conservação (A), tempo (B) e a interação entre efeito (A x B) sobre os atributos de qualidade. A diferença entre a média dos valores dos diferentes tratamentos e o período de armazenamento foi determinada pelo teste de mínima diferença significativa (LSD), e a significância estatística foi definida como $P \leq 0.05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Mudanças no pH e perda de água

A composição bromatológica do filete talhado de híbrido de pirapitinga x tambaqui foi: umidade 79.75%, gordura 0.56%, proteína 18.71% e cinzas 0.98%. Similares resultados foram reportados pela FAO (1992) para a carne de tambaqui.

As mudanças no pH dos filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui são mostradas na tabela 2. O valor inicial do pH dos filetes controle foi de 6.50. Este valor corrobora com Lyhs et al. (2001), quando reportam valores de pH de 6.40 para filetes de truta arco-íris. O pH manteve-se constante durante o período de armazenamento para os três tratamentos, embora tenha sido observado uma leve diminuição do pH no final deste período. As variações durante o período de armazenamento não foram estatisticamente significativas, concordando com Arashisar et al. (2004), para filetes de truta arco-íris, onde as variações ao longo do período de armazenamento foram leves. Entretanto, no presente trabalho, somente no período de armazenamento compreendido entre os dias 5 e 10 entre tratamentos, observaram-se diferenças estatísticas.

A leve diminuição nos valores de pH pode ser atribuída a dissolução de CO_2 no músculo do peixe e a conseguinte dissociação do ácido carbônico em baixas

temperaturas (Statham, 1984). Entretanto Sivertsvik, Rosnes, e Jeksrud (2004) consideram que o incremento de ácido carbônico dissolvido no tecido muscular, está associado as altas concentrações de CO₂, evento que pode afetar a qualidade dos filetes. A presente pesquisa foi realizada em embalagem a vácuo, onde se considera que a respiração do tecido de peixe poderia finalmente gerar atmosfera de CO₂ entre 20% a 30%. Similares observações foram realizadas por Meekin, Hulse, e Bremner (1982) quando reportaram uma leve diminuição do pH em filetes de “sand flathead” *Platycephalus bassensis* embalados a vácuo e armazenados a 4⁰C durante seis dias.

Um importante fator intrínseco relacionado a carne de peixe é o alto pH (>6.0) post-mortem. A maior parte dos peixes contêm poucas quantidades de carboidratos (<0.5%) no músculo e somente pequenas quantidades de ácido láctico são produzidas em estado post mortem (Gram & Huss, 1996). Durante o armazenamento a decomposição dos compostos nitrogenados poderia incrementar o pH na carne fresca do peixe, o qual pode ser atribuído a produção de compostos alcalinos. Este incremento no pH indica o crescimento bacteriano, perda de qualidade e possível deterioração. Entretanto, no presente estudo os valores de pH mais constantes foram no tratamento com extrato cru de bacteriocinas, onde os valores de compostos nitrogenados foram menores, mas mostrando no final do período de armazenamento diminuição do pH.

As variações na perda de umidade para filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui são mostrados na tabela 3. A perda de umidade entre tratamentos mostra significância estatística (P<0.05). A maior perda foi apresentada no tratamento com ácido láctico 5.50% e a menor no tratamento com extrato cru de bacteriocinas 3.82% no final do período de armazenamento. Resultados similares foram obtidos por Torrieri, Cavella, Villani, e Masi (2006) trabalhando com robalo *Dicentrarchus labrax* na determinação da vida útil em atmosferas modificadas onde consideram que perdas de

umidade menores que 3-5% não afetam de forma significativa a suculência da carne de peixe. Entretanto Randell, Hattula, e Ahvenainen (1997) relatam que a vida útil de filetes de truta arco-íris embalados em atmosfera modificada (35% CO₂) foi limitada pela excessiva perda de água ou “drip” formada durante a armazenagem, sendo menor quando os filetes não foram embalados em atmosferas modificadas.

3.2 *Mudanças nos valores de ácido tiobarbitúrico TBA*

O valor inicial de TBA para os filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui foi de 0,93 mg de malonaldeído/kg. Estes valores incrementaram até o dia 10, diminuindo a partir do dia 15, apresentando diferença estatística ($p < 0.05$) entre os três tratamentos. Neste período o maior valor foi alcançado para o tratamento com ácido láctico e o menor para o tratamento controle. O maior valor alcançado no tratamento com bacteriocinas foi 2,33 mg de malonaldeído/kg correspondendo ao dia 25 de armazenamento. Valores similares foram obtidos para os dois tratamentos restantes no dia 10 de armazenamento (Figura 1).

Os ácidos graxos dos peixes durante o armazenamento são vulneráveis a oxidação lipídica, a qual pode originar sérios problemas de qualidade como olores e sabores indesejáveis, também podem produzir alterações na textura, cor e valores nutricionais, incluso em armazenamento a temperaturas sob zero (Huss, 1995; Ólafsdóttir et al., 1997). As reações envolvidas na oxidação lipídica são de origem não enzimática, ou catalisadas por enzimas microbianas ou enzimas digestivas próprias do peixe. O relativo significado destas reações depende principalmente das espécies de peixes e temperatura de armazenamento (Huss, 1995).

É possível que os efeitos do extrato cru de bacteriocinas sobre a oxidação lipídica dos filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui possa ser dependente de uma variedade de fatores que incluem o crescimento bacteriano, método de embalagem e tempo de armazenamento. Tem-se proposto que o máximo nível de valor de TBA indicando boa qualidade para peixes congelados, refrigerados ou armazenados em gelo seja de 5 mg malonaldeído/kg, entretanto são aceitáveis valores de até 8 mg malonaldeído/kg para o consumo de alguns peixes (Schormüller, 1969). No presente estudo, os valores de TBA para as amostras analisadas dos tratamentos controle, ácido láctico e bacteriocinas dos filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui, foram menores que os limites propostos anteriormente, durante o período de 30 dias de armazenamento. Pelo contrário, valores mais elevados para TBA foram encontrados em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* inteira (16.21 µg/g) e filetes (19.41 µg/g) depois de 18 dias de armazenamento em gelo (Chytiri, Chouliara, Savvaidis, & Kontominas, 2004), e também em diferentes espécies de peixes graxos do mediterrâneo (7.43–20.98 mg MA/kg) para um período de armazenamento de 6 dias em quarto frio a 1–3⁰C (Simeonidou, Govaris & Vareltzis, 1998). Embora valores mais baixos de TBA foram reportados para “sea bass” *Dicentrarchus labrax* inteiro (1.52–4.48 µg/kg) e eviscerado (1.35–7.31 µg/kg) armazenado em gelo por 16 dias (Papadopoulos et al, 2003).

Segundo Auburg (1993), valores de TBA poderiam não revelar o atual estado de oxidação lipídica, principalmente porque o malonaldeído pode interatuar com outros componentes da carne de peixe, como aminas, nucleósidos e ácidos nucléicos, proteínas e outros aldeídos que são o produto final da oxidação lipídica, e esta interação pode variar de acordo a espécie de peixe. Isto poderia explicar os diferentes incrementos de valores de TBA ao longo da armazenagem (Tejada & Huidobro, 2002). O efeito do talhado nos filetes de pirapitinga x tambaqui poderia afetar os níveis de rancidez se

fossem expostos ao oxigênio atmosférico durante o armazenamento, mas provavelmente o CO₂ gerado na embalagem a vácuo impediria este evento.

O relativo baixo incremento nos valores de TBA para os tratamentos controle, bacteriocinas e ácido láctico neste estudo, indica os lipídios dos filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo, são estáveis durante o armazenamento refrigerado, quando comparados com outras espécies de peixes graxos como sardinhas, “mackerel” e truta arco-íris.

3.3. *Mudanças nos valores de bases voláteis totais de nitrogênio (BVT-N)*

Os resultados das mudanças nas bases voláteis totais de nitrogênio (BVT-N) de filetes de híbrido pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3^oC são mostrados na figura 2.

As bases voláteis totais incrementaram no seu valor inicial de 15.7 mg BVT-N/100mg para o tratamento controle e ácido láctico até o dia 15, ultrapassando o limite aceitável (30 mg BVT-N/100g) segundo Leroi et al. (2001). Entretanto se observa diminuição dos valores a partir do dia 15 com um leve aumento no final do período de armazenamento. Ao contrário, no tratamento com extrato cru de bacteriocinas, os valores foram estáveis até o dia 20 de armazenamento, incrementando no dia 25 e finalizando com 19.3 mg BVT-N/100g ($p < 0.05$).

O incremento dos valores de BVT-N nos tratamentos com ácido láctico e controle, frente ao tratamento de extrato cru de bacteriocinas, ao longo do período de armazenamento, poderia estar influenciado pela interação entre as bactérias ácido lácticas, originadas na embalagem a vácuo e na contaminação bacteriana inicial (Brillet et al., 2005). Joffraud et al. (2006), atribuiu à interação entre populações de bactérias os

baixos valores BVT-N obtidos no salmão defumado quando inoculado com *L. sakei* frente a psicrotrófilos produtores de BVT-N. No presente estudo o tratamento com extrato cru de bacteriocinas mostra esta tendência, ao manter controlada a população de bactérias psicrotrófilas. Por outro lado, nossos resultados não corroboram com os obtidos por Jorgensen et al. (2000a) onde altos valores para aminas biogênicas foram obtidos através do uso com substâncias bacteriocinas produzidas por *L. sakei* no salmão defumado.

Compreender a ecologia microbiana é fundamental para o desenvolvimento de técnicas de biopreservação que tenham como objetivo melhorar a vida útil e garantir a qualidade dos alimentos.

O substrato, a composição de nutrientes e os parâmetros físicos e químicos entre outros fatores, são determinantes na valorização da carne de peixe biopreservada. Além disso, interação entre a formação de compostos nitrogenados, pH e compostos produzidos a partir da oxidação dificultam a compreensão da dinâmica de biopreservação em embalagem a vácuo.

3.4. *Analises sensoriais*

Os resultados das análises sensoriais de filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3 °C são mostrados na tabela 4.

Com o incremento do período de armazenamento, a vida útil dos filetes de *Piaractus bra, chypomus x Colossoma macropomum* diminui. Os atributos sensoriais avaliados pelos julgadores durante o período analisado para os filetes frescos foram: aparência, cor e aroma e para os filetes cozidos foi o sabor. As melhores pontuações foram obtidas para os atributos de aparência e cor no final do período de armazenamento, sendo superiores ao limite de aceitabilidade estimado em 4. Não obstante, o tratamento com

extrato cru de bacteriocinas conseguiu a melhor pontuação no final do período de armazenamento ($p < 0.05$). Para o atributo aroma, os tratamentos com ácido láctico e controle estiveram fora da faixa de aceitabilidade, embora o tratamento com extrato cru de bacteriocinas tenha registrado um alto grau de aceitabilidade por parte dos julgadores ($p < 0.05$) no final do período de armazenamento. Para os atributos de aparência e cor a pontuação obtida foi superior ao limite estabelecido para o final do período, sendo superior ao tratamento com extrato cru de bacteriocinas ($p < 0.05$).

Nos filetes cozidos, o atributo sabor foi rejeitado pelos julgadores no final do período de armazenamento para os tratamentos ácido láctico e controle. Os julgadores não encontraram presença de espinhas intramusculares durante a valorização.

A opacidade, descoloração da pele e a presença de “off flavour” foram as principais causas atribuídas as pontuações obtidas nos tratamentos. Em concordância com os resultados da avaliação físico-química e sensorial, as enzimas proteolíticas poderiam ser consideradas como responsáveis pelo impacto sobre a perda de qualidade dos filetes de peixe, mas nem sempre responsáveis pelos característicos “off flavour” e “off odour” que são típicos da atividade microbiana (Truelstrup et al., 1996).

Resultados similares têm sido reportados por Brillet et al. (2005) quando utilizaram extrato cru de bacteriocinas produzidas por *C. divergens* V41 em salmão defumado mantido sob refrigeração, onde fortes “off flavour” e “off odour” foram detectados pelos julgadores.

Nos filetes frescos, rejeição por parte dos julgadores no atributo aroma, foi apresentada somente para o tratamento com ácido láctico, a partir do dia 25 de armazenamento.

4. Conclusões

Com a finalidade de incrementar a vida útil dos filetes de híbrido de pirapitinga x tambaqui a utilização de biopreservantes como o extrato cru de bacteriocinas produzidas pelo *Lactobacillus plantarum* LPBM10, é uma interessante alternativa. A presente pesquisa encontrou os melhores indicadores físico-químicos e sensoriais para os filetes tratados com o extrato cru de bacteriocinas.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a professora Olga Inés Montoya, diretora do grupo de pesquisa em Biotecnologia Microbiana da Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, pelo aporte da cepa de *Lactobacillus plantarum* LPMB10 e ao professor Víctor Julio Atencio García, diretor do Centro de Investigación Piscícola da Universidad de Córdoba- CINPIC, pelo aporte dos peixes requeridos para o presente estudo.

6 Referências bibliográficas

- Amerine, M. A., Pongborn R. H., & Roescler, E. B. (1965). *Principles of sensory evaluation of food*. New York: Academic Press.
- Ando, M., Nishiyabu, A., Tsukamasa Y., & Makinodan, Y. (1999). *Post mortem Softening of Fish Muscle During Chilled Storage as Affected by Bleeding*. *Journal of Food Science*, 64, 423-428.
- AOAC. (1998). *Official methods of analysis* 17th ed. Washington, DC: Association of Official analytical Chemists.
- Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M., & Yanik T. (2004). Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 209–214.
- Auburg, S. P., (1993). Review: Interaction of malondialdehyde with biological molecules- new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 323–335.
- Brillet, A., Pilet, M., Prevost, H., Cardinal, M., & Leroi, F. (2005). 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*, 104, 309– 324.
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2004). Microbiological, chemical, and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology*, 21, 157–165.
- Degenhardt, R and Sant'anna, E. (2007). Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid italian sausage produced under brazilian conditions. *Braz. J. Microbiol.* 38, 309-314.
- FAO. (1992). *Evaluación y aprovechamiento de la cachama cultivada, como fuente de alimento*. Mexico, D.F.
- Goulas, A. E. & Kontominas M. G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93, 511–520.
- Goulas, A. E. & Kontominas M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100, 287–296.
- Gram, L. & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121–137.

- Huss, H. H. (Ed.) (1995). *Quality and quality changes in fresh fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy.
- Joffraud, J. J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J. S., Léon, S., Gigout, F., & Leroi, L. (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 51–61.
- Jorgensen, L. V., Huss, H. H., & Dalgaard, P. (2000). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 920–934.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., & Cardinal, M. (2001). Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physicochemical parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 578–587.
- Lyhs, U., Latineen, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Hyytia-Trees, E., Elfing, K., & Korkeala, H. (2001). Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged ‘gravad’ rainbow trout stored at 3 and 8 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 221–230.
- Manju, S., Leema, J., Srinivasa-Gomal, T. K., Ravishankar, C. N., & Lalitha, K. V. (2007). Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearlsplit (*Etroplus suratensis*) during chill storage. *Food Chemistry*, 102, 27–35.
- Meekin, T. A., Hulse, L., & Bremner, H. A. (1982). Spoilage association of vacuum packed sand flathead (*Platycephalus bassensis*) fillets. *Food Technology Australia*, 34(6), 278–282.

- Mizuta, S., Fujisawa, S., Nishimoto, M., & Yoshinaka, R. (2005) Biochemical and Immunochemical Detection of Types I and V Collagens in Tiger Puffer *Takifugu rubripes*. *Food Chemistry*, 89, 373-377.
- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., & Undeland, I. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 258–265.
- Özogul, F., & Özogul, Y. (2006). Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chemistry*, 99, 574–578.
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20, 411–420.
- Randell, K., Hattula, T., & Ahvenainen, R. (1997). Effect of packaging method on the quality of rainbow trout and Baltic herring fillets. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30, 56–61.
- Roth, B., Slinde, E., & Arildsen, J. (2006). Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. *Aquaculture*, 257, 504–510.
- Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K., & Kawabata, M. (1991). Type V Collagen in Trout (*Salmo gairdneri*) Muscle and its Solubility Change Chilled Storage of Muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1222-1225.
- Schormüller, J. (1969). *Handbuch der lebensmittelchemie* (Band IV). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- Simeonidou, S., Govaris, A., & Vareltzis, K. (1998). Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Research International*, 30, 479–484.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J. T., & Jeksrud, W. K. (2004). Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: raw fish fillets. *Journal of Food Engineering*, 63, 451–458.
- Statham, J. A. (1984). Modified atmosphere storage of fisheries products: the state of the art. *Food Technology in Australia*, 36, 233–239.
- Tejada, M., & Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*, 215, 1–7.
- Torrieri, E., Cavella, S., Villani, F., & Masi, P. (2006). Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Food Engineering*, 77, 1078–1086.
- Truelstrup, L., Gill, T., Drewes, S., & Huss, H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International*, 29, 181–188.
- Vázquez, J. A., González, M. P., & Murado, M. A. (2006). Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources Factorial and kinetic studies. *Bioresource Technology*, 97, 605–613.

Tabela 1. Análise sensorial

Observação (amostra do filete)	Valor
Gostei extremadamente	9
Gostei muito	8
Gostei moderadamente	7
Gostei ligeiramente	6
Me é indiferente (não gostei, não desgoste)	5
Desgostei ligeiramente	4
Desgostei moderadamente	3
Desgostei muito	2
Desgostei extremadamente	1

Tabela 2

Valores do pH para filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo armazenados a $3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias.

Tempo de armazenamento (Dias)	Controle	Bacteriocinas	Ácido láctico
0	6.53±0.18 ^a	6.53±0.20 ^a	6.53±0.22 ^a
5	6.41±0.01 ^a	6.23±0.03 ^b	6.31±0.06 ^c
10	6.32±0.03 ^a	6.23±0.03 ^b	6.42±0.01 ^c
15	6.31±0.03 ^a	6.32±0.03 ^a	6.41±0.01 ^a
20	6.34±0.05 ^a	6.30±0.01 ^a	6.34±0.03 ^a
25	6.23±0.02 ^a	6.24±0.04 ^a	6.33±0.02 ^a
30	6.21±0.02 ^a	6.20±0.02 ^a	6.21±0.03 ^a

^{a,b,c} Valores na mesma linha seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.01$). Os valores são expressos como a Média \pm DS ($n = 3$).

Tabela 3

Perda de umidade em porcentagem para filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalados a vácuo e armazenados a $3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Tempo de armazenamento (Dias)	Controle	Bacteriocinas	Ácido láctico
5	1.57±0.06 ^a	2.11±0.11 ^b	1.47±0.06 ^c
10	2.83±0.06 ^a	1.25±0.05 ^b	0.35±0.05 ^c
15	3.27±0.15 ^a	2.45±0.05 ^b	0.14±0.0 ^c
20	5.13±0.15 ^a	3.63±0.06 ^b	4.80±0.10 ^c
25	5.20±0.10 ^a	4.30±0.10 ^b	5.40±0.10 ^c
30	4.37±0.15 ^a	3.82±0.10 ^b	5.50±0.10 ^c

^{a,b,c} Valores na mesma linha seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0.01$). Os valores são expressos como a Média \pm DS (n = 3).

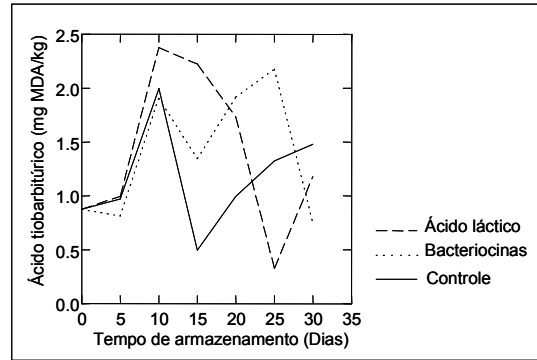


Figura 1. Mudanças em ácido tiobarbitúrico TBA em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3 °C.

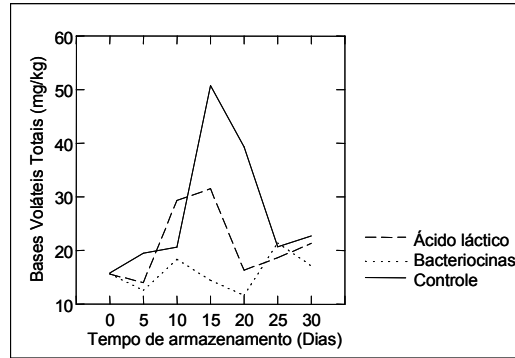


Figura 2. Mudanças em Bases Voláteis Totais (BVT) em filetes talhados de híbrido de pirapitinga x tambaqui embalado a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3 °C.

Tabela 4. Atributos sensoriais para filetes talhados de híbrido de *Piaractus brachipomus* x *Colossoma macropomum* embalados a vácuo e armazenados a $3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias.

ATRIBUTO	TRATAMENTO	DIAS DE ARMAZENAMENTO						
		0	5	10	15	20	25	30
Aparência	Controle	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	6.8±0.8 ^c	6.0±0.7 ^d	4.6±1.1 ^e	4.4±0.5 ^f
	Bacteriocina	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	8.6±0.5 ^a	7.8±0.4 ^b	7.4±0.5 ^b	7.2±0.8 ^b	5.2±0.8 ^c
	A. láctico	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	7.6±0.5 ^b	6.0±1 ^c	5.2±0.4 ^d	4.6±0.5 ^e
Cor	Controle	8.6±0.5 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	6.2±0.8 ^c	6.4±0.5 ^{cd}	4.4±0.5 ^e	4.6±0.5 ^e
	Bacteriocina	9.0±0.0 ^a	8.6±0.5 ^a	8.2±0.4 ^b	7.8±0.4 ^b	7.4±0.5 ^{bc}	7.2±0.4 ^c	5.8±0.4 ^d
	A. láctico	8.4±0.5 ^a	8.6±0.5 ^a	8±0.7 ^{ab}	7.2±0.8 ^b	6.2±0.8 ^c	5.6±0.5 ^d	4.4±0.5 ^d
Aroma	Controle	9.0±0.0 ^a	8.6±0.5 ^a	7.60.5 ^b	5±0.7 ^c	4.4±0.5 ^d	4.2±0.8 ^d	2.2±0.4 ^e
	Bacteriocina	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	7.6±0.5 ^b	5.4±0.5 ^c	6.6±0.5 ^d	5.2±0.4 ^c
	A. láctico	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.8±0.4 ^b	5.6±0.5 ^c	4.8±0.8 ^d	3.2±0.8 ^e	2.8±0.4 ^e
Sabor	Controle	8.8±0.4 ^a	8.6±0.5 ^a	7.4±0.5 ^b	6.2±0.4 ^c	5.2±0.8 ^d	4.6±0.5 ^e	2.6±1.1 ^f
	Bacteriocina	8.8±0.4 ^a	8.6±0.5 ^a	7.8±0.4 ^b	7.4±0.5 ^b	5.8±0.4 ^c	6.4±0.5 ^c	4.4±0.5 ^d
	A. láctico	8.8±0.4 ^a	8.4±0.5 ^a	7.4±0.5 ^c	6.2±0.4 ^d	5.4±0.5 ^e	4.2±0.4 ^f	3.2±0.8 ^f

a-f Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes tem diferencia estatística ($p < 0.05$)

CAPITULO III.

Análise estrutural de filetes talhados de híbrido de pirapitinga (*Piaractus braquypomus*) x tambaqui (*Colossoma macropomum*) embalados a vácuo utilizando-se bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10

Hector SUAREZ-MAHECHA^{a,*}, Alicia de FRANCISCO^b, Luiz H. BEIRÃO^b

^aDepartamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia.

^bDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Brasil.

Resumo

Foram analisadas as mudanças na microestrutura, textura e análise sensorial de filetes talhados de híbrido de *Piaractus braquypomus* x *Colossoma macropomum* embalados a vácuo e submetidos a resfriamento durante 30 dias a 3°C sob três tratamentos de preservação: extrato cru de bacteriocinas, ácido láctico e controle. O espaço entre as fibras musculares foi aumentando gradualmente e o arranjo arquitetônico foi alterado ao longo do período de armazenamento nos três tratamentos. A menor alteração na degradação do tecido conectivo e o menor incremento do espaço entre as fibras musculares foram observados por meio da microscopia de luz no tratamento com extrato cru de bacteriocinas. A análise instrumental de textura mostra perda de firmeza dos filetes sem diferença estatística entre os tratamentos. A análise sensorial demonstra que o tratamento do talhado foi efetivo na diminuição da percepção das espinhas intramusculares, obtendo as melhores pontuações nos filetes talhados tratados com bacteriocinas.

Palavras-chave: Peixes; Tecido conectivo; Microestrutura; Filetes talhados

Abstract

Structural analyses of cut cachama hybrid fillets *Piaractus branchyomus x Colossoma macropomum* using bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPBM10 vacuum packed

Microstructure, texture and sensory changes were studied in cut cachama hybrid fillets vacuum packed refrigerated during 30 days at 3°C under three preservative treatments: crude bacteriocins extract, lactic acid and control. Space among the muscle fibers increasing gradually and the architectural arrangement was altered in all treatments throughout the entire storage period. By means of light microscopy technique was observed the lower alteration in the connective tissue degradation and the increment in muscle fibers space treated with crude bacteriocin extract. The instrumental analysis of texture shows stability loss of fillets without statistical difference among treatments. Sensory analysis proves that cutting treatment is effective to diminish the negative effect of intramuscular thorns. The best scores were for cutting fillets with bacteriocin treatment.

Keywords: Fish; Connective tissue; Microstructure; Filet cut; Muscle

1 Introdução

A pirapitinga e o tambaqui são espécies nativas das bacias dos rios Orenoco e Amazonas (JEGU, 2003), consideradas espécies com alto potencial produtivo e comercial na piscicultura extensiva, semi intensiva e intensiva de águas cálidas continentais da América tropical, além disso são espécies resistentes ao manuseio em cativeiro, apresentam alta docilidade e rusticidade e são resistentes a doenças (HERNANDEZ, 1994). Apesar da importância econômica destas espécies, poucos estudos em relação a perda de textura por efeito do armazenamento sob refrigeração e

alternativas tecnológicas que mitiguem o efeito das espinhas intramusculares para os consumidores foram realizados.

Os fatores de qualidade considerados na carne de peixe são: textura, cor, gosto e sabor. Neste sentido, a estrutura muscular pode afetar alguns destes parâmetros de qualidade por efeito do armazenamento.

A textura tem sido considerada como um dos critérios de qualidade da carne, uma característica sensorial para o consumidor e um importante atributo para o processamento mecânico dos filetes. A importância da textura macia é relevante para o consumidor. Nesse sentido, a indústria exige métodos que preservem esta textura e respondam pela maciez dos mesmos.

As propriedades da textura dependem da composição química e das propriedades estruturais, em particular das miofibrilas e proteínas do tecido conectivo. O tecido conectivo é formado por uma rede que proporciona suporte corporal através da musculatura dos peixes. O conteúdo do tecido conectivo é pouco e melhor distribuído no músculo dos peixes, quando comparado com animais de sangue quente, desta forma incrementa-se a firmeza ao longo do eixo anterior-posterior do filete (KIESSLING, RUOHONEN, BJØRNEVIK, 2006).

Os efeitos sobre a textura podem ser considerados como uma manifestação das propriedades funcionais e reológicas, onde a carne de peixe difere da carne bovina por conter menos tecido conectivo e ter as ligações cruzadas formadas entre as moléculas do colágeno mais fracas, resultando numa estrutura mais macia (ASHIE, SMITH, SIMPSON, 1996).

A carne de peixe está organizada em segmentos concêntricos musculares (miótomos) rodeados por tecido conectivo intramuscular (TCIM). Os maiores constituintes identificados no TCIM incluem colágeno e fibras elásticas, células (fibroblastos,

adipósitos, macrófagos), glicoproteínas e proteoglicanos. Os miótomos estão separados pelo miocommata, onde grupos de fibras de colágeno correm paralelamente de forma adjacente em ângulos que formam camadas entrelaçadas e que proporcionam força mecânica considerável (BREMNER, 1999). Uma camada de tecido conectivo delgado, o endomísio, rodeia cada célula muscular (miofibra) e às vezes se conecta com o perimísio, ficando este contíguo ao miocommata.

O colágeno é o componente fibrilar do tecido conectivo, sendo designado por tipo e numeral romano. O colágeno tipo I e tipo V estão presentes no TCIM dos peixes, sendo o colágeno tipo I o maior constituinte do miocommata (SATO et al, 1989).

A contribuição do conteúdo de colágeno às propriedades de textura na carne de peixe tem sido avaliadas por vários autores (ANDO et al, 1999; HATAE et al, 1989). Neste sentido, a carne de algumas espécies de peixes perde textura após alguns dias de armazenamento sob refrigeração e estudos histológicos mostram que o rápido abrandamento da carne dos peixes é causado pela degradação das fibras delgadas de colágeno (HALLETT, BREMNER, 1988; ANDO et al, 1997; SUÁREZ et al, 2007).

SATO et al. (1991) demonstrou que no músculo de truta arco-íris a solubilidade do colágeno tipo V diminuiu durante a armazenagem em gelo, no entanto o tipo I permanecia sem mudanças, motivo pelo qual pode-se sugerir que o tipo V está envolto no rápido abrandamento da carne de peixe. As mudanças estruturais que mostram a perda de firmeza na carne de peixe têm sido relacionadas ao enfraquecimento do tecido conectivo pericelular, devido a fragmentação ou desordem arquitetônica das fibras de colágeno na rede estrutural, sem observar entretanto, mudanças estruturais no miocommata (ANDO, TOYOHARA, SACAGUCHI, 1992). A degradação post mortem do tecido conectivo pericelular também foi reportada por SUÁREZ et al. (2006) no matrinxã (*Brycon cephalus*) quando este foi submetido à super refrigeração durante 12

horas de armazenamento a -3°C , demonstrando através da microscopia eletrônica de transmissão que a perda de textura na carne do peixe foi um dos principais fatores de qualidade afetados pela refrigeração.

Sobre a base destes resultados, é aceito que as mudanças nos tipos específicos de colágeno têm um significativo rol no enfraquecimento pericelular do tecido conectivo, resultando no abrandamento da carne de peixe durante o armazenamento (SATO et al, 1991, 1994; ANDO, TOYOHARA, SAKAGUCHI, 1992, 1993; ANDO et al, 1995). ANDO et al, 1991; ANDO, TOYOHARA, SAKAGUCHI, 1993 y SATO et al. (1997) têm demonstrado através da microscopia de luz e técnicas de simulação de compressão que, a perda da textura da carne de peixe é causada pelo enfraquecimento do tecido conectivo pericelular. As alterações intramusculares nas espécies nativas ainda não foram estudadas. Sendo assim, o propósito deste trabalho é avaliar as mudanças estruturais e sensoriais de filetes de híbrido de *Piaractus braquypomus x Colossoma macropomum* talhados, embalados a vácuo e mantidos a 3°C ao longo do período de armazenamento.

2 Material e métodos

2.1 Amostras e tratamentos

Os peixes híbridos de pirapitinaga x tambaqui *Piaractus brachypomus x Colossoma macropomum* foram obtidos no Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba - CINPIC, Montería (Colômbia), em setembro de 2006. Os peixes capturados do viveiro foram imediatamente abatidos por meio de punção no cérebro e transportados ao laboratório. O peso e comprimento médio dos peixes foi $590\pm 87\text{g}$ e $32\pm 1.7\text{cm}$ respectivamente. Os filetes com pele foram obtidos manualmente usando faca asséptica. O peso médio dos filetes foi 32.4% do peso inicial dos peixes. Em cada filete, em

posição lateral interna, foram realizados cortes profundos paralelos e perpendiculares a espinha dorsal (talhado), a uma distancia de 3mm entre cada corte, em sentido antero-caudal. A pele foi conservada intacta a fim de proporcionar estabilidade ao filete (Figura 1).

O extrato concentrado de bacteriocinas produzida por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 foi subministrado pelo laboratório de Microbiologia Industrial do grupo de pesquisa em Biotecnologia Microbiana da Universidad Nacional de Colômbia, sede Medellín. Este extrato, contendo 40mg de proteína bacteriocinas, foi adicionado a superfície de cada filete em quantidade de 1ml utilizando-se uma micropipeta.

Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

T1: Extrato concentrado de bacteriocina: 1ml contendo 40mg de extrato concentrado de bacteriocina produzidas por *L. plantarum* LPBM10.

T2: Ácido láctico: 1ml de ácido láctico ajustado a pH 6.32, estimado previamente durante a armazenagem a vácuo do filete.

T3: Controle: 1ml água destilada

Cada filete talhado foi empacotado a vácuo em sacolas de polietileno de baixa densidade marca CRYOVAC com barreira de transmissão de oxigênio de 29-45ml/O₂/m²/24h/atm medido a 23°C e barreira de permeabilidade a gases de 10-15g/m²/24h medido a 38°C, utilizando uma empacotadora de vácuo WEBOMATIC 82246 (West Germany), sendo então armazenado sob refrigeração (3 ± 0.5°C) por um período de 30 dias. As análises foram realizadas aos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias da armazenagem. Os filetes, em triplicata foram submetidos à análise com microscópio de luz, instrumental e sensorial por um grupo de julgadores treinados.

2.2 Observações histológicas

As observações histológicas foram realizadas com microscópio de luz. As amostras foram fixadas em solução de Bouin e embebidas em parafina. Foram realizados cortes de 5µm (Micrótomo PR-50, Yamato Kohki, Urawa, Japan) nos cortes de músculo embebidos em blocos de parafina. Os cortes foram montados em placas de vidro e tingidos por 5 min com laranja G (0.5 g de laranja G, 1ml ácido acético dissolvido em 99ml de água destilada e filtrada). Após, os cortes foram lavados com água destilada e tingidos durante 5 min com azul de metileno (0.07g de azul de metileno, 1ml ácido acético dissolvido em 99ml de água destilada e filtrada). As amostras tingidas foram lavadas durante 5 min com água tamponada destilada (SIGURGISLADOTTIR et al, 2000).

Fotografias das fibras musculares foram tomadas utilizando-se microscópio (Carl Zeiss, Axioestar, Germany) com câmara fotográfica digital incorporada (Canon Power Shot G5, Japan). Também foram realizadas medições com ajuda de um analisador de imagens (Carl Zeiss AxioVisión 4, Germany) caracterizando-se a área entre as fibras musculares. As observações foram feitas com aumento de 40 vezes.

2.3 Análise instrumental

A textura da carne foi determinada no músculo dorsal, seguindo trabalho realizado por ANDO, TOYOHARA, SAKAGUCHI (1992), em uma amostra de 10mm de espessura. Através do uso do analisador de textura TAXT2, (Stable Micro Systems, Haslemere, Surrey, UK), a força máxima de penetração foi registrada utilizando-se êmbolo cilíndrico de 3mm de diâmetro forçado a entrar na fatia de músculo, paralelo à orientação de suas fibras, à velocidade de 60mm/min. Os resultados foram expressos

como força à ruptura, a partir de uma média de dez a quinze medições. As medições foram feitas a o longo do período de armazenamento.

2.4 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por cinco julgadores treinados, pelo método tradicional de julgamento da qualidade de filetes de peixe em amostras de 90g. Em filetes frescos foram avaliados os atributos sensoriais: aparência, cor e aroma. Em filetes cozidos foi avaliado o atributo sabor, onde a mostra foi cozida individualmente em um microondas na potência máxima durante 3 minutos. A pontuação foi baseada em uma escala hedônica de nove pontos classificados da seguinte forma: Gostei extremadamente (9), Gostei muito (8), Gostei moderadamente (7), Gostei ligeiramente (6), Me é indiferente (não gostei, não desgostei) (5), Desgostei ligeiramente (4), Desgostei moderadamente (3), Desgostei muito (2), Desgostei extremadamente (1); descrita por AMERINE, PONGBORN, ROESCLER (1965). O valor sensorial 4 foi tomado como a faixa mínima de aceitabilidade.

2.5 Desenho experimental e análise de dados

Para o estudo do efeito de três tratamentos de conservação: ácido láctico, bacteriocinas, controle e tempo de armazenamento sobre os atributos de qualidade dos filetes do híbrido de pirapitinga x tambaqui, foi realizado um desenho fatorial com dois fatores (tempo e conservação). Foram empregados três níveis de conservação e sete níveis de tempo de armazenamento (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias). De um total de 63 amostras, foram utilizadas três réplicas para cada experimento. Sobre os resultados foi utilizada ANOVA para avaliar os efeitos de conservação (A), tempo (B) e a interação entre efeito (A x B) sobre os atributos de qualidade usando o software Statgraphics (Statistical Graphics Corp. Rockville, MD, USA). A diferença entre a média dos valores dos

diferentes tratamentos e o período de armazenamento foi determinada pelo teste de mínima diferença significativa (LSD), e a significância estatística foi definida como $P \leq 0.05$.

3. Resultados e discussão

3.1 Mudanças estruturais e na textura

O efeito dos tratamentos de conservação (ácido láctico, bacteriocinas e controle) durante o período de armazenamento a 3°C sobre a microestrutura de filetes talhados de *Piaractus braquyponus x Colossoma macropomum* é mostrado nos cortes transversais das fibras musculares na Figura 2.

Os filetes submetidos aos três tratamentos durante o período de armazenagem mostram um maior espaçamento entre as fibras e seu tecido aparece fracionado com perda do arranjo arquitetônico inicial, quando comparados a filetes frescos.

Ao longo do período de armazenamento foi observado um maior efeito sobre o tratamento controle, seguido do tratamento com ácido láctico, onde as áreas entre fibras apresentam um maior distanciamento com perda do tecido conectivo. O tratamento com bacteriocinas mostra menor perda arquitetônica e a área de separação apresenta diferença estatística significativa quando comparada com os outros tratamentos $P < 0,05$ (Figura 3). A relação da área entre as fibras e a fibra muscular aumentou nos três tratamentos na medida em que o período de armazenamento avançou. Entretanto, a área entre as fibras musculares dos filetes tratados com o extrato cru de bacteriocinas apresentou menor aumento em consequência da menor degradação do tecido conectivo (Figura 2).

Em geral, diversas pesquisas relatam que a carne de peixes de viveiro tende a ser mole e a apresentar maior perda de textura em comparação com peixes de ambiente natural

(HAARD, 1992). Este efeito demonstrado em estudos realizados com salmão do atlântico (LOVE, 1988) e salmão do pacífico (CEPEDA et al, 1990). Os filetes talhados de híbrido de *Piaractus braquyponus x Colossoma macropomum* utilizados neste estudo mostram uma significativa perda de textura ao longo do período de armazenamento, quando foram submetidos ao teste instrumental de força de ruptura, embora não tenham apresentado diferenças estatísticas entre os tratamentos (dados no mostrados) Tabela 1.

A distribuição da fibra muscular tem sido relacionada por vários autores como um fator que afeta a textura da carne no peixe. A comparação entre os cortes histológicos ao longo do período de armazenamento demonstra que o incremento da área entre as fibras musculares é tal que diminui a firmeza no teste instrumental. Similares resultados também foram reportados para carne cozida de peixe por HATAE, YOSHIMATSU, MATSUMOTO (1990) e HURLING, RODELL, HUNT (1996). Na carne de salmão do atlântico fresco e defumado e na truta, diversos estudos mostram uma diminuição na firmeza da carne ao incrementar o tamanho aparente das fibras ou a diminuição óptica da fibra (JOHNSTON et al, 2000, 2004; BUGEON, LEFEVRE, FAUCONNEAU, 2003). Por outro lado, alguns estudos realizados em salmão do atlântico e bacalhau não concordam com essas observações, possivelmente esta discrepância está relacionada ao fato que a textura varia como um fator sobre a localização rostro-caudal do filete (SIGURGISLADOTTIR, 2001; BJØRNEVIK et al, 2003).

A fibra muscular só poderia explicar parcialmente a variação da resistência mecânica na carne de peixe (BUGEON, LEFEVRE, FAUCONNEAU, 2003). A estrutura muscular é mais complexa que uma estrutura física baseada sobre a fibra muscular, de forma que outros fatores poderiam explicar as características da textura da carne. Um incremento

no colágeno solúvel com aumento na firmeza da textura poderia estar indicando que o tecido conectivo também contribui na firmeza da carne de peixe (ESPE et al, 2004).

MASNIYOM, BENJAKUL, VISESSANGUAN (2005), estudando as mudanças do colágeno no músculo refrigerado de “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) tratado com pirofosfato e armazenado em embalagem de atmosferas modificadas, relataram que o CO₂ a uma concentração de 80%, em combinação com o tratamento de pirofosfato, inibiu a degradação do colágeno causado por enzimas endógenas assim como a de outros microorganismos. A condição da embalagem tende a manter a firmeza do colágeno com menor separação do músculo do “sea bass” durante o período de armazenamento. A embalagem a vácuo utilizada no presente trabalho representaria uma atmosfera de 20-30% de CO₂, no volume final da embalagem, a qual, segundo STILES, HASTINGS (1991), corresponderia ao CO₂ gerado por efeito da respiração metabólica do músculo de filete de pirapitinga x tambaqui; produto da respiração anaeróbica pelo consumo do oxigênio residual inicial da embalagem a vácuo. Nestas circunstâncias não seria suficiente para diminuir a degradação do tecido conectivo no presente trabalho.

Nossos resultados concordam com o postulado de SATO et al. (1997), no qual sugere que as fibras de colágeno do tecido conectivo pericelular contém uma maior porção de colágeno tipo V que as fibras do miocommata. Além disso, a solubilização do colágeno V durante o período de armazenamento refrigerado pode ser devido à degradação das fibras delgadas do colágeno, enfraquecendo o tecido conectivo pericelular e resultando no abrandamento do músculo.

3.2 Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial de filetes talhados de híbrido de *Piaractus braquypomus* x *Colossoma macropomum* embalados a vácuo durante 30 dias de armazenamento a 3°C são mostrados na Tabela 2. Com o incremento do período de

armazenamento, a vida útil dos filetes de *Piaractus braquypomus* x *Colossoma macropomum* diminuiu. Os atributos sensoriais avaliados pelos julgadores durante o período analisado para os filetes frescos foram: aparência, cor e aroma e para os filetes cozidos foi o sabor. As melhores pontuações foram obtidas para os atributos de aparência e cor no final do período de armazenamento, sendo superiores ao limite de aceitabilidade estimado em 4. Não obstante, o tratamento com extrato cru de bacteriocinas obteve a melhor pontuação no final do período de armazenamento ($P < 0.05$). Para o atributo aroma, os tratamentos com ácido láctico e controle estiveram fora da faixa de aceitabilidade, embora o tratamento com extrato cru de bacteriocinas tenha registrado um alto grau de aceitabilidade por parte dos julgadores ($P < 0.05$) no final do período de armazenamento. Para os atributos aparência e cor, a pontuação obtida foi superior ao limite estabelecido para o final do período, sendo superior o tratamento com extrato cru de bacteriocinas ($P < 0.05$). A aparência visual da cor da carne do peixe é uma propriedade muito importante na indústria de alimentos. Nos salmonados a cor vermelha da carne é de particular importância, e para peixes de carne branca esta cor deve estar suavemente manifesta. É sabido que, mudanças na cor da carne podem ser causadas por uma reflexão alterada devido às mudanças nas propriedades da superfície por alteração das fibras. Resultados de diferentes estudos diferem e não é possível verificar esta hipótese. JOHNSTON et al. (2000) reportam uma possível relação entre a pontuação da cor e a densidade da fibra muscular em salmão do atlântico, entretanto nenhuma relação foi encontrada para outros peixes (BJØRNEVIK et al, 2004; ESPE et al, 2004). Nossos resultados mostram que para este atributo, as pontuações foram aceitáveis para os tratamentos controle e ácido láctico, ressaltando-se que para bacteriocinas a qualificação foi superior para o final do período de armazenamento ($P < 0,05$).

Nos filetes cozidos, o atributo sabor foi rejeitado pelos julgadores no final do período de armazenamento para os tratamentos ácido láctico e controle. Os julgadores não encontraram presença de espinhas intramusculares durante a valoração. Os cortes paralelos ao longo do filete permitem cortar a espinha intramuscular em varias seções e facilitar a degradação do colágeno, constituinte da espinha intramuscular por ação da temperatura. Os resultados da presente pesquisa podem ser uma alternativa tecnológica a problemática das espinhas intramusculares em espécies nativas, onde segundo ESPEJO (1984); MESA, BOTERO (2007), relatam que embora a pirapitinga tenha demonstrado o seu potencial produtivo, ela possui alto número de espinhas intramusculares (EIMT), que se distribuem como uma malha na sua musculatura, o que dificulta a obtenção do filete da carcaça em pesos baixos (300 – 500g). Estes autores expõe como solução fazer colheita com pesos acima de 1000g ou mais, mas esta condição em alguns casos apresenta sabor a óleo de bacalhau pela proporção de gordura, fato que limita seu mercado. Além disso, produção neste peso representa maior custo e perda na eficiência alimentícia.

De outra parte, AYALA et al. (2005) relata que em “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*), o cozido da carne descongelada causou massiva coagulação da proteína e desintegração das miofibrilas, quando esta foi observada em microscopia eletrônica de transmissão. O evento mais significativo foi a presença de cavidades (buracos) entre as fibras musculares, as quais foram ocupadas por líquido, material amorfo e agregado granular. Determina-se correlação entre as mudanças estruturais, textura e características organolépticas, onde a perda de textura foi determinada e relacionada à degradação do colágeno.

O colágeno tem um grupo de moléculas semelhantes, embora seus componentes ainda não tenham sido completamente identificados (ANDO et al. 1999; SATO et al. 1997).

Em alguns casos, as cadeias de peptídeos que constituem o colágeno estão unidas mediante ligações covalentes cruzadas. Nos mamíferos, com o passar dos anos, as ligações cruzadas de colágeno mudaram de uma forma reduzível a outra não reduzível, mais estável. A natureza desta ligação cruzada não reduzível é desconhecida, ainda que existam diversas hipóteses. Esse aumento de ligações cruzadas de colágeno que aumentam com a idade, pode explicar parcialmente por que a carne de animais velhos (mamíferos) é mais dura que a carne de animais jovens, ainda que os músculos dos animais jovens geralmente contenham mais colágeno. Em peixes esta situação é muito diferente. O colágeno dos miocomata dos peixes mais velhos é mais fraco e contém menos ligações cruzadas que em peixes jovens. Por outro lado, alguns peixes mais velhos contém mais colágeno (presença de miocomata mais espesso) que peixes mais jovens (LOVE, HAQ, SMITH, 1972; LOVE, 1992). Na medida em que as ligações cruzadas de colágeno vão se formando, a solubilidade em diversos solventes como soluções salinas e ácidas, vai diminuindo, a tal ponto que a quantidade de colágeno insolúvel aumenta nos mamíferos, com o passar da idade. Nos peixes, como por exemplo o bacalhau, a qualidade de colágeno permanece quase inalterada. Embora o colágeno solúvel aumente claramente nos peixes (FENEMA, 1993). A solubilidade do colágeno diminui na medida em que aumentam as ligações cruzadas intramusculares. Segundo ANDO et al. (1999), o colágeno presente no músculo dos peixes está formado pelos tipos I e V e contém fibras heterotípicas. MIZUTA et al. (2005) pesquisando sobre as frações do colágeno cru e preparado por extração alcalina de várias partes do corpo: músculo, fígado, pele, espinhas, brânquias e trato digestório em “tiger puffer” (*Takifugu rubripes*), encontrou através da determinação bioquímica e imunoquímica, colágeno tipo I e V mostrando padrões muito similares. Os resultados sugerem que estes dois tipos de colágeno estão distribuídos principalmente nos diferentes tecidos analisados.

De outra parte, a cor opaca, a opacidade, descoloração da pele e a presença de “off odour” foram as principais causas atribuídas as pontuações obtidas nos tratamentos, no final do período de armazenamento. Tendo em conta os resultados do teste sensorial, poderia considerar-se as enzimas proteolíticas como responsáveis por ter um impacto sobre a perda da qualidade dos filetes de peixe, mas não sempre responsáveis pelas características de “off flavor” e “off odour” que são típicas da atividade microbiana (TRUELSTRUP et al, 1996). Entretanto, nossos resultados não concordem com os reportados por BRILLET et al. (2005), quando utilizaram extrato cru de bacteriocinas produzidas por *C. divergens* V41 em salmão defumado, mantido sob refrigeração, onde fortes “off flavor” e “off odour” foram detectados pelo painel sensorial. Nos filetes frescos utilizados no presente trabalho, rejeição sensorial foi apresentada somente para o atributo aroma no tratamento com ácido láctico, a partir do dia 25 de armazenamento. É importante observar que os efeitos preservativos não influíram negativamente sobre as características sensoriais.

4. Conclusões

A microestrutura dos filetes de híbrido de *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* foi alterada durante o armazenamento sob refrigeração. Dos tratamentos utilizados como método de preservação juntamente com a embalagem a vácuo, as bacteriocinas mostram as melhores pontuações no teste sensorial e, nas observações feitas com microscópio de luz, a estrutura foi menos afetada e apresentou menor degradação do tecido conectivo. Considera-se que o talhado nos filetes seja uma opção tecnológica na mitigação do efeito negativo das espinhas intramusculares.

5 Referências bibliográficas

1. AMERINE, M. A; PONGBORN, R. H.; ROESCLER, E. B. **Principles of sensory evaluation of food**. New York: Academic Press; 1965.
2. ANDO, M.; NISHIYABU, A.; TSUKAMASA, Y.; MAKINODAN, Y. Postmortem softening of fish muscle during chilled storage as affected by bleeding. **Journal of Food Science**. v. 64, n.3, p. 423-428, 1999.
3. ANDO, M. Softening Mechanism of Fish Meat. **Suisangaku Series. Kouseisha Kouseikaku**. Tokyo. Japan. v.114, p. 73-82, 1997.
4. ANDO, M.; TOYOHARA, H.; SAKAGUCHI, M. Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by the disintegration of collagen fibres in the pericellular connective tissue. **Nippon Suisan Gakkaishi**. v. 58, n. 3, p. 567–570, 1992.
5. ANDO, M.; TOYOHARA, H.; SAKAGUCHI, M. Post-mortem tenderization of fish muscle due to weakening of pericellular connective tissue. **Nippon Suisan Gakkaishi**. v. 59, p. 1073-1076, 1993.
6. ANDO, M.; TOYOHARA, H.; SHIMIZU, Y.; SAKAGUCHI, M. Post mortem tenderization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle caused by gradual disintegration of the extracellular matrix structure. **Journal of Science Food and Agriculture**. v. 55, p. 589-597, 1991.
7. ANDO, M.; YOSHIMOTO, Y.; INABU, K.; NAKAGAWA, T.; MAKINODAN, Y. Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissue corresponding to post-mortem tenderization. **Fisheries Science**. v. 61, p. 327-330, 1995.

8. ASHIE, I. N.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K. Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shell fish. **Critical Review of Food Science and Technology**. v. 36, p. 87–121. 1996.
9. AYALA, M. D.; LÓPEZ, A. O.; BLANCO, A.; GARCÍA, A.; ABELLÁN, E.; RAMÍREZ, Z. G.; GIL, F. Structural and Ultrastructural Changes on Muscle Tissue of Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L., After Cooking and Freezing. **Aquaculture**. v.250, n.1-2. p. 215-231, 2005
10. BJØRNEVIK, M.; ESPE, M.; BEATTIE, C.; NORTVEDT, R.; KIESSLING, A. Temporal variation in muscle fibre area, gaping, texture, colour and collagen in triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 84, p. 530-540, 2004.
11. BJØRNEVIK, M.; KARLSEN, Ø.; JOHNSTON, I. A.; KIESSLING, A. Effect of sustained exercise on white muscle structure and flesh quality in farmed cod. **Aquaculture Research**. v. 34, p. 55-64, 2003.
12. BREMNER, H. A. Gaping in fish flesh. In SATO, K.; SAKAGUCHI, M.; BREMNER, H. A. (Eds.), **Extracellular matrix of fish and shellfish**. Trivandrum, India: Research Signpost. p. 81–94, 1999.
13. BRILLET, A.; PILET, M.; 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 Food Microbiology**. v. 104, p. 309– 324, 2005.
14. BUGEON, J.; LEFEVRE, F.; FAUCONNEAU, B. Fillet texture and muscle structure in brown trout (*Salmo trutta*) subjected to long-term exercise. **Aquaculture Research**. v. 34, p. 1287-1295, 2003.

15. CEPEDA, R.; CHOU, E.; BRACHO, G.; HAARD, N. F. An immunological method for measuring collagen degradation in the muscle of fish. In M. Voigt, & R. Bottas, **Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. p. 487-506, 1990.
16. ESPE, M.; RUOHONEN, K.; BJØRNEVIK, M.; FRØYLAND, L.; NORTVEDT, R.; KIESSLING, A. Interactions between ice storage time, collagen composition, gaping and textural properties in farmed salmon muscle harvested at different times of the year. **Aquaculture**. v. 204, p. 489-504, 2004.
17. ESPEJO, C. Biología de la cachama. **Revista de Veterinaria y Zootecnia Caldas.**; v. 3, p. 14–16, 1984.
18. FENEMA, R. **Química de los alimentos**. Zaragoza, España: Ed. Acribia S.A.1993.
19. HAARD, N. F. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. **Food Research International**. v. 25, p.1-19, 1992.
20. HALLET, I. C.; BREMNER, A. H. Fine structure of the myocommata–muscle fibre junction in hoki (*Macruronus novaezelandiae*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 44, p. 245–261, 1988.
21. HATAE, K.; LEE, K. H; TSUCHIYA, T.; SHIMADA, A. Textural properties of cultured and wild fish meat. **Bulletin Japan Society Science of Fisheries**. v. 55, p. 363-368. 1989.
22. HATAE, K.; YOSHIMATSU, F.; MATSUMOTO, J. J. Role of muscle fibers in contributing firmness of cooked fish. **Journal of food science**. v. 55, p. 693-696, 1990.
23. HERNÁNDEZ A. Estado actual del cultivo de *Colossoma e Piaractus* en Brasil, Colombia, Panamá, Perú y Venezuela. **Memorias del VIII congreso**

- Latinoamericano de Acuicultura y V Seminario Nacional de Acuicultura, Acuicultura y Desarrollo Sostenible.** Santafé de Bogotá, p. 9–23. 1994.
24. HURLING, R.; RODELL, J. B.; HUNT, H. D. Fiber diameter and fish texture. **Journal of Texture Studies.** v. 27, p. 679-685, 1996.
25. JEGU, M. Subfamily serrasalminae in: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Ed.). **Checklist of the freshwater fishes of south and central america.** Porto Alegre (Bra): Edipucrs; 2003. p106-169
26. JOHNSTON, I. A.; ALDERSON, R.; SANDHAM, C.; DINGWALL, A.; MITCHELL, D.; SELKIRK, C.; NICKELL, D.; BAKER, R.; ROBERTSON, B.; WHYTE, D.; SPRINGATE, J. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture.** v. 189, p. 335-349. 2000
27. JOHNSTON, I.; MANTHRI, S.; BICKERDIKE, R.; DINGWALL, A. R. L.; CAMPBELL, P.; NICKELL, D.; ALDERSON, R. Growth performance, muscle structure and flesh quality in out-of-season Atlantic (*salmo salar*) smolt reared under two different photoperiod regimes. **Aquaculture.** v. 237, p. 281-300. 2004.
28. KIESSLING, A.; RUOHONEN, K.; BJØRNEVIK, M. Muscle fibre growth and quality in fish Arch. **Tierz. Dummerstorf.** v. 49 Special Issue, p. 137-146, 2006.
29. LOVE, R. M.; HAQ, M.; SMITH, G. L. The connective tissues of fish V. Gaping in cod of different sizes as influenced by a seasonal variation in the ultimate pH. **Journal of Food Technology.** v. 7, p. 281-290, 1972.
30. LOVE, R. M. Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish, In: **Fish Processing Technology,** G. M. HALL. (Eds) Blache Academic G. Prossional. Glasgow (UK). p. 1-27. 1992.

31. LOVE, R. M. **The food fishes: their intrinsic variation and practical implications**. London: Farrand Press/New York: Van Nostrand Reinhold. 1988.
32. MASNIYOM, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Collagen changes in refrigerated sea bass muscle treated with pyrophosphate and stored in modified atmosphere packaging. **European Food Research Technology**. v. 220, p. 322–325, 2005.
33. MESA, G, M.; BOTERO, A, Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. v. 20, n. 1, p. 79-86, 2007.
34. MIZUTA, S.; FUJISAWA, S.; NISHIMOTO, M.; YOSHINAKA, R. Biochemical and immunochemical detection of types I and V collagens in *tiger puffer* Takifugu rubripes. **Food Chemistry**. v 89, n. 1, p. 373-377, 2005.
35. SATO, K.; ANDO, M.; KUBOTA, S.; ORIGASA, K.; KAWASE, H.; TOYOHARA, H.; SAKAGUCHI, M.; NAKAGAWA, T.; MAKINODAN, Y.; OHTSUKI, K.; KAWABATA, M. Involvement of Type V Collagen in Softening of Fish Muscle during Short-Term Chilled Storage. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. v. 45, p. 343-348, 1997.
36. SATO, K.; OHASHI, C.; OHTSUKI, K.; KAWABATA, M. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. **Journal of Agriculture and Food chemistry**, v. 39, p. 1221–1225. 1991.
37. SATO, K.; YOSHINAKA, R.; ITOH, Y.; SATO, M. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: **Biochemistry and Molecular Biology**. v. 92, p. 87–91. 1989.

38. SATO, K.; KOIKE, A.; YOSHINAKA, R.; SATO, M.; SHIMIZU, Y. Postmortem changes in type I and V collagens in myocommatal and endomysial fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. **Journal Aquatic Food Production Technology**. v. 3, p. 5-11, 1994.
39. SIGURGISLADOTTIR, S. Textural and structural properties of fresh and smoked salmon (*Salmo salar*). **Dissertation for the degree of Doctor philosophise**. University of Bergen, Norway. 2001.
40. SIGURGISLADOTTIR, S.; SIGURDARDOTTIR, M. S.; TORRISSEN, O.; VALLET, J. L.; HAFSTEINSSON, H. Effects of different salting and smoking processes on the microstructure, the texture and yield of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. **Food Research International**. v. 33, p. 847-855, 2000.
41. STILES, M. E.; HASTINGS, J. W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends in Food Science & Technology**. v.2, p. 247-251, 1991.
42. SUÁREZ, M. H.; de FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L. H.; PARDO, C. S.; CORTÉS, R. M. Pérdida de textura post mortem de la carne de pescado durante el almacenamiento en frío. **Acta Biológica Colombiana**. v. 12, n. 1, p. 3-8. 2007.
43. SUÁREZ, M. H.; PARDO, C. S.; BEIRÃO, L. H.; de FRANCISCO, A.; OKADA, N. L. Efecto de la súper refrigeración sobre la textura de la carne de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. v. 19, n. 2, 2006.
44. TRUELSTRUP, L.; GILL, T.; DREWES, S.; HUSS, H. Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. **Food Research International**. v, 29, n. 2, p. 181-188. 1996.

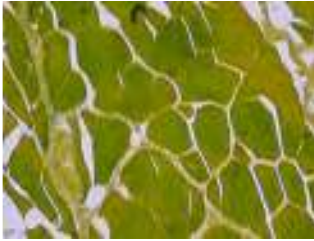
Agradecimientos

Os autores agradecem a professora Olga Inés Montoya, diretora do grupo de pesquisa em Biotecnologia Microbiana da Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, pelo aporte da cepa de *Lactobacillus plantarum* LPMB10 e ao professor Víctor Julio Atencio García, diretor do Centro de Investigación Piscícola da Universidad de Córdoba- CINPIC, pelo aporte dos peixes requeridos para o presente estudo.



Figura 1. Cortes paralelos e perpendiculares à espinha dorsal nos filetes de híbrido de *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* para o controle de espinhas intramusculares.

Dia 0

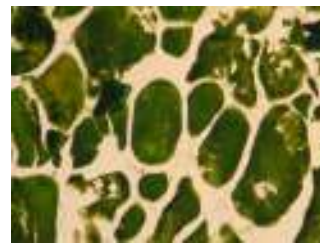


Dia 10

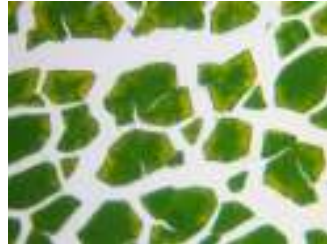
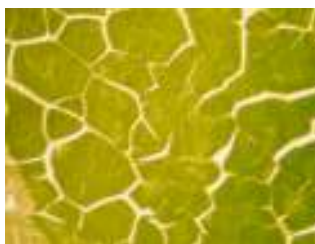
Dia 20

Dia 30

Tratamento controle



Tratamento Ácido láctico



Tratamento bacteriocinas



Figura 2. Microscopia óptica de cortes transversais de músculo de filetes de híbrido de *Piaractus brachyipomus* x *Colossoma macropomum* durante o armazenamento a 3^oC. Corado com Laranja G e Azul de metileno e aumento de 40x.

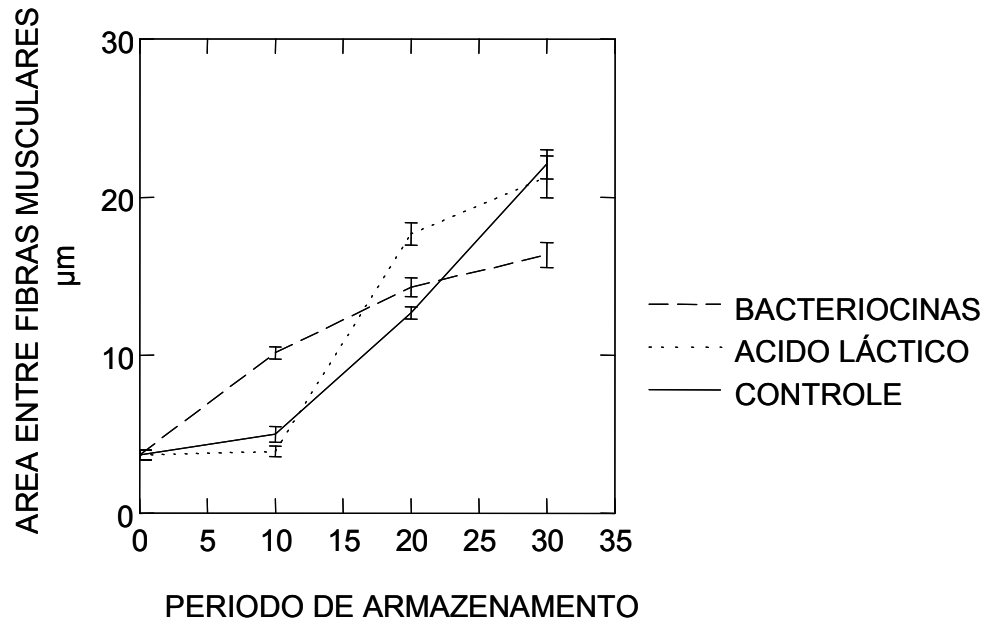


Figura 3. Alteração da área entre fibras musculares de filetes talhados de híbrido de *Piaractus brachyipomus* x *Colossoma macropomum* durante o armazenamento a 3^oC.

Tabela 1. Valores de textura medida como força a ruptura ($p < 0.0001$) para filetes talhados de híbrido de *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* durante o armazenamento a 3^oC.

Força de Ruptura (g)	Dia 0	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 25	Dia 30
Media ±	106.4	93.6	80.4	72.6	63.4	69.2	67.2
Desvia padrão	±16.5 ^a	±28.7 ^{ab}	±30.1 ^{ab}	±23.6 ^b	±20.4 ^b	±14.5 ^b	±15.6 ^b

Letras diferentes significam diferencia estatística entre colunas

Tabela 2. Atributos sensoriais para filetes talhados de híbrido de *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* embalados a vácuo e armazenados a $3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias.

ATRIBUTO	TRATAMENTO	TEMPO DE ARMAZENAMENTO (Dias)						
		0	5	10	15	20	25	30
Aparência	Controle	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	6.8±0.8 ^c	6.0±0.7 ^d	4.6±1.1 ^e	4.4±0.5 ^f
	Bacteriocina	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	8.6±0.5 ^a	7.8±0.4 ^b	7.4±0.5 ^b	7.2±0.8 ^b	5.2±0.8 ^c
	A. láctico	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	7.6±0.5 ^b	6.0±1 ^c	5.2±0.4 ^d	4.6±0.5 ^e
Cor	Controle	8.6±0.5 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	6.2±0.8 ^c	6.4±0.5 ^{cd}	4.4±0.5 ^e	4.6±0.5 ^e
	Bacteriocina	9.0±0.0 ^a	8.6±0.5 ^a	8.2±0.4 ^b	7.8±0.4 ^b	7.4±0.5 ^{bc}	7.2±0.4 ^c	5.8±0.4 ^d
	A. láctico	8.4±0.5 ^a	8.6±0.5 ^a	8±0.7 ^{ab}	7.2±0.8 ^b	6.2±0.8 ^c	5.6±0.5 ^d	4.4±0.5 ^d
Aroma	Controle	9.0±0.0 ^a	8.6±0.5 ^a	7.60.5 ^b	5±0.7 ^c	4.4±0.5 ^d	4.2±0.8 ^d	2.2±0.4 ^e
	Bacteriocina	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^b	7.6±0.5 ^b	5.4±0.5 ^c	6.6±0.5 ^d	5.2±0.4 ^c
	A. láctico	8.8±0.4 ^a	8.8±0.4 ^a	7.8±0.4 ^b	5.6±0.5 ^c	4.8±0.8 ^d	3.2±0.8 ^e	2.8±0.4 ^e
Sabor	Controle	8.8±0.4 ^a	8.6±0.5 ^a	7.4±0.5 ^b	6.2±0.4 ^c	5.2±0.8 ^d	4.6±0.5 ^e	2.6±1.1 ^f
	Bacteriocina	8.8±0.4 ^a	8.6±0.5 ^a	7.8±0.4 ^b	7.4±0.5 ^b	5.8±0.4 ^c	6.4±0.5 ^c	4.4±0.5 ^d
	A. láctico	8.8±0.4 ^a	8.4±0.5 ^a	7.4±0.5 ^c	6.2±0.4 ^d	5.4±0.5 ^e	4.2±0.4 ^f	3.2±0.8 ^f

a-f Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes tem diferença estatística ($P < 0.05$)

Considerações finais

O artigo Utilização de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 na vida útil de filetes do híbrido de pirapitinga *Piaractus brachypomus* x tambaqui *Colossoma macropomum* embalado a vácuo, foi aceito para publicação na revista Acta Biológica Colombiana. Os artigos Qualidade físico-química e atributos sensoriais de filetes talhados de híbrido de *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* embalado a vácuo sob refrigeração e Análise estrutural de filetes talhados de híbrido de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) x tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizando bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* embalado a vácuo, foram submetidos para publicação no Journal of Food Engineering e Ciência e Tecnologia de Alimentos, respectivamente.

Em trabalhos posteriores, recomenda-se avaliar a mistura de bacteriocinas e comprovar o possível efeito sinérgico desta associação. Também seria interessante utilizar filetes de espécies nativas que apresenta espinhas intramusculares e fornecer produtos diferenciados a partir destas espécies.

Referencias bibliográficas da Introdução geral

1. AHN, C e STILES, M. E. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 56. 2503-2510. 1990.
2. ANDERSSON, R. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. **International Journal Food Microbiology.** 3. 149-160. 1986.
3. ANDERSSON, R.; DAESCHEL M.A.; HASAN H.M. Antibacterial activity SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Biochimie.** 70. 381-390. 1988.
4. ANDO, M., NISHIYABU, A., TSUKAMASA, Y., MAKINODAN, Y. Post-mortem softening of fish muscle during chilled storage as affected by bleeding. **Journal of Food Science.** 64. 3. 423-428. 1999.
5. ANDO, M., YOSHIMOTO, Y., INABU, K., NAKAGAWA, T., AND MAKIMODAN, Y. Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization. **Fisheries Science.** 61. 327-330. 1995.
6. ANDO, M.; TOYOHARA, H.; SHIMIZU, Y.; SAKAGUCHI, M. Validity of a puncture test for evaluating the change in muscle firmness of fish during ice storage. **Nippon Suisan Gakkaishi.** No. 57. pp. 2341. 1991.
7. ASECIO, M.A.; ORDOÑEZ, J.A. E SANZ, B. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf-life of refrigerated pork packed in plastic bags. **Journal food Protection.** 51. 356-360. 1988.
8. BOKNAES, N.; JENSEN, K. N.; GULDAGER, H.S.; OESTERBERG, C.; NIELSEN, J.; DALGAARD, P. Thawed chilled Barents sea cod fillets in modified atmosphere packaging-application of multivariate data analysis to select key parameters in good manufacturing practice. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.** 35, 436-443. 2002.
9. BOKNAES, N; GULDAGER, H.S.; OSTERBERG, C.; NIELSEN, J. Production of high quality frozen cod (*Gadus morhua*) fillets and portions on a freezer trawler. **Journal of aquatic food product technology.** 10, 34-47. 2001.
10. BRODY, A. L. Envasado de Alimentos en Atmósferas Controladas, Modificadas y Vácio. Editora Acribia, S. A. Zaragoza [España]. 1996.
11. CHURCH. N. MAP fish and crustaceans – sensory enhancement. **Food science technology today,** 12, 73-83. 1998.
12. CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L.. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology.** 71. 1-20. 2001.
13. DAESCHEL, M.A.; MACKENNEY, M.C.; MACKDONALD, L.C. bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. **Food microbiology.** 7. 91-98. 1990.

14. DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as food preservative. **Food Technologic.** 44. 100-117. 1990.
15. DUFFES, F.; LEROI, F.; BOYAVAL, P.; DOUSSET, X. Inhibition of *listeria monocytogenes* by *Carnobacterium sp.* Strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. **International Journal of Food Microbiology.** 47. 33-42. 1999.
16. EUROPEAN UNION (EU) Commission Decision 98/711/EC of 12 November 1998 drawing up the list of third countries from which the import of fishery products is authorised for human consumption, L337, 58±60, 12 December. 1998.
17. FAO - Food and agriculture organization of the united nations. **Quality and quality changes in fresh fish.** Roma. 195p. 1995.
18. FAO, **Producción de acuicultura 1985-1992.** FAO, Roma, 213p. 1994.
19. FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura.** Roma. Italia; 2004.
20. FAO. Review of the state of world aquaculture. **FAO Fisheries Circular.** No 886, Rev.2. Rome, FAO. 95p. 2003.
21. FELTRIN, V.P. Produção de *L. plantarum* em meio de cultura a base de melaço de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado, Florianópolis-UFSC. 1997.
22. FERNANDEZ, C.F. e SHAHANI, K.M. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. **Journal Food Protection.** 53. 704-710. 1990.
23. FIORENTINI, A. M. Influência de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN na vida útil de carne bovina refrigerada. Dissertação de Mestrado, Florianópolis-UFSC. 1999.
24. FRICOURT, B.V.; BAREFOOT, S.F.; TESTIN, R.F.; HAYASAKA, S.S. Detection and activity of plantaricin F na antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated de processed channel catfish. **Journal of food protection.** Vol. 57. 698-702. 1994.
25. GARCIA, T.; MARTIN, R.; SANZ, B.; HERNANDEZ, P.E. Extension de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos.** 35 (1). 1-18. 1995.
26. GENIGEORGIS, C. Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. **International Journal of Food Microbiology.** 1. 237-251. 1985.
27. GENIGEORGIS, C. Y RIEMANN, C. Food processing and hygiene. In: Foodborne infections and intoxications. Edited by H. Riemann and F. Bryan. Academic Press. New York, 2nd edn., pp. 613-713. 1979.
28. GOEPFERT, J.M. Y KIM, H.V. Behavior of selected foodborne pathogens in raw ground beef. **J. Milk Food Technolo.** 38. 443-452. 1975.
29. GONZALEZ, S.N.; APELLA, M.C.; ROMERO, N.C.; NADER DE MACAS, M.E. e OLIVER, G.. Inhibition de enteropathogens by lactobacilli strains in fermented milk. **Journal Food Protection.** 56. 773-776. 1993.
30. GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.N.; SANZ, J.J.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M.L. Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh

- retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3°C. **International Journal of Food microbiology**. 76. 125-141. 2002.
31. HERNANDEZ, P.E.; RODRIGUEZ, J.M.; CINTAS, L.M.; MOREIRA, W.L. SOBRINO, O.J.; FERNANDEZ, M.F.; SANZ, B. Utilizacion de bacterias lacticas en el control de micorganismos patogenos de los alimentos. **Microbiologia SEM** 9. 37-34. 1993.
 32. HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; ALCESTE-OLIVIERO, C.; SANCHEZ, R.; JORY, D., VIDAL, L.; CONSTAIN-FRANCO, L. F. 2001. Aquaculture development trends in Latin America and the Caribbean. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery & J.R. Arthur, eds. Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. pp. 317-340. NACA, Bangkok and FAO, Rome.
 33. HIGAZI, A. A. R.; GANZ, T.; KARIKO, K.; CINES, D. B. Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. **Journal Biology Chemical**. 271. 17650-17655. 1996.
 34. HILMI, Ç. A.; YUSULF, G. H. Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. **Meat Science**. 55. 89-96. 2000.
 35. HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**. Vol. 49. Suppl. 1. 139-150. 1998.
 36. INPA. Boletín estadístico pesquero Colombiano. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. División de Sistemas y Estadística. Santafé de Bogotá. 103p. 1995.
 37. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOODS (ICMSF) Working Group on Risk Assessment Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products. **Journal of Food Protection**. 61(8), 1075-1086. 1998.
 38. IWAMOTO, M., H. YAMANAKA, S. WATABE AND K. HASHIMOTO Effect of storage temperature on *rigor mortis* and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. **Journal of Food Science**. 52, 6. 1987.
 39. JIMENEZ-DIAS, R; PIARD J.C.; RUIZ-BARBA, J.L. DESMAZEAUD, J.M. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. **FEMS Microbiology**. Review. 87-91. 1990.
 40. JOFFRAUD JJ, CARDINAL M, CORNET J, CHASLES JS, LÉON S, GIGOUT F, LEROI L. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. **Int J. Food Microbiol**. 112:51–61. 2006.
 41. KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochemistry**. 70. 337-349.1988.
 42. KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology** Review. 12. 39-86. 1993.
 43. KODAMA, R. Estudios on lactic acid bacteria. Part. II. Lactolin, a new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. **Journal Antibiotic**. 5. 72-74. 1952.

44. KUBOTA, S., SATA, K., OHSTUKI, K., KAWABATA, M. Degradation de α -connectin in raw fish muscle and softening evaluated by breaking strength occur independently during one chilled storage. **Fisheries Science**. 3. 600-602. 1996.
45. LAZDUNSKI, C.J. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. **Biochimistry**. 70. 1291-1296. 1988.
46. LEWUS, C. B.; SUN, S.; MONTVILLE, T. J. Production of na amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Appl. Enviromen. Microbiol.** 58. 143-149. 1992.
47. LEWUS, C.; MONTVILLE, T. Detection de bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. Vol. 13. No. 2. 145-150. 1991.
48. LEWUS, C.; MONTVILLE, T. Further characterization of bacteriocins plantaricin BN, bavaricin MN and pediocin A. **Food Biotechnology**. 6. (2). 154-174. 1992.
49. LISTON, J. Bacterial spoilage of seafood. In: H.H. Huss, M. Jacobsen and J. LISTON (eds.) *Quality Assurance in the Fish Industry*. Proceedings of an International Conference, Copenhagen, Denmark, August 1991. Elsevier, Amsterdam, 93-105. Liston, 1992.
50. LUCKE, F.K.; EARNSHAW, R.G. Starter cultures. In: RUSSEL, N.J.; GOULD, G.W., eds. Food Preservation. Blakie: Glasgow and Londdon. 215-234. 1994.
51. LYHS, U.; LAHTINEN, J.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; HYYTIA-TREES, E.; ELFING, K.; KORKEALA, H. Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged "gravad" rainbow trout store at 3 and 8°C. **international Journal of Food microbiology**. 70, 221-230. 2001.
52. MAGNUSSON, H.; TRAUSTADITTIR, K.; The microbial flora of vacuum-packaged smoke herring fillets. **Journal of Food Technology**. 17, 695-702. 1982.
53. MARUGG, J. D.; GONZALEZ, C. F.; KUNKA, B. S.; LEDEBOER, A. M.; PUCCI, M. J.; TOONEN, M. Y.; WALKER, S. A.; ZOETMULDER, P. A. Cloning, expression and nucleotide aequence of genes involved in production of Pediocin PA-1, a bacteriocin form *Pediococcus acidilactici* PAC 1,0. **Appl. Environ. Microbiol.** 58. 2360-2367. 1992.
54. MCKERCHER, P.D.; HESS, W.R. e HAMDY, F. residual viruses in pork products. **Appl. Enviroment Microbiology**. 35. 142-145. 1978.
55. MOCHIZUKI., S. AND SATO, A. Effects of various killing procedures on post-mortem changes in the muscle of hose mackerel. **Bulletin Japan Society Science of Fish**. 64. 276-279. 1996.
56. MONTERO, P. AND BORDERIAS, J. Effect of rigor mortis and ageing on collagen in trout (*Salmo irideus*) muscle. **Journal Science Food Agriculture**. 52. 141-146. 1990.

57. OKEREKE, A.; MONTVILLE, T.J. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v.54, n.5. 349-353. 1991.
58. PALUDAN-MULLER, C.; DALGAARD, P.; HUSS, H.H.; GRAM, L. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoke salmon at 5°C. **International Journal of Food microbiology**. 39, 155-166. 1998.
59. RANDELL, K.; HATTULA, T.; AHVENAINEN, R. Effect of packaging method on the quality of rainbow trout and baltic herring fillets. **Lebensm.-Wiss. U-Technol**. 30. 56-61. 1997.
60. REKHIF, N.; ATRIH, A.; LEFEBVRE, G. Characterization and partial purification of plantaricin LC74, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LC74. **Biotechnology Letters**. 16. 771-776. 1994.
61. REQUENA, T. e PELAEZ, C. Revision: Actividad antimicobiana de bacterias lacticas. Produccion de bacteriocinas. **Revista Española de Ciencia y tecnologia de Alimentos**. 35. (1). 19-44. 1995.
62. ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**. 79. 3-16. 2002.
63. SARKAR, P.K. BENERJEE, S. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. **Journal food science technology**. vol. 33 n. 3. 231-233. 1996.
64. SUÁREZ MAHECHA, H. PARDO CARRASCO, S. BEIRÃO, L.H. DE FRANCISCO, A. OKADA NAGAKY, L. Efecto de la súper refrigeración sobre la textura de la carne de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Rev Col Cienc Pec**. v. 19 n.2. 2006.
65. SUÁREZ, M.H.; DE FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L.H.; PARDO, C.S.; CORTÉS, R.M. Pérdida de textura post mortem de la carne de pescado durante el almacenamiento en frío. **Acta Biológica Colombiana**. v. 12 n. 1, p. 3-8. 2007.
66. VESCOVO M, SCOLARI G, ZACCONI C. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. **Food Microbiol**. V. 23 p. 689-693. 2006.
67. WAITES, W.M. Meat microbiology: a reassessment. Em: Lawrie, R. (ed). **Developments in meat Science-4**. London: Elsevier Applied Science, 317-333. 1988.