

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Rodrigo Cavalheiro Carli

**Biopreservação de filés resfriados de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-
nilo) com compostos antimicrobianos de bactérias ácido-láticas**

Passo Fundo

2021

Rodrigo Cavalheiro Carli
Médico Veterinário

**Biopreservação de filés resfriados de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-
nilo) com compostos antimicrobianos de bactérias ácido-láticas**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Christian Oliveira Reinehr
Linha de pesquisa: Desenvolvimento de produtos e processos para a indústria de alimentos.

Passo Fundo

2021

CIP – Catalogação na Publicação

C282b Carli, Rodrigo Cavalheiro
Biopreservação de filés resfriados de *Oreochromis niloticus* (tilápia-donilo) com compostos antimicrobianos de bactérias ácido-láticas / Rodrigo Cavalheiro Carli. – 2021.
75 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Christian Oliveira Reinehr.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. Pescados. 2. Bacteriocinas. 3. Alimentos - Conservação. I. Reinehr, Christian Oliveira, orientador.
II. Título.

CDU: 664

Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

“Biopreservação de filés resfriados de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nylo) com compostos antimicrobianos de bactérias ácido-láticas”

Elaborada por
Rodrigo Cavalheiro Carli

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora



**Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**



Luciane Maria Colla, Dra., UPF



Eunice Valduga, Dra., URI

**Passo Fundo, RS, Brasil
2021**

RESUMO

O filé de tilápia, pescado mais cultivado no mundo, devido à manipulação adicional, está sujeito a deteriorações enzimáticas e microbianas – principalmente por bactérias psicrotróficas – causando alterações organolépticas e diminuindo a aceitabilidade do produto pelos consumidores. A busca por métodos de conservação eficientes e que preservem o frescor se faz necessária para garantir o acesso da população a esse produto de alto valor nutricional. Porém, devido à mudança no perfil do consumidor moderno pela busca alimentos que não passem por processos agressivos de conservação – para não alterar as características do produto - que não contenham aditivos químicos e que se mantenham frescos pelo maior tempo possível, os métodos biológicos como a utilização de bacteriocinas obtidas de Bactérias Ácido-Láticas (BALs) surgem como uma opção. Portanto, propõe-se um método alternativo para a biopreservação de filés de tilápia-do-nilo resfriados através da utilização de bacteriocinas de BALs. A primeira etapa do trabalho consistiu na avaliação da vida de prateleira do filé e no isolamento dos microrganismos deteriorantes, na segunda etapa foi realizada a produção, semi purificação das bacteriocinas e a avaliação do efeito inibitório delas frente aos microrganismos psicrotróficos isolados da primeira etapa para selecionar os compostos mais efetivos. Na terceira etapa, foi realizada a aplicação das bacteriocinas diretamente no filé de tilápia para a avaliação do impacto na vida de prateleira. Os resultados demonstram que a vida de prateleira do filé resfriado a 4° C é de menos de dez dias, durante o isolamento e identificação bacteriana, além disso, a contaminação inicial demonstrou falhas durante o processo de despesca, abate ou filetagem. Todos os isolados apresentaram as mesmas características bioquímicas, indicando que são microrganismos do mesmo gênero (*Pseudomonas*). No teste de sensibilidade antimicrobiano o extrato bruto e o semi purificado do *Lactobacillus salivarius* apresentaram inibição frente à *Pseudomonas* spp.. O método de aspersão demonstrou maior eficácia na comparação com o método de imersão, levando à conclusão de que a aplicação por aspersão de bacteriocinas semipurificadas de *Lactobacillus salivarius* em filé de pescado fresco resulta no aumento da vida de prateleira desde alimento.

Palavras-chave: Pescado. Bacteriocinas. Biopreservação.

ABSTRACT

The tilapia fillet, the most cultivated fish in the world, due to additional handling, is subject to enzymatic and microbial deterioration - mainly by psychrotrophic bacteria - causing organoleptic changes and decreasing the acceptability of the product by consumers. The search for efficient conservation methods that preserve freshness is necessary to guarantee the population's access to this product of high nutritional value. However, due to the change in the profile of the modern consumer by the search for foods that do not undergo aggressive conservation processes - not to change the characteristics of the product - that do not contain chemical additives and that remain fresh for as long as possible, biological methods such as the use of bacteriocins used from Lactic Acid Bacteria (BALs) appears as an option. Therefore, an alternative method is proposed for the biopreservation of chilled Nile tilapia fillets through the use of BALs bacteriocins. The first stage of the work consisted of the evaluation of the shelf life of the fillet and the isolation of the deteriorating microorganisms, in the second stage the production, semi-purification of the bacteriocins and the evaluation of their inhibitory effect against the psychrotrophic microorganisms isolated from the first stage was performed to select the most effective compounds. In the third stage, bacteriocins were applied directly to the tilapia fillet to assess the impact on shelf life. The results demonstrate that the shelf life of the fillet cooled to 4 ° C is less than ten days, during isolation and bacterial identification, in addition, the initial contamination showed failures during the process of harvesting, slaughter or filleting. All isolates had the same biochemical characteristics, indicating that they are microorganisms of the same genus (*Pseudomonas*). In the antimicrobial sensitivity test, the crude and semi-purified extract of *Lactobacillus salivarius* showed inhibition compared to *Pseudomonas spp.* of *Lactobacillus salivarius* in fresh fish fillet results in increased shelf life from food.

Keywords: Fish. Bacteriocins. Biopreservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Exemplar de <i>O. niloticus</i> (tilápia-do-nilo) com sua coloração acinzentada característica, presença de espinhos na nadadeira dorsal (a), escamas cicloides (b) e espessura do pedúnculo caudal igual ao comprimento (c).....	15
Figura 2 Participação dos grupos de peixes na produção da aquicultura brasileira. Mostrando um decréscimo em relação a 2016 com 58,4% da produção sendo carregada pela criação de tilápia e 18,2% pela de tambaqui.	17
Figura 3 Estrutura química da nisina, a bacteriocina mais utilizada na indústria de alimentos.....	20
Figura 4 Fluxograma com as etapas a serem executadas em ordem cronológica	29
Fonte: elaborada pelo autor	29
Figura 5 Contagem de microrganismos psicrotróficos (LogUFC/g^{-1}) em amostras refrigeradas a 4° C.	39
Figura 6 Comportamento das Bases Voláteis Totais (mg/100g) em função do tempo	40
Figura 7 Bactérias observadas em microscópio com aumento de 100x, revelando a coloração negativa ao gram e a morfologia bacilar.....	41
Figura 8 - Teste de sensibilidade antimicrobiano frente às bactérias psicrotróficas isoladas do filé do pescado, detalhando a técnica de ágar difusão em poços contendo o extrato bruto da bacteriocina e evidenciando os halos de inibição em comparação com o controle ...	44
Figura 9 Gráfico de barras do comportamento das bases voláteis totais durante 12 dias de armazenamento	48
Figura 10 curva de crescimento do método de aspersão 0,4 ml (A) e do controle (B)	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 caracterização do soro de leite realizado pelo laticínio	36
Tabela 2 Planejamento experimental para o método de imersão, com um fator de estudo (tempo de imersão) variando em três níveis (tempo de imersão) e com um controle (sem aplicação).....	37
Tabela 3 Resultado da medição do diâmetro dos halos (cm) do teste de sensibilidade antimicrobiano realizado com oito extratos de bacteriocinas brutas, controle positivo e negativo, frente aos microrganismos isolados no dia 0 e no dia 14 a 4° C	43
Tabela 4 Atividade de água inicial do filé de pescado nos diferentes tempos de imersão e na amostra controle (sem imersão).....	46
Tabela 5 Resultados de contagem inicial, duração da fase lag, velocidade máxima de crescimento e contagem final obtidos através da plataforma Combase®	49
Tabela 6 Tempo necessário para os métodos de aplicação e o controle atingirem o limite estabelecido pela legislação	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Classificação proposta recentemente, em que bacteriocinas são classificadas, em cinco classes, com base em sua estrutura química e de massa.	22
Quadro 2 Mecanismos de ação de acordo com a bioquímica e a genética conforme classificação geral descrita por Klaenhammer (1993) e Drider et al. (2006).	23
Quadro 3 Relação das BALs a serem selecionadas e os locais de aquisição dos probióticos.	34
Quadro 4 Resultado dos testes bioquímicos das seis bactérias isoladas.	41
Quadro 5 Resultados da aferição do pH em todos os tratamentos e no grupo controle durante o período de 12 dias.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 TILÁPIA-DO-NILO	15
2.2 MICROBIOLOGIA E VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ DE PESCADO.....	17
2.2.1 RELAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DETERIORANTES COM A VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ DE PESCADO.....	18
2.3 BACTERIOCINAS.....	19
2.3.1 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS.....	20
2.3.2 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS.....	21
2.3.3 MECANISMOS DE AÇÃO.....	23
2.3.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS.....	23
2.4 UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS EM ALIMENTOS	24
2.4.1 LEGISLAÇÃO.....	26
2.4.2 LIMITADORES DE ATIVIDADE	26
3 BIOPRESERVAÇÃO DE FILÉS RESFRIADOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> (TILÁPIA-DO-NILO) COM BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS.....	28
3.1 INTRODUÇÃO.....	28
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.2.1 ETAPA I: AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DETERIORANTES.....	30
3.2.2 ACOMPANHAMENTO DA DETERIORAÇÃO DO PESCADO.....	30
3.2.3 RECVLTIVO E ISOLAMENTO DAS BACTERIAS PSICROTROFICAS	31
3.2.4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	31
3.2.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	31
3.2.5.1 <i>Análise da atividade de água</i>	32
3.2.5.2 <i>Análise do pH</i>	32
3.2.5.3 <i>Análise de Bases Voláteis Totais</i>	32
3.2.5.4 <i>Contagem de microrganismos psicrotróficos</i>	33
3.2.6 ETAPA II: PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE OS MICRORGANISMOS DETERIORANTES	33

3.2.6.1	REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS.....	33
3.2.6.2	PRODUÇÃO DAS BACTERIOCINAS.....	34
3.2.6.3	EXTRAÇÃO DO COMPOSTO.....	34
3.2.6.4	SEMI PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	34
3.2.6.5	TESTE DE AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	35
3.2.7	ETAPA III: APLICAÇÃO DA BACTERIOCINA NA MATRIZ CÁRNEA E AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA.....	35
3.2.7.1	AUMENTO DA ESCALA DE PRODUÇÃO EM SORO DE LEITE, EXTRAÇÃO, SEMIPURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO.....	36
3.2.7.2	APLICAÇÃO DA BACTERIOCINA NA MATRIZ CÁRNEA.....	37
3.2.7.3	TRATAMENTO DOS DADOS.....	38
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.3.1	ETAPA I: AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DETERIORANTES.....	38
3.3.1.1	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	40
3.3.2	ETAPA II: PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE OS MICRORGANISMOS DETERIORANTES.....	43
3.3.2.1	AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS.....	43
3.3.3	ETAPA III: APLICAÇÃO NA MATRIZ CÁRNEA E AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA.....	45
3.3.3.1	AUMENTO DA ESCALA DE PRODUÇÃO EM SORO DE LEITE, EXTRAÇÃO E SEMIPURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO.....	45
3.3.3.2	AVALIAÇÃO DO IMPACTO NA VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ....	46
3.3.3.2.1	Atividade de água.....	46
3.3.3.2.2	pH.....	47
3.3.3.2.3	Bases voláteis totais.....	47
3.3.3.2.4	Contagem microbiana.....	48
3.4	CONCLUSÃO.....	51
4	CONCLUSÃO.....	53
5	REFERÊNCIAS.....	54
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT.....	60
	ANEXO A – TESTES BIOQUÍMICOS.....	89

**ANEXO B – DETERMINAÇÃO DE BASES VOLÁTEIS TOTAIS EM
PESCADOS POR ACIDIMETRIA..... 94**

1 INTRODUÇÃO

O consumo de pescado é uma importante parte de uma dieta saudável, tendo em vista a qualidade de sua proteína; a presença de nutrientes essenciais e ácidos graxos ômega 3; e sua baixa quantidade de gordura se comparado com outras carnes (RHEA, 2009; PAL, 2010). Paralelo a isso, a produção mundial de pescado destinado ao consumo em 2016 foi de 170 milhões de toneladas, sendo 80 milhões de toneladas são oriundas da aquicultura, mostrando a importância econômica da atividade e a busca expressiva por este tipo de alimento (FAO, 2018).

Atualmente, o Brasil ocupa a 13^o posição no ranking mundial de maiores produtores de pescado (FAO, 2018) e isso se deve, principalmente, ao fato de que cerca de 60% do pescado brasileiro é proveniente da criação de tilápias (IBGE, 2018). Essa espécie, apesar de exótica, adaptou-se muito bem no Brasil e cresce rapidamente, possibilitando uma produção intensiva em tanques. Devido ao elevado progresso na produção de pescado cultivado (9,85%), em comparação com outras carnes e a agricultura, impulsionado principalmente pelo crescimento de 14,2% na produção de tilápia (KUBITZA, 2015),

Dentre os diversos produtos cárneos, o pescado é o mais vulnerável à deterioração microbiana e à oxidação lipídica, pela sua própria composição biológica (SOARES et al., 2012). Esta deterioração microbiana é resultante especialmente da ação de microrganismos psicrotróficos, tais como *Pseudomonas* (EMIKPE et al., 2011; MOHAN et al., 2010) *Shewanella* e *Flavobacterium spp.* (MOHAN et al., 2010).

Para conter a multiplicação microbiana e as reações enzimáticas, com o intuito de aumentar a vida de prateleira dos pescados, alguns métodos térmicos utilizados há séculos ainda são estudados, aprimorados e associados a novos métodos de conservação (SAMPELS, 2014). Uma das alternativas para conter essa deterioração é a adição de compostos químicos, porém, o perfil dos consumidores está se inclinando, cada vez mais, para a redução da utilização de conservantes químicos (WORAPRAYOTE et al., 2018).

Outra possibilidade é o congelamento, entretanto, durante o processo podem ser causadas micro lesões nas células teciduais, fazendo com que possam surgir mudanças indesejáveis no pescado durante o processo de descongelamento, como a grande produção de exsudato e mudanças de volume (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003), essas alterações muitas vezes desestimulam o consumo. Além disso, trata-se de um método com elevado custo, já que, na cadeia de produção alimentar, cerca de 50% da energia consumida

na planta advém da utilização de frio industrial, representando cerca de 15% a 17% do total de energia elétrica produzida no planeta (BARRIAS, 2015).

Portanto, devido às novas tendências adotadas pelos consumidores em relação ao consumo de alimentos seguros, saudáveis, frescos e que não contenham conservantes químicos, os aditivos naturais tornaram-se populares, entre eles as bacteriocinas surgiram como uma opção (MAHENDRA, 2016). Nesse sentido, na busca por microrganismos que possuam alta capacidade de produção de bacteriocinas, mas que, ao mesmo tempo, sejam “*Generally recognized as safe (GRAS)*”, as Bactérias Ácido-Láticas (BALs) surgem como protagonistas, devido a sua vasta utilização como probióticos e culturas starters (ANGIOLILLO et al. 2018).

Essas substâncias são classificadas como peptídeos bioativos, são produzidas nos ribossomos de alguns microorganismos e liberadas para o meio extracelular, onde, potencialmente, agem inibindo o crescimento ou matando microrganismos patogênicos e resistentes aos antimicrobianos convencionais (ZOU et al, 2018).

Sua produção em caldo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) envolve um alto custo, sendo necessário utilizar meios de cultura alternativos como, caldo de cana, bagaço de frutas, vinhaça, soro de leite, entre outros. O soro de leite, apesar de ser um subproduto, concentra grandes quantidades de lactose (fonte de alimento para microorganismos), proteínas solúveis, minerais e vitaminas, e por esse motivo, vem sendo estudado com um meio de cultura alternativo para a produção de compostos antimicrobianos de origem biológica (SABO et al., 2019).

Atualmente, poucas bacteriocinas são liberadas para a utilização em alimentos, nos EUA e Canadá, por exemplo, apenas as nisinas, produzidos por *Lactococcus lactis*, pediocinas, produzida por *Pediococcus acidilactici*, e Micocin®, uma combinação de três bacteriocinas (carnociclina A, carnobacteriocina BM1 e piscicolin 126) produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum* são utilizadas e entre essas, sendo que a nisina, aprovada pelo FDA, é comercializada em mais de 48 países (ZOU et al, 2018).

Logo, um dos desafios é encontrar microrganismos, principalmente BALs capazes de produzir compostos que inibam o crescimento de bactérias deteriorantes e aplicar estes compostos na matriz cárnea. Entretanto, há uma grande variedade dessas bactérias capazes de produzir diferentes tipos de bacteriocinas (GHANBARI et al., 2013; GÓMEZ-SALA et al, 2015), possibilitando estudos mais específicos sobre sua utilização na matriz cárnea como agente de biopreservação.

O objetivo geral desta pesquisa foi o desenvolvimento de um método alternativo para a biopreservação de filés de tilápia-do-nilo frescos resfriados com a utilização de bacteriocinas produzidas por BALs em meio de cultura de baixo custo, tendo como objetivos específicos: A avaliação da evolução da deterioração do filé refrigerado e a realização do isolamento e identificação das bactérias psicrotróficas do filé de tilápia; a seleção das bactérias produtoras de bacteriocinas com atividade antimicrobiana frente a bactérias psicrotróficas; e o aumento da escala de produção das bacteriocinas em soro de leite, a aplicação da substância semi purificada na matriz cárnea do pescado e avaliação da diminuição ou não do desenvolvimento de bactérias deteriorantes, e se o efeito influenciou ou não no aumento da vida de prateleira do pescado.

A pesquisa faz parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos da Universidade de Passo Fundo – PPGCTA/UPF, e está enquadrada na linha de pesquisa 1 - Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes, e projeto de pesquisa 2 - Desenvolvimento de produtos e processos para a indústria de alimentos, pois o foco foi a aplicação e a melhoria de um processo existente, qual seja: o de preservação dos pescados resfriados.

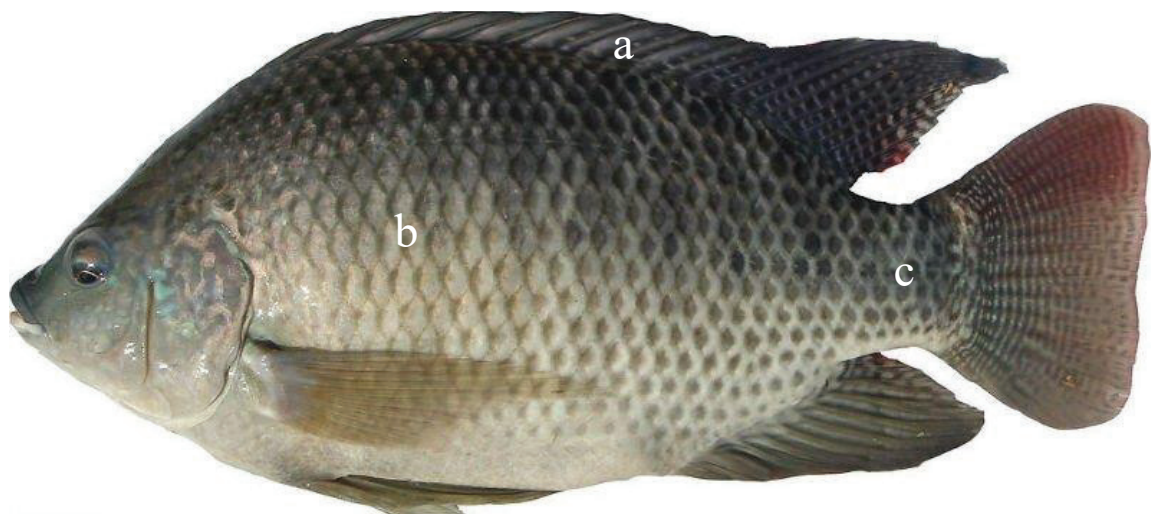
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TILÁPIA-DO-NILO

As tilápias são naturais da África, de Israel e da Jordânia. No Brasil, em 1952, foi importada a espécie *Coptodon rendalli* (tilápia-do-congo), seguida pela *Oreochromis urolepis hornorum* (tilápia-do-wami) e *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo) 20 anos depois, sendo a *O. niloticus* a mais difundida no Brasil e no mundo devido à sua fácil adaptação aos diferentes climas. Esta espécie não apresenta espinhos em forma de “Y” na sua musculatura, o que torna o seu filé a principal forma de comercialização e, devido à sua qualidade, favorece a aceitação pelo mercado consumidor. A tilápia apresenta grande adaptação ao sistema de produção em tanques-rede, que por ser um sistema intensivo tem como característica a contínua renovação da água, o que promove a remoção dos metabólitos e dejetos produzidos pela tilápia, favorecendo, assim, a qualidade da água e o desenvolvimento da espécie (VICENTE et al. 2014).

A característica biológica da *O. niloticus* ou tilápia-do-nilo (FIGURA 1) inclui: corpo compacto; espessura do pedúnculo caudal igual ao comprimento e escamas cicloides ausentes na superfície superior do focinho. O comprimento da mandíbula superior não apresenta dimorfismo sexual (não diferindo entre os sexos). Apresentam ainda linha lateral interrompida, partes espinhosas com 16 a 17 espinhos e partes moles da nadadeira dorsal (FAO 2010).

Figura 1 Exemplar de *O. niloticus* (tilápia-do-nilo) com sua coloração acinzentada característica, presença de espinhos na nadadeira dorsal (a), escamas cicloides (b) e espessura do pedúnculo caudal igual ao comprimento (c).



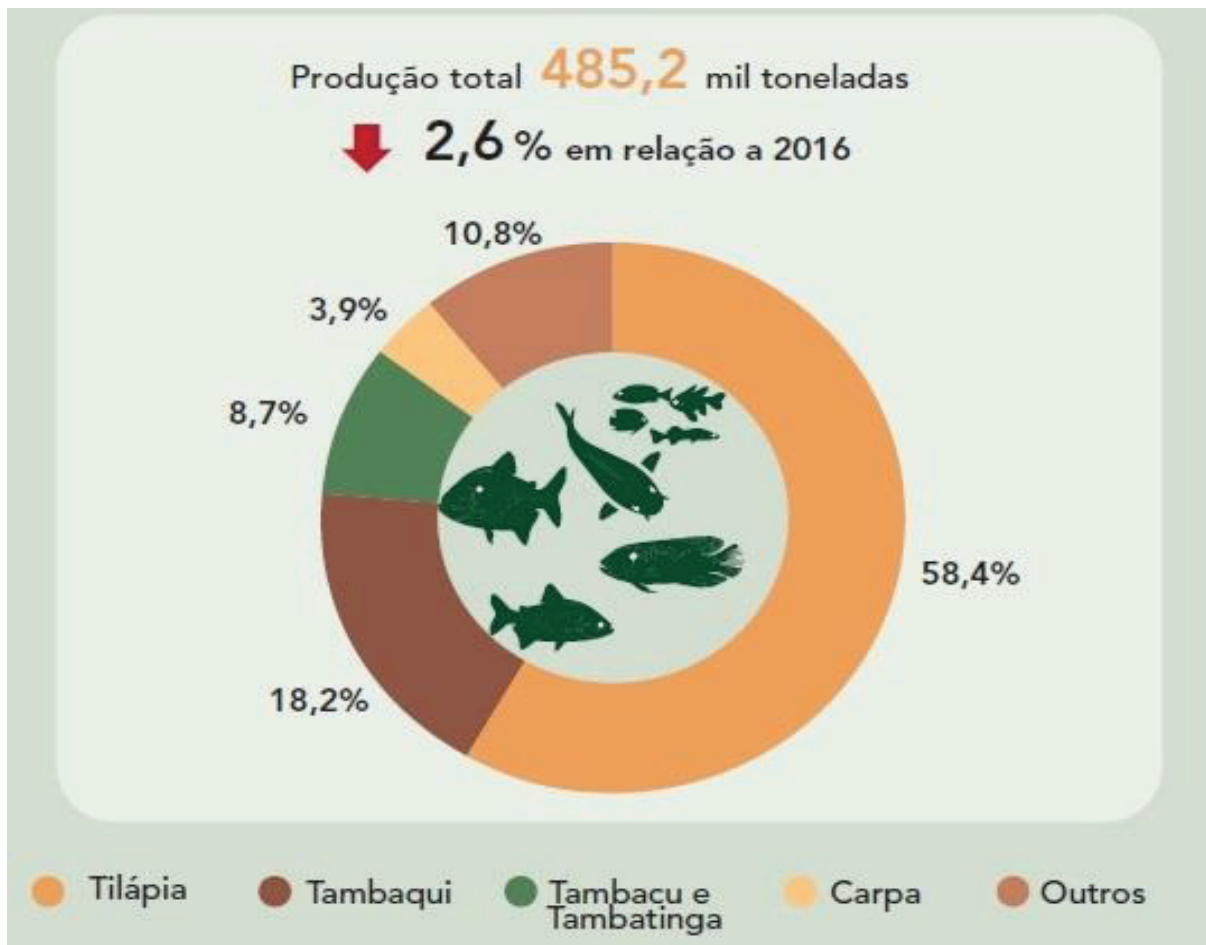
Fonte: domínio público.

A carne de tilápia é uma importante fonte de lipídios e de proteínas de fácil digestão e alto valor biológico – por conter aminoácidos essenciais como a lisina – além de possuir ampla gama de micronutrientes como vitaminas, minerais e ácidos graxos poli-insaturados como o ômega 3, em menor quantidade se comparado aos peixes marinhos. Pelo fato de a carne ser pobre em gorduras saturadas, carboidratos e colesterol, o seu consumo auxilia na perda de peso e no controle dos níveis de colesterol no sangue, tornando-se assim, notavelmente importante quando considerados os hábitos alimentares e culturais da sociedade moderna, bastante ligada a alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares, fatores determinantes ao desenvolvimento de doenças (DUARTE, 2017).

Em 2016, a produção mundial de pescado atingiu a marca de 170.9 milhões de toneladas, com 80 milhões de toneladas provenientes da aquicultura, sendo a China o maior produtor com 49,2 milhões de toneladas. Na América do Sul, o Chile registrou uma produção de 1 milhão de toneladas (sendo o 8º maior produtor do mundo), seguido pelo Brasil, com 600 mil toneladas (ocupando a 13ª posição no ranking geral dos maiores produtores de pescado). Porém, a produção de peixes de água doce é a principal categoria dentro da aquicultura brasileira respondendo por 84,5% da produção aquícola do País. (FAO, 2018).

Entre as espécies de peixe, a tilápia (*O. niloticus*) responde por 58,4% da produção brasileira (FIGURA 2), seguida pelo tambaqui com 18,2% de participação (IBGE, 2017). No Brasil, o consumo médio nacional de peixes de água doce (da pesca de captura no interior e da aquicultura de água doce) era bastante baixo, com 3,95 kg per capita por ano em 2013. A projeção, contudo, é que, em 2030, o consumo per capita aumentará em todas as regiões, exceto na África (-2%), e as maiores taxas de crescimento são projetadas para a América Latina (+ 18%) e para a Ásia e Oceania (+8% cada região), aumentando o consumo mundial de pescado para 21,5 kg, em comparação com 20,3 kg, em 2016. (FAO, 2017)

Figura 2 Participação dos grupos de peixes na produção da aquicultura brasileira. Mostrando um decréscimo em relação a 2016 com 58,4% da produção sendo carregada pela criação de tilápia e 18,2% pela de tambaqui.



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, 2017.

2.2 MICROBIOLOGIA E VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ DE PESCADO

O filé fresco viável de tilápia-do-nylo, quando analisado microbiologicamente acerca dos microrganismos responsáveis pela sua deterioração, aponta a presença principal de *Pseudomonas* (20%), *Aeromonas* (16%), *Flavobacterium* (10%) e *Alcaligenes* (10%) e também, com menor presença: *Enterobacteriaceae*; *Acinetobacter*; *Corynebacterium*; *Staphylococcus*; e *Micrococcus*. Contudo, nas amostras de filés já deterioradas (reconhecidos pela presença de mau cheiro), os resultados mostraram aumento significativo de *Pseudomonas* (52%) e da *Aeromonas* (32%) com a total ausência dos outros microrganismos previamente identificados no filé fresco viável, mostrando a drástica mudança na composição bacteriana durante o armazenamento (RONG et al., 2012).

Fogarty et al (2019) sugere que os melhores indicadores de qualidade a serem analisados no pescado estão associados aos microrganismos psicrotóxicos, entre eles *Pseudomonas* spp. e *Shewanella* spp, relacionando esta última, principalmente, a peixes marinhos.

As espécies de *Pseudomonas* são reconhecidas como agentes comuns que contribuem para a deterioração de carne fresca de pescado através da atividade de proteases extracelulares termo resistentes e lipases. Neste caso, o crescimento desses microrganismos e a utilização de nutrientes como açúcares e aminoácidos, com consequente liberação de compostos voláteis e não-voláteis, tais como ésteres, cetonas, álcoois, aldeídos, ácidos orgânicos, compostos de enxofre e aminas, causam alterações organolépticas (*off-flavours* e *off-odours*) a carne resultando em deterioração (STANBOROUGH et al., 2018).

Tanto a *Pseudomonas*, quanto as outras espécies gram-negativas presentes são favorecidas em relação a outras Gram-negativas ou Gram-positivas, pois elas crescem rapidamente em temperatura de resfriamento e metabolizam a fração de Nitrogênio Não Proteico (NNP). Este é o primeiro substrato para o crescimento de muitos microrganismos deteriorantes (HUIS IN'T VELD, 1996).

Além disso as *Pseudomonas* spp. são capazes de inibir umas às outras, por exemplo, com o aumento da temperatura de armazenamento, a *Pseudomonas fluorescens* conseguiu competir e inibir o crescimento da *Pseudomonas fragi*, além de inibir o crescimento de outras bactérias deteriorantes em amostras de pescado armazenadas a 0° C e 5° C (PARPALANI & BOZIARIS, 2016).

2.2.1 RELAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DETERIORANTES COM A VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ DE PESCADO

A deterioração dos peixes é composta por duas fases: a primeira consiste em um processo autolítico por enzimas endógenas, que produz o substrato para o crescimento bacteriano. A segunda consiste no crescimento de microrganismos, o que ocorre mais rapidamente do que nas carnes de mamíferos, devido ao pH da carne de peixe (>6.2) ser maior que o dos animais terrestres (COMI, 2017).

Com a morte do peixe, o oxigênio dos músculos esgota-se e, conseqüentemente, a glicólise anaeróbica começa a produzir ácido lático. O pH diminui, dependendo da espécie, de 6,8 a 6,1. Após a glicólise, inicia-se a proteólise, induzida por enzimas internas e ativadas pelo pH. A atividade proteolítica é responsável pelo amaciamento progressivo dos tecidos do

peixe, no entanto, a degradação de proteínas e de frações do NNP produz peptídeos de cadeia curta, aminoácidos livres e compostos de nitrogênio, que aumentam o crescimento bacteriano (COMI & IACUMIN, 2012).

Devido a intensa quantidade de substratos favoráveis as bactérias, representada principalmente pelas frações de NNP, o metabolismo e a multiplicação das bactérias se intensificam, assim ocorre progressivamente a formação e acúmulo de substâncias de odor desagradável, repugnantes e tóxicas. O típico padrão de crescimento bacteriano, durante a deterioração do pescado, mostra uma curva clássica definida por estágios no declínio da qualidade do pescado, descrita por alterações nas características sensoriais tais como odor, sabor, aparência e textura (VIEIRA, 2003).

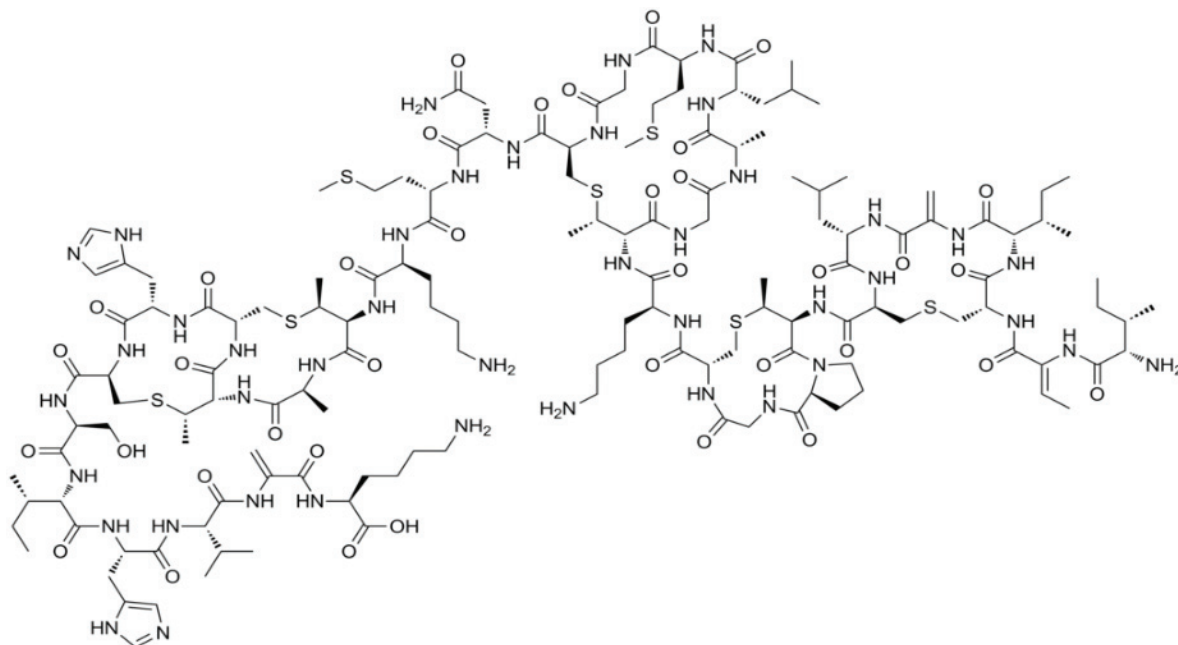
Algumas alterações da cor dos peixes, de tonalidade entre o amarelo e o amarelo esverdeado são consequências da presença de *Pseudomonas fluorescens*, outras colorações podem ocorrer, como a marrom chocolate (leveduras não esporuladas) e a cor rosada ou vermelha (espécies do gênero *Micrococcus* e *Bacillus* (ARAÚJO, 2010).

Apesar de a carne de peixe conter pouco carboidrato, o alto teor de aminoácidos livres na atividade metabólica das bactérias pode levar à produção de amônia, aminas biogênicas, compostos nitrogenados não proteicos, alcoóis, cetonas, aldeídos, ésteres, gás (CO₂) e outras moléculas, sendo responsável pela descoloração, odores desagradáveis e sabores estranhos, resultando na diminuição da vida de prateleira do produto (COMI, 2017).

2.3 BACTERIOCINAS

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos bioativos (AMPs) pequenos, termoestáveis, formados por sequências de aminoácidos (FIGURA 03) que são sintetizados no ribossomo de numerosas bactérias e liberados extracelularmente, elas agem matando ou inibindo o crescimento de células procariontes e podem ser úteis contra bactérias super-resistentes aos antibióticos convencionais (SAHOO et al., 2017).

Figura 3 Estrutura química da nisina, a bacteriocina mais utilizada na indústria de alimentos.



Fonte: Domínio público.

Elas podem ser produzidas espontaneamente como metabólitos primários ou secundários e a sua produção pode ser induzida e regulada pelo *quorum sensing*. O espectro de atividade, o modo de ação e as propriedades moleculares, genéticas e bioquímicas são variáveis. As proteínas de imunidade específicas protegem os microrganismos produtores de suas próprias bacteriocinas (BARBOSA, et al., 2018).

Essas substâncias são primeiramente sintetizadas na forma de pré-peptídeos ou pré-bacteriocinas biologicamente inativos. Essa pré-bacteriocina contém uma sequência guia de 18 a 27 aminoácidos para fazer com que a bacteriocina não se torne ativa dentro da célula e apresenta 2 glicinas, responsáveis pelo reconhecimento da pré-bacteriocina no sistema de transporte. O transportador contém uma porção proteolítica, responsável pela clivagem do peptídeo guia, além de uma porção de hidrólise responsável pela quebra do ATP e fornecimento de energia, realizando o transporte do precursor (pré-bacteriocina) à superfície celular durante a fase exponencial de crescimento e o catalisando na forma ativa (DRECHSEL et al., 2011).

2.3.1 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS

Um estudo realizado por Ghanbari et al (2013) mostrou que mais de 60 espécies de BALs já foram estudadas e se mostraram eficazes na síntese de componentes antimicrobianos.

Em estudo posterior, Gómez-Sala et al (2015), ao isolar 197 BALs que tiveram efeito antimicrobiano frente a 20 patógenos alimentícios, em que se destacaram: *Enterococcus faecium*; *Enterococcus faecalis*; *Pediococcus pentosaceus*; *Weissella cibaria*; *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*; *L. sakei* subsp. *sakei*; *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*; e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, demonstrou ainda mais a importância de novos estudos acerca da enorme diversidade de bactérias. Porém, bactérias de outras ordens também demonstraram serem produtoras de compostos antimicrobianos, como o *Bacillus coagulans* (FU et al, 2018), a *Pseudomonas putida* (AHMAD et al., 2013), o *Streptococcus phocae* (PAARI et al., 2011) e o *Bacillus amyloliquefaciens* (HALIMI et al., 2010)

Paralelamente, na busca por microrganismos que possuam alta capacidade de produção de bacteriocinas, mas que, ao mesmo tempo, sejam seguros (GRAS), as BALs surgem como protagonistas, devido a sua vasta utilização como probióticos e culturas starters (ANGIOLILLO et al. 2018), aumentando o interesse por estudos sobre a produção e métodos de utilização dos compostos produzidos por essa classe de microrganismo em alimentos como o pescado.

O *L. plantarum* FGC-12 foi estudado em caldo MRS e constatou-se que a bacteriocina foi produzida durante a fase de crescimento logarítmico (4-16h), com a produção máxima ocorrendo na fase estacionária (20h). Isto sugeriu que a produção de bacteriocina é um metabolito secundário e dependente da densidade celular. E também se sugeriu que diminuição da atividade na fase de declínio (28h) pode ser devido à atividade de proteases extracelulares endógenas induzidas durante esta fase (LV et al., 2017).

2.3.2 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTERIOCINAS

Um método clássico de classificação das bacteriocinas, datado de 1993 e utilizado até hoje, divide as bacteriocinas em quatro grupos, conforme a bioquímica e a genética desses compostos. O grupo I inclui os lantibióticos, como a nisina. Esse grupo é constituído por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular, diferenciados dos demais pela presença de lantionina e derivados. O grupo II é composto por pequenos peptídeos termoestáveis divididos em três subclasses: IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B). Os polipeptídeos altamente termolábeis fazem parte do grupo III, e o grupo IV compreende as proteínas que possuem grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura (KLAENHAMMER, 1993).

Já Drider et al. (2006), com base em suas características bioquímicas e genéticas, sugeriu uma distribuição das bacteriocinas em apenas três grandes classes. A classe I ou lantibióticos são peptídeos que contêm lantionina ou b-lantionina (ex. nisina). A classe II, heterogênea e de pequenos peptídeos termoestáveis (ex. pediocina) e a classe III, grandes peptídeos termolábeis (ex. helveticina).

Da mesma forma, um método alternativo proposto por Alvarez-Sieiro et al. (2016) coloca as bacteriocinas em três grandes classes, porém através da análise de suas modificações e estabilidade, sendo que as classes I e II incluem peptídeos termoestáveis pequenos (<10 kDa), diferenciando-se apenas pelas modificações, já que a classe II não as apresenta. Restando a classe III, que compreende as grandes (>10 kDa) bacteriocinas termolábeis.

Recentemente, uma nova classificação, agora analisando principalmente a estrutura química e de massa, foi proposta e divide as bacteriocinas em cinco classes (QUADRO 1) (VARELLA-COELHO et al., 2017).

Quadro 1 Classificação proposta recentemente, em que bacteriocinas são classificadas, em cinco classes, com base em sua estrutura química e de massa.

Classificação	Características
Classe I	Pequenos peptídeos lineares (>5 kDa) contendo aminoácidos modificados pós-tradução.
Classe II	Pequenos peptídeos lineares (>10 kDa) sem aminoácidos modificados pós-tradução.
Classe III	Grandes proteínas (<10 kDa).
Classe IV	Pequenos peptídeos circulares (>10 kDa) contendo uma ligação amida entre os terminais N e C, mas sem aminoácidos modificados pós-tradução.
Classe V	Pequenos peptídeos circulares ou lineares (>5 kDa) contendo extensivamente aminoácidos modificados pós-tradução e pontes formadas entre os grupos tiol dos resíduos de cisteína e o carbono α dos outros resíduos de aminoácidos.

Adaptado de Varella-Coelho et al. (2017)

2.3.3 MECANISMOS DE AÇÃO

Em sua grande parte, as bacteriocinas interagem com lipídeos aniônicos presentes na membrana plasmática dos microrganismos, o que caracteriza sua ação principalmente contra bactérias Gram-positivas, devido ao alto teor de lipídeos aniônicos em sua membrana (GUILHELMELLI et al., 2013). Outras bacteriocinas podem inibir também bactérias Gram-negativas; porém, algumas necessitam transpor a membrana externa da parede celular e alcançar a membrana plasmática da célula-alvo para atuar (COTTER et al., 2013).

A maioria das bacteriocinas age permeabilizando a membrana por meio da formação de poros, desestabilizando-a e ocasionando a morte celular. Todavia esse mecanismo varia de acordo com a bioquímica e a genética das bacteriocinas (QUADRO 2).

Quadro 2 Mecanismos de ação de acordo com a bioquímica e a genética conforme classificação geral descrita por Klaenhammer (1993) e Drider et al. (2006).

Classificação	Mecanismo de ação
Classe I	Interfere na síntese da parede celular e promove a formação de poros na membrana celular.
Classe II	Inserção na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e a morte celular.
Classe III	Morte celular através da lise da parede celular do microrganismo alvo.

Adaptado de Nascimento et al. (2008)

Conhecer os mecanismos de ação das diferentes classes de bacteriocinas fornece maior precisão sobre em qual microrganismo sua atividade será efetiva.

2.3.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

O primeiro passo para a extração de bacteriocinas está relacionado à obtenção do sobrenadante livre de células da cultura produtora seguido por um passo que envolve a concentração da substância. (ZOU, 2018). As técnicas mais usadas para a concentração incluem: (1) filtração por diálise (RANI, et al. 2016) ou ultra filtração (NODA et al., 2015), (2) precipitação de proteínas usando sais como sulfato de amônio (GE et al., 2016) ou ácidos

(CHENG et al. 2013); (3) extração de proteínas com solventes orgânicos como butanol e etanol (GAO et al., 2016).

Como o passo da concentração do sobrenadante não é muito seletivo, é necessário realizar a separação da bacteriocina dos outros compostos proteicos para a obtenção de bacteriocinas de alta pureza. (ZOU, 2018).

Um dos esquemas de produção, extração e purificação usado atualmente, e com grande sucesso, consiste das seguintes etapas: 1. cultivar a bactéria produtora em meio líquido sob condição ótima para produção da bacteriocina, 2. coletar o sobrenadante livre de células, 3. precipitar as proteínas do sobrenadante com saturação de sulfato de amônio e 4. realizar várias etapas cromatográficas como a de troca iônica, a de interação hidrofóbica e a de fase reversa (SONG et al., 2014; SAHOO et al., 2015; MALDONADO-BARRAGÁN et al., 2016; YI et al. 2016).

Um método alternativo sem o uso de cromatografia foi utilizado para a purificação de Pediocina PA-1 e Lactococina B, para tanto, foram realizados 4 passos: 1. cultivo da bactéria produtora em meio líquido sob condição ótima para produção da bacteriocina 2. precipitação das bacteriocinas com a adição de etanol ao sobrenadante, 3. utilização de eletroforese para a separação das proteínas e 4. ultrafiltração. (VENEMA et al. 1997).

2.4 UTILIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS EM ALIMENTOS

As bacteriocinas produzidas pelas cepas de BALs podem ser adicionadas aos alimentos de três maneiras diferentes (AHMAD et al., 2017; FAVARO; TODOROV, 2017; LEROI et al. 2015):

- a) Adição de ingredientes previamente fermentados pelas cepas;
- b) Fermentação do próprio alimento pelas cepas;
- c) Adição da bacteriocina purificada ou semi purificada extraída de cepas produtoras.

Para Ghanbari et al. (2013), em frutos do mar, a utilização das bacteriocinas como agentes de biopreservação surgem para:

- a) Promover a estocagem prolongada de frutos do mar durante o armazenamento.
- b) Contribuir para diminuir o risco de transmissão de patógenos alimentares nos produtos de peixe levemente preservados (PPLP) e nos produtos de peixe semi-preservados (PPSP).

- c) Melhorar as perdas econômicas devido à deterioração dos frutos do mar.
- d) Permitir a redução da aplicação de produtos químicos ou tratamentos físicos agressivos, como aquecimento e refrigeração, causando melhor preservação da qualidade nutricional dos alimentos.
- e) Dar uma resposta adequada à demanda do consumidor por alimentos minimamente processados, seguros e sem conservantes.

A aplicação da bacteriocina como revestimento protetor demonstra a versatilidade dos componentes antimicrobianos oriundos das BALs (ANGIOLILLO et al., 2018), tendo em vista que algumas cepas de BAL produtoras de bacteriocinas podem ser utilizadas tanto como cultura protetora quanto ingrediente alimentício (GÓMEZ-SALA et al., 2016). No entanto, os métodos de aplicação e conhecimento da microbiota da matriz devem ser observados, ao passo que níveis de concentração de bacteriocina baixos e alta presença de bactérias gram-negativas influenciam diretamente na efetividade da preservação (ANANOU et al., 2014).

Através do cultivo por *L. species* em 100 mL de caldo MRS por 48 h a 32° C foi extraído o sobrenadante por centrifugação (10000 RPM a 4° C por 20 m) e filtrado através de um filtro de acetato de celulose com poros de 0,2 (µm), e então aplicado na concentração de 1 % e 2 % na água de glaciamento dos filés de tilápias-do-nilo congelados, os resultados mostraram uma diminuição dos níveis de *Staphylococcus aureus* e de Coliformes totais, diminuindo também os níveis de BVT, demonstrando uma alternativa para a biopreservação de filés congelados de tilápia-do-nilo (IBRAHIM; DESOUKY, 2009).

A nisina associada à lactoperoxidase demonstrou ser uma excelente alternativa para a biopreservação de peixes e produtos de peixes através da diminuição das bactérias deteriorantes na matriz cárnea de sardinha (*Sardina pilchardus*), entre elas o *Flavobacterium indologenes*, a *Pseudomonas fluorescens*, a *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* e a *Shewanella putrefaciens* (ELOTMANI & ASSOBBHEI, 2004).

O *Lactococcus lactis* demonstrou atividade antibacteriana sobre *Arthrobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* quando aplicado na superfície de filés de Garoupa Pintada (*Epinephelus diacanthus*) pelo método de aspersão, utilizando 2 mL com 1600 AU/mL em temperaturas distintas (4, 0 e -18°C). A biopreservação aumentou a vida de prateleira do filé a 4° C para >21 dias, contra <14 dias do controle (SARIKA et al., 2012)

A paraplantaracina L-ZB1 produzida por *L. parapantarum* isolado de uma tradicional linguiça fermentada chinesa conseguiu, através da aspersão, aumentar a vida de prateleira de filés de truta-arco-íris resfriadas a 4°C em 4-6 dias. Isso foi alcançado por meio

da inibição do crescimento de bactérias da microflora, especialmente de Enterobacteriaceae e *Pseudomonas*, retardando o aumento do pH e BVT se comparado ao grupo controle, fazendo com que essa bacteriocina se torne uma alternativa para a biopreservação de filés de truta-arco-iris resfriadas a 4°C (GUI et al., 2014)

Testes realizados com *Bacillus amyloliquefaciens* demonstraram a produção de amilolisina, essa bacteriocina tem uma grande capacidade de proteger a carne de aves de patógenos de origem alimentar como a *Listeria monocytogenes*, sugerindo a sua potencial utilização como agente biopreservador em carne de aves (HALIMI et al., 2010)

2.4.1 LEGISLAÇÃO

Atualmente, poucas bacteriocinas são liberadas para a utilização em alimentos. Nos EUA e Canadá, por exemplo, apenas as nisinas, produzidos por *Lactococcus lactis*, as pediocinas, produzida por *Pediococcus acidilactici*, e Micocin®, uma combinação de três bacteriocinas (carnociclina A, carnobacteriocina BM1 e piscicolin 126) produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum* são aprovadas pelo FDA e entre essas, a nisina, é comercializada em mais de 48 países (ZOU et al, 2018). No Brasil, o uso da natamicina, produzida por fermentação pela *Streptomyces natalensis* é autorizado pela resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001 na superfície de alimentos, e o uso na nisina é autorizado pela Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996 como bioconservante na formulação de produtos alimentícios.

2.4.2 LIMITADORES DE ATIVIDADE

Algumas bacteriocinas encontram-se em estado natural como moléculas de alta massa molecular, formando agregados de 30-300 kDa. Esses agregados podem mascarar parcial ou totalmente a atividade antimicrobiana da bacteriocina e também induzir a erros na determinação de seu peso molecular. Isso ocorre principalmente nas bacteriocinas de baixo peso molecular, apolares, que interagem facilmente com o material extracelular de células lisadas durante o processo de extração e com outros compostos apolares do meio de cultura, tais como lipídeos e ácidos graxos provenientes do emulsificante (polissorbatato Tween 80) presente no meio MRS, podendo ser desagregados por meio de agentes dissociantes como ureia, processo de ultrafiltração, ou por eliminação de lipídeos por extração com metanol-

clorofórmio ou por etanol-dietil-éter (MURIANA; KLAENHAMMER, 1991; CONTRERAS et al., 1997).

3 BIOPRESERVAÇÃO DE FILÉS RESFRIADOS DE *OREOCHROMIS NILOTICUS* (TILÁPIA-DO-NILO) COM BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

3.1 INTRODUÇÃO

Os pescados geralmente são considerados um alimento seguro, mas a produção, desde a criação até o consumo, pode ser associada a problemas de segurança alimentar (WHO, 2007). O músculo dos peixes é estéril, porém sua pele, secreções e vísceras contêm números significativos de microrganismos e durante as etapas de abate, tais microrganismos externos podem contaminar a carne, podendo ocorrer também contaminações pós-processamento, por meio do ambiente e da manipulação (LEROI, 2010).

Dentre os diversos produtos cárneos, o pescado é o mais vulnerável à deterioração microbiana e à oxidação lipídica, pela sua própria composição biológica (SOARES et al., 2012). Esta deterioração microbiana é resultante especialmente da ação de microrganismos psicrotróficos, tais como *Pseudomonas* (EMIKPE et al., 2011; MOHAN et al., 2010) *Shewanella* e *Flavobacterium* spp (MOHAN et al., 2010).

Para conter a multiplicação microbiana e as reações enzimáticas, com o intuito de aumentar a vida de prateleira dos pescados, alguns métodos térmicos utilizados há séculos ainda são estudados, aprimorados e associados a novos métodos de conservação, como atmosfera modificada, alta pressão, irradiação e uso de aditivos alimentares, sejam eles químicos ou biológicos (SAMPELS, 2014). Devido às novas tendências adotadas pelos consumidores em relação ao consumo de alimentos seguros, saudáveis, minimamente processados e que não contenham conservantes químicos, os aditivos naturais tornaram-se populares, neste sentido as bacteriocinas surgiram como uma opção (MAHENDRA, 2016).

Essas substâncias são classificadas como peptídeos bioativos, são produzidas nos ribossomos de alguns microrganismos e liberadas para o meio extracelular, onde, potencialmente, agem inibindo o crescimento ou matando microrganismos patogênicos e resistentes aos antimicrobianos convencionais. Entre os principais produtores de bacteriocinas estão as bactérias do gênero *Lactobacillus*.

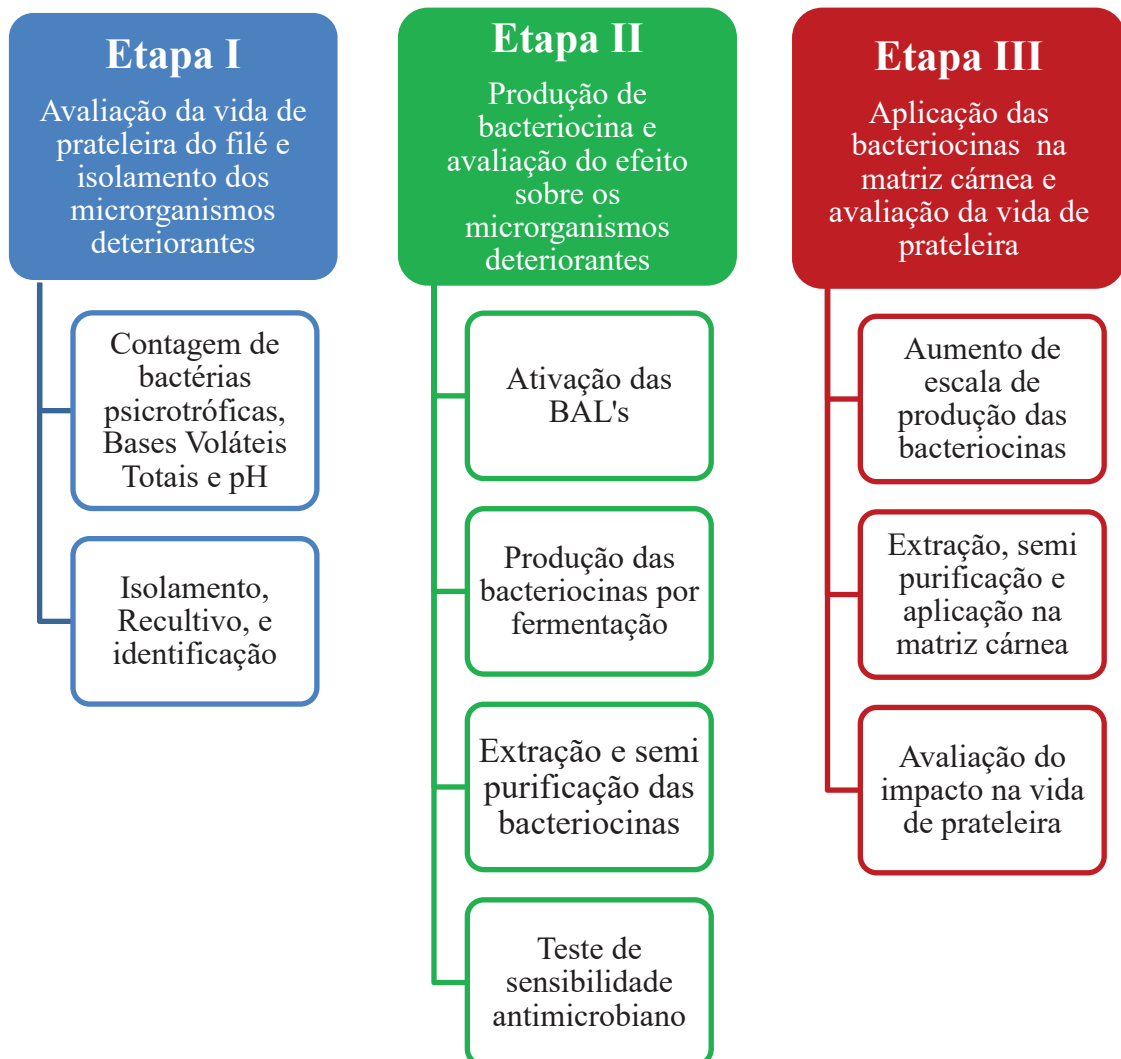
Em estudos anteriores, o *Lactobacillus salivarius* demonstrou possuir características físico-químicas interessantes que favorecem seu uso futuro na biopreservação de alimentos, sendo altamente aderente à parede celular, com um amplo espectro e capacidade de permeabilização da membrana (WAYAH & PHILIP, 2018).

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método alternativo de biopreservação de filés de tilápia-do-nilo resfriados com a utilização de bacteriocinas obtidas de bactérias Ácido Láticas.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os filés de tilápias-do-nilo foram produzidos em um Abatedouro Frigorífico de Pescado localizado no município de Jaboticaba – RS, registrado no serviço de inspeção (SIM), com equivalência ao Sistema Unificado Estadual de Sanidade Agroindustrial Familiar, Artesanal e de Pequeno Porte (SUSAF-RS) e com Boas Práticas de Fabricação aplicadas, monitoradas e verificadas.

Figura 4 Fluxograma com as etapas a serem executadas em ordem cronológica



Fonte: elaborada pelo autor

A primeira etapa da pesquisa consistiu na avaliação da vida de prateleira do filé, realizada através da análise de atividade de água (aW), análise de Bases Voláteis Totais (BVT), aferição do pH e contagem de bactérias psicrotróficas; no isolamento e recultivo dos microrganismos psicrotróficos; e na identificação das espécies isoladas. Na segunda etapa, realizou-se a ativação das BALs que se encontravam congeladas; a produção das bacteriocinas por fermentação; a extração por centrifugação; a semi purificação por ultra-filtração; e o teste de sensibilidade antimicrobiano.

Na terceira etapa da pesquisa realizou-se o aumento da escala de produção em soro de leite da bacteriocina selecionada no teste de sensibilidade antimicrobiano. Para isso, foi utilizado soro de leite gentilmente cedido por um laticínio localizado no município de Sarandi – RS, registrado no Serviço de Inspeção Estadual do Estado do Rio Grande do Sul (CISPOA/DIPOA-RS); a aplicação do composto na matriz cárnea; o impacto desta aplicação no aumento ou na diminuição da vida de prateleira do filé resfriado; e o tratamento dos dados obtidos.

3.2.1 ETAPA I: AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DETERIORANTES

Para a avaliação da vida de prateleira do filé de pescado resfriado foi realizada a contagem dos microrganismos psicrotróficos, a análise de bases voláteis totais, a aferição do pH e a análise de atividade de água.

3.2.2 ACOMPANHAMENTO DA DETERIORAÇÃO DO PESCADO

A atividade de água foi analisada no início do período de armazenamento (tempo 0).

Os testes de Bases Voláteis Totais e pH foram realizados diariamente, e a contagem de microrganismos psicrotróficos foi realizada a cada sete dias em duplicata simulando geladeiras domésticas e bancadas com gelo até o pescado ultrapassar um dos limites previstos nas legislações, quais sejam:

- a) pH da carne máximo de 7 (BRASIL, 2017).
- b) BVT máxima de 30 mg de nitrogênio/100g de tecido muscular (BRASIL, 2017).
- c) Contagem de bactérias psicrotróficas máxima de 10^7 UFC.g⁻¹ (ICMSF, 1986).

3.2.3 RECVLTIVO E ISOLAMENTO DAS BACTERIAS PSICROTROFICAS

Durante a deterioração do pescado, as bactérias presentes e responsáveis pelas alterações causadas ao filé foram isoladas e recultivadas para sua identificação e utilização no teste de sensibilidade antimicrobiano realizado na etapa II.

Para o isolamento, três colônias de cada placa, das maiores diluições, tanto para a amostra inicial (t 0A, t 0B e t 0C), como para amostras com quatorze dias de armazenamento a 4° C (t 14-4A, t 14-4B e t 14-4C), foram semeadas em ágar PCA, utilizando-se a técnica de esgotamento por estrias, sendo incubadas a 15°C por 2 dias para o seu crescimento, totalizando seis placas.

3.2.4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Testes morfo-tintoriais e bioquímicos foram realizados para a identificação das bactérias psicrotróficas isoladas do pescado, conforme Nunes (2017) com modificações. Os testes utilizados foram:

- a) Coloração de gram
- b) Motilidade no meio SIM, Teste de produção de Indol e H₂S
- c) Catalase
- d) OF
- e) Crescimento em meio Mac Conkey (MC)
- f) Oxidase
- g) Teste de Agar de Ferro e Açúcar Tríplice em Meio de TSI
- h) Teste de Vermelho de metila (VM)
- i) Teste de Urease
- j) Teste de Citrato de Simmons

A descrição dos procedimentos dos testes bioquímicos estão detalhados no Anexo A.

3.2.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As análises físico-químicas (pH e BVT) foram realizadas diariamente por 14 dias e a microbiológica (contagem padrão em placa) foi realizada a cada sete dias por 14 dias.

3.2.5.1 *Análise da atividade de água*

A atividade de água foi analisada no tempo 0, para conhecer as condições iniciais do pescado, onde 5g do pescado resfriado foram analisadas no aferidor de atividade de água digital Labmaster-aW neo (Tecnal®) em triplicata.

3.2.5.2 *Análise do pH*

O pH foi aferido com o auxílio de um phmetro digital (Tecnal®) previamente calibrado, para tanto, 10 ml de água destilada foi adicionado a 25 g do pescado finamente picado. A aferição foi realizada em triplicata.

3.2.5.3 *Análise de Bases Voláteis Totais*

A análise de BVT (ANEXO B) foi realizada por destilação/acidificação, em que 10g do pescado foi levado ao tubo de destilação com o auxílio de 20 ml de água destilada, adicionando-se 2 g de óxido de magnésio (MgO) e procedendo a destilação por arraste de vapor por 30 minutos em temperatura média, recolhendo o destilado em erlenmeyer contendo 25 ml de solução de ácido bórico 4% (H₃BO₃ + indicador). Em seguida, a titulação com ácido clorídrico 0,1 M foi conduzida até o ponto de viragem. O teste foi realizado em triplicata, além do teste branco.

A equação 1 foi utilizada para obter a quantidade de Bases Voláteis Totais em mg / 100 g de pescado.

$$\text{NBVT} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{(V - B) \times f \times 140}{m} \quad (1)$$

Onde:

V = volume de solução de HCl 0,1 M gasto na titulação (mL);

B = volume do branco (mL);

f = fator de correção da solução de HCl 0,1 M (ou 0,01 M)

m = massa de amostra (g).

3.2.5.4 Contagem de microrganismos psicrotróficos

Para a contagem dos microrganismos psicrotróficos, utilizou-se a técnica de Contagem Padrão em Placas (CPP) (BRASIL, 1993). Inicialmente, 225 ml de água peptonada estéril foram adicionadas às 25 g do pescado previamente acondicionado em saco plástico estéril para homogeneizador, a homogeneização foi conduzida em um homogeneizador tipo stomacher (Marconi®) por 1 minuto.

Em seguida, procedeu-se à diluição seriada, em que, com uma micropipeta, transferiu-se 1 ml do extrato homogeneizado para um tubo de ensaio contendo 9 ml de água peptonada estéril (10-1), após agitação, foi transferindo novamente 1 ml deste tubo para outro tubo com 9 ml de água peptonada estéril (10-2) até a diluição 10-5, descartando 1 ml do último tubo.

Com o auxílio de uma micropipeta, 0,1 ml de cada diluição foi inoculado, de forma superficial, a placas contendo ágar padrão (*Plate Count Ágar – PCA*) solidificado, restando espalhado com o auxílio de alça de Drigalski descartável estéril.

O experimento foi realizado em triplicata a cada 7 dias.

3.2.6 ETAPA II: PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE OS MICRORGANISMOS DETERIORANTES

As Bactérias Ácido-Láticas previamente selecionadas foram incubadas para que fermentem o caldo deMan, Rogosa e Sharpe (MRS) e produzam os compostos antimicrobianos, que foram extraídos, semipurificados por filtração e testados frente às bactérias psicrotróficas recultivadas da contagem de microrganismos psicrotróficos em um teste de sensibilidade antimicrobiano em poços.

3.2.6.1 REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

Foram utilizadas 8 BALs adquiridas de 4 diferentes fornecedores (QUADRO 3):

- a) LEMMA – Importadora e distribuidora de matérias primas para a indústria farmacêutica – Brasil
- b) Infinity Pharma – Produtor e fornecedor de produtos farmacêuticos e probióticos – Brasil
- c) FAGRON – Produtor e Fornecedor de produtos farmacêuticos e probióticos - Brasil

d) T.H.T S.A – Produtor e fornecedor de Probióticos e Culturas *starters* – Bélgica

Quadro 3 Relação das BALs a serem selecionadas e os locais de aquisição dos probióticos.

	Microrganismo	Fornecedor
1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LEMMA
2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Infinity Pharma
3	<i>Lactobacillus lactis</i>	LEMMA
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	T.H.T. S.A
5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	FAGRON
6	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	LEMMA
7	<i>Lactobacillus lactis</i>	LEMMA
8	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Infinity Pharma®

Para sua ativação, as BAL's foram inoculadas em caldo MRS, sendo incubadas a 37° C por 24 h. Após a incubação, as BAL's foram transferidas, com o auxílio de alça de níquel-cromo, para placas contendo ágar MRS e incubadas a 37° C por 48 h.

3.2.6.2 PRODUÇÃO DAS BACTERIOCINAS

Após o período de ativação, uma alçada da colônia bacteriana foi transferida a tubos de ensaio contendo 10mls de caldo MRS e incubadas por 24h a 37°C para a obtenção do inóculo. Então, o inóculo overnight foi transferido para erlenmeyer de 100 ml contendo 50 ml de caldo MRS, sendo incubados em mesa agitadora orbital com aquecimento (Oxylab®, OXY 304-T) a 100 RPM e 37° C por 72 h.

3.2.6.3 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO

O volume fermentado foi transferido para tubos tipo falcon para a centrifugação (8000 RPM, 15 min. A 4° C) em centrífuga refrigerada CR22N (Hitachi®), em seguida o sobrenadante foi retirado e acondicionado em tubos para posterior utilização como bacteriocina bruta.

3.2.6.4 SEMI PURIFICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Para a semipurificação, o extrato bruto foi ultrafiltrado em membrana de Policloreto de vinilideno com diâmetro de corte de 30 a 80 kda em um filtração tangencial de bancada (WGM Sistemas: São Paulo – Brasil) com pressão de 1 bar, obtendo assim o extrato semi purificado.

3.2.6.5 *TESTE DE AÇÃO ANTIMICROBIANA*

A atividade antimicrobiana foi avaliada por ágar difusão em ágar Mueller Hinton (MH), conforme Chahad et. al. (2012), com modificações.

O meio MH foi preparado e 15 ml de ágar foi transferido para placas de Petri, após a solidificação, uma suspensão das bactérias psicrotróficas em solução salina (0,85% NaCl) foi ajustada para o padrão de turbidez 0,5 McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), sendo semeado 0,1 ml da suspensão na superfície do ágar e espalhada com alça de Drigalski estéril.

Dez minutos após, com o auxílio de um perfurador de aço, orifícios de 8 mm foram confeccionados no meio, onde, posteriormente, 40 μ l do extrato foi inoculado nos poços.

Para o controle positivo foi utilizado disco de Tetraciclina (30 μ g – Laborelin) e para o controle negativo foi utilizado caldo MRS estéril. As placas foram incubadas a 7° C por 8 dias. O experimento foi conduzido em triplicata.

Os halos de inibição foram medidos e expressos como tamanho do diâmetro em centímetros (cm). Os extratos que formaram o maior halo de inibição foram escolhidos para a etapa III.

As mesmas condições foram utilizadas utilizando a bacteriocina semi purificada por filtração.

3.2.7 **ETAPA III: APLICAÇÃO DA BACTERIOCINA NA MATRIZ CÁRNEA E AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA**

Para obter quantidade suficiente para a aplicação, o meio de cultura utilizado foi soro de leite, seguido da extração e semi purificação por ultrafiltração.

A bacteriocina selecionada foi adicionada no pescado fresco (tempo 0) por imersão e aspersão, em seguida o pescado foi analisado para atividade de água armazenado a 4° C até atingir o limite das análises (Contagem de psicrotróficas, BVT ou pH), sendo utilizada uma amostra controle (sem adição de bacteriocina).

3.2.7.1 AUMENTO DA ESCALA DE PRODUÇÃO EM SORO DE LEITE, EXTRAÇÃO, SEMIPURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO

Para o aumento da escala de produção, foi utilizada a fermentação submersa de soro de leite, previamente caracterizado, obtido de um laticínio registrado no Serviço de Inspeção Estadual e localizado no município de Sarandi – RS.

Tabela 1 caracterização do soro de leite realizado pelo laticínio

Temperatura	3,5° C
Gordura	0,15 %
pH	6,1
EST	5,78 %
ESD	5,35 %
Sólidos	6,5 %
Lactose	68,7 %

O soro foi transportado em caixa isotérmica com gelo na proporção de 2:1 até o Laboratório de Bioquímica de Processos (LABIO) localizado no prédio L1 – Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo – UPF.

O pré inóculo de *Lactobacillus salivarius* foi preparado em tubos de ensaio de 10 mL contendo caldo MRS, sendo incubados a 37° C por 36 horas, em seguida os pré inóculos foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de soro de leite estéril e foram incubados em estufa a 37° C por 36 horas.

Para o meio de cultivo, inicialmente, procedeu-se o desnate do soro, utilizando-se de desnatadeira centrífuga. Em seguida prosseguiu-se a esterilização a 121°C por 15 minutos, após realizou-se uma filtração simples para a retirada das proteínas precipitadas no meio.

O inóculo e o meio de cultura foram adicionados ao Biorreator Autoclavável SL-135 (Solab®) estéril. As condições de fermentação foram: Temperatura 37° C +- 1, agitação de 130 RPM por 72h.

O soro fermentado foi retirado do biorreator em erlenmeyers estéreis de 2 litros e acondicionado sob-refrigeração a 4° C. Posteriormente, o soro fermentado foi centrifugado em centrífuga de alta velocidade refrigerada CR22N (Hitachi®) a 8000 RPM em 4° C por 15 min. para a obtenção do sobrenadante livre de células, classificado como extrato bruto centrifugado.

Para a semipurificação, o extrato bruto foi ultrafiltrado em membrana de Policloreto de vinilideno com diâmetro de corte de 30 a 80 kda em um filtração tangencial de bancada (WGM Sistemas: São Paulo – Brasil) com pressão de 1 bar, obtendo assim o extrato centrifugado semi purificado.

3.2.7.2 APLICAÇÃO DA BACTERIOCINA NA MATRIZ CÁRNEA

A aplicação do composto na matriz cárnea (filé de tilápia resfriado) foi realizada por imersão e aspersão com o extrato a 4° C. Para tanto, foi utilizado um planejamento experimental com dois fatores de estudo (forma de aplicação e quantidade aplicada) sendo que a forma de aplicação variou em 2 níveis (aspersão e imersão) e a quantidade variou em 3 níveis (0,4mL,0,6mL e 0,9 mL) (TABELA 2).

Tabela 2 Planejamento experimental para o método de imersão, com um fator de estudo (tempo de imersão) variando em três níveis (tempo de imersão) e com um controle (sem aplicação).

Experimento	Variável 1	Variável 2
	Imersão	Aspersão
1	2 s	0,4 mL
2	4 s	0,6 mL
3	6 s	0,9 mL
4	Controle	Controle

Para a obtenção da quantidade a ser aplicada o pescado foi pesado antes e depois da imersão na solução por 2s, 4s e 6s, reservando o mesmo tempo para o gotejamento do excedente, a diferença do peso obtido foi considerada para a utilização na aspersão, ou seja:

- 2 segundos de imersão correspondeu a 0,4g de solução aplicada, resultando em 0,4mL de solução a utilizada na aspersão.
- 4 segundos de imersão correspondeu a 0,6g de solução aplicada, resultando em 0,6mL de solução a utilizada na aspersão.
- 6 segundos de imersão correspondeu a 0,9g de solução aplicada, resultando em 0,9mL de solução a utilizada na aspersão.

Após a aplicação, os filés foram fracionados e armazenados em sacos de polietileno de alta densidade e acondicionados sob refrigeração de 4°C.

A atividade de água foi avaliada no início do armazenamento, após a aplicação e nas amostras controle.

O pescado foi analisado inicialmente (t0) e a cada 48h para contagem de bactérias psicrotróficas e parâmetros físico-químicos como pH e Bases Voláteis Totais (BVT).

As análises foram realizadas até o pescado ultrapassar um dos limites previstos nas legislações, quais sejam:

- a) pH da carne máximo de 7 (BRASIL, 2017).
- b) BVT máxima de 30 mg de nitrogênio/100g de tecido muscular (BRASIL, 2017).
- c) contagem de bactérias psicrotróficas máxima de 10^7 UFC.g⁻¹ (ICMSF, 1986).

3.2.7.3 TRATAMENTO DOS DADOS

Os resultados das análises físico-químicas foram tratados através de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de significância de 5%. Para os resultados microbiológicos foi realizada a conversão das contagens para logaritmo e realizada a inserção das informações na base de dados COMBASE[®], para obtenção das curvas de crescimento seguindo os modelos preditivos de Baranyi e Roberts (BARANYI & ROBERTS, 1994).

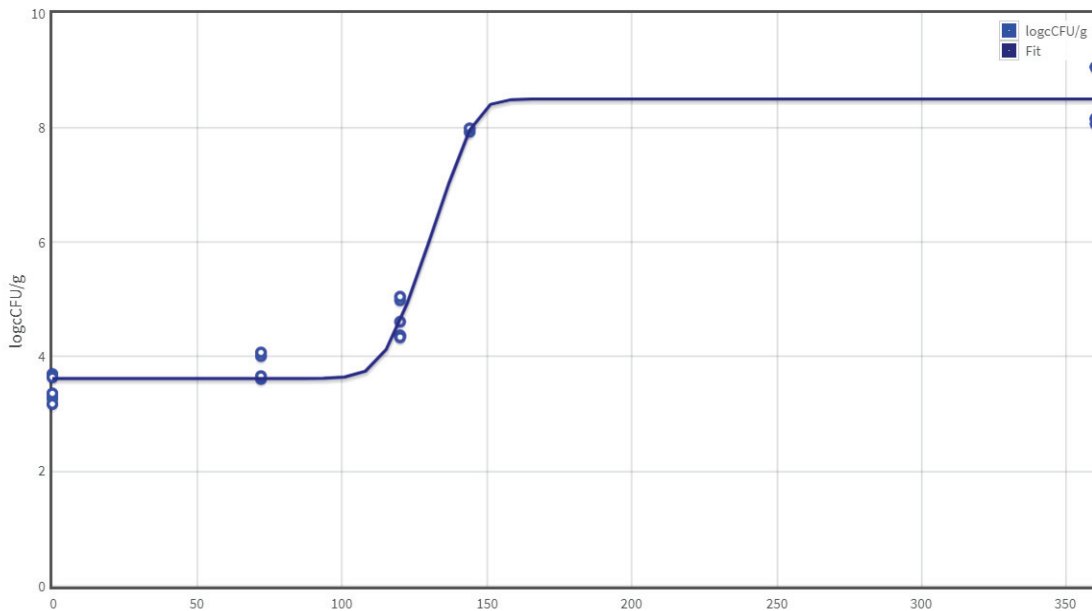
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 ETAPA I: AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DETERIORANTES

A contagem inicial apresentou uma contaminação elevada dos filés de pescado ($5,6 \times 10^3$) (FIGURA 5), e sabe-se que quanto mais alta esta contagem inicial, mais rápida será a deterioração do alimento e menor será sua vida de prateleira (PACQUIT et al, 2007; AUBOURG et al, 2007).

Assim, a observação desse resultado de contagem inicial de microrganismos psicrotróficos indicou a baixa qualidade destes produtos e a possível falha durante o processo de despesca, abate ou filetagem, tendo em vista que a contaminação do filé se dá, geralmente pelo contato de vísceras, secreções e pele do peixe com a carne, bem como com a má higiene pessoal e das instalações da indústria (LEROI, 2010).

Figura 5 Contagem de microrganismos psicrotróficos (LogUFC/g⁻¹) em amostras refrigeradas a 4° C.



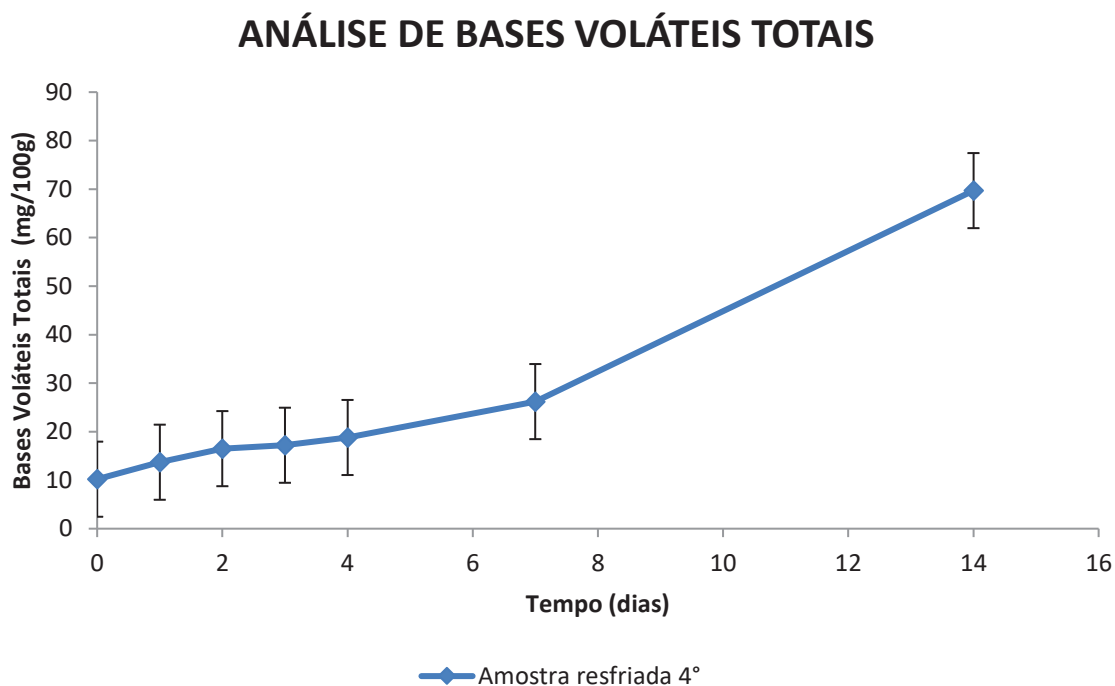
Fonte: elaborada pelo autor, plataforma COMBASE®.

Aproximadamente após cinco dias de refrigeração a 4° C a deterioração começou a ser evidenciada, principalmente, pelo forte odor desagradável das amostras, característica que é tipicamente detectada quando as contagens microbianas estão acima de 6 a 7 LogUFC/g⁻¹ (SUGAWARA & NIKAIDO, 2014). Os microrganismos psicrotróficos, incluindo as bactérias saprófitas e de deterioração, podem atingir concentrações de 8 a 9 LogUFC/g⁻¹ após 10 a 12 dias a 4°C (COMI, 2017).

Apesar de não existir legislação brasileira específica para microrganismos psicrotróficos há uma recomendação internacional que estabelece limite de 10⁷ UFC.g⁻¹ (ICMSF, 1986).

A análise de bases voláteis em função do tempo (FIGURA 6) revelou que o frescor do pescado resfriado a 4° C se manteve por aproximadamente 8 dias, aumentando seus níveis de forma lenta, porém constante durante o tempo de armazenamento. Esse aumento se deve, principalmente, pelo aumento da multiplicação bacteriana, nesse caso, em peixes tropicais, a deterioração é predominantemente devida a bactérias do gênero *Pseudomonas*, através da amônia produzida pela quebra do Nitrogênio Não Proteico (NNP). (HOWGATE, 2010).

Figura 6 Comportamento das Bases Voláteis Totais (mg/100g) em função do tempo



Fonte: elaborada pelo autor.

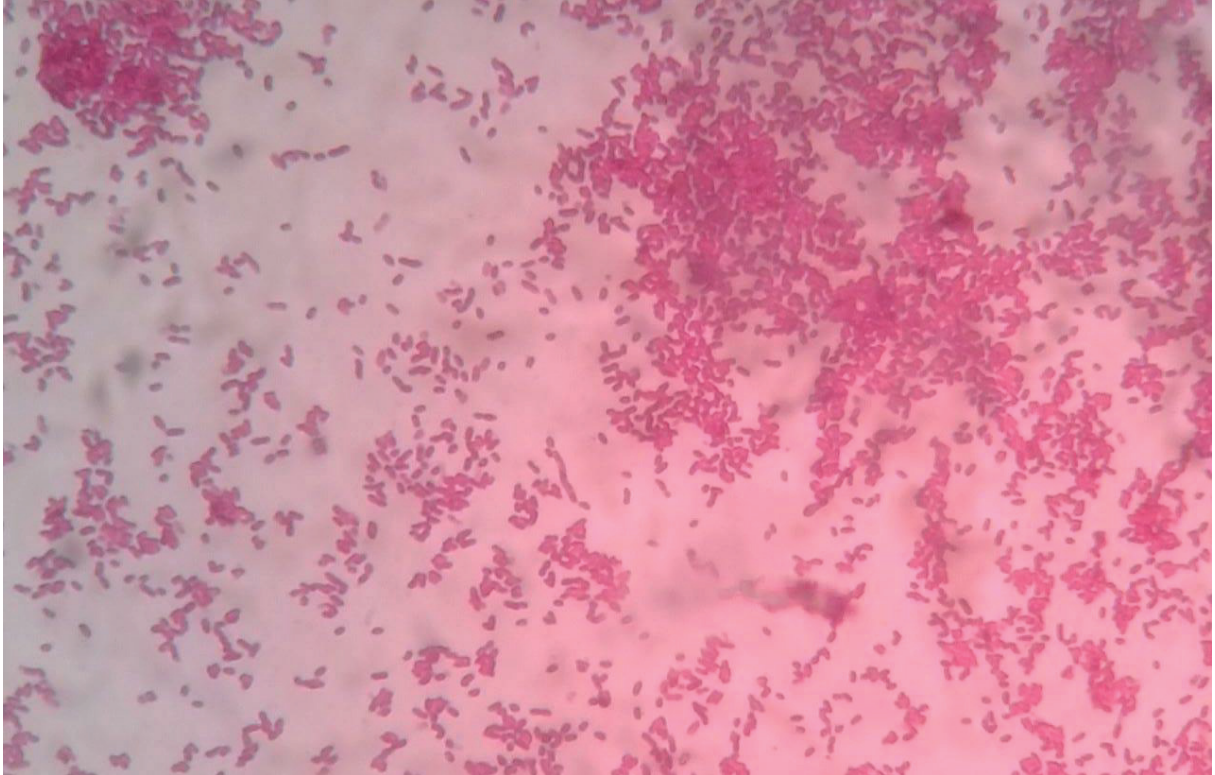
O pH do pescado se manteve estável, iniciando em 6,3, aumentando para 6,9. O pH da carne de peixes frescos é um parâmetro que fornece informações sobre o estado de conservação do pescado, uma vez que o processo de deterioração altera os níveis de pH devido à decomposição de aminoácidos, porém o uso desta análise deve ser feito em conjunto com outros parâmetros para determinar o frescor do pescado (ANDRÉS-BELLO et al., 2013).

3.3.1.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Foram coletadas três colônias de cada placa com as maiores diluições, tanto da placa da contagem inicial quanto da placa de contagem realizada com 14 dias de armazenamento a 4° C. Dessa forma foi possível identificar quais bactérias estariam presentes no pescado fresco e quais bactérias estariam presentes no pescado durante a deterioração.

A coloração de Gram revelou uma quantidade majoritária de bactérias bacilares gram-negativas (FIGURA 7).

Figura 7 Bactérias observadas em microscópio com aumento de 100x, revelando a coloração negativa ao gram e a morfologia bacilar.



Fonte: elaborada pelo autor.

Entre os seis isolados, todos apresentaram coloração Gram-negativa, corroborando com o fato de que dentro do grupo de bactérias deteriorantes do pescado, as bactérias psicrotóficas se destacam principalmente sob-refrigeração, e há uma alta prevalência de bactérias Gram-negativas sobre Gram-positivas, em que a microflora Gram-negativa pode contribuir com mais de 80% da flora total. (COMI, 2017).

Os resultados obtidos dos testes bioquímicos dos nove microrganismos isolados estão expressos no quadro a seguir (QUADRO 4):

Quadro 4 Resultado dos testes bioquímicos das seis bactérias isoladas.

Amostra	T0-A	T0-B	T0-C	T14-4A	T14-4B	T14-4C
Teste						
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+

Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-
Oxidação e Fermentação (OF)	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI	OXI
<i>Triple Sugar Iron (TSI)</i>	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+	+	+	+	+	+
V.M.	-	-	-	-	-	-

+ positivo; - negativo; OXI oxidação da glicose

Em um estudo realizado por Alcântera et al. (2012) constatou-se que os principais deteriorantes em carnes são bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* / *Moraxella*, *Shewanella*, *Brochothrix* e *Lactobacillus*. Porém, os testes bioquímicos excluem o gênero *Acinetobacter/Moraxella*, por ser tratarem de bactérias imóveis, e nos testes bioquímicos, todas as bactérias se apresentaram móveis.

Já gênero *Shewanella* está associado principalmente a pescados marinhos, e por apresentar pouca identificação em estudos com pescado de água doce, esse gênero também foi excluído. Já os gêneros *Brochothrix* e *Lactobacillus*, por se tratarem de bactérias Gram-positivas, também foram excluídos, tendo em vista os testes negativos da coloração de Gram.

Portanto, através da interpretação dos testes, bactérias do gênero *Pseudomonas* foram compatíveis, pois se tratam de bactérias psicrotróficas e segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005), as *Pseudomonas* são bacilos gram-negativos, não esporulados, tipicamente tem flagelos polares simples ou múltiplos (mobilidade positiva), aeróbias estritas (catalase e oxidase positivas), não fermentadoras (OF oxidativa e Vermelho de Metila negativa) nem produtoras de gás (H₂S negativa), capazes de utilizar citrato e sais de amônia como único substrato (Citrato positivo) não produtora de indol (característica associada à cepas mais patogênicas de *Pseudomonas*).

Entre as espécies mais associadas à deterioração de pescado encontram-se a *P. fluorescens*, *P. fragi* e *P. putida* (MACÉ et al, 2012).

Com o resultado igual de todas as bactérias isoladas e identificadas, duas bactérias, uma do tempo zero e uma do tempo quatorze foram utilizadas para a avaliação do efeito das bacteriocinas realizada na etapa II

3.3.2 ETAPA II: PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE OS MICRORGANISMOS DETERIORANTES

Nessa etapa as bactérias ácido lácticas foram induzidas a produzir os compostos antimicrobianos em caldo MRS e soro de leite, para posterior extração, semi purificação e avaliação da ação antimicrobiana frente às *Pseudomonas* isoladas da primeira etapa.

A turvação do caldo MRS após 72h indicou um crescimento satisfatório, corroborando com Lv et al. (2017) que demonstrou uma máxima produção de bacteriocina durante o início da fase estacionária (18 – 22 h), com manutenção do pico de produção por até 48 h, aumentando a produção com o aumento da densidade óptica da bactéria e iniciando a diminuição da produção a partir de 72 h.

Além disso, a temperatura de incubação de 37° C demonstrou ser uma temperatura em que se conseguiu boa produção do composto por diferentes BALs (SCHELEGUEDA et al., 2015). Pois a maioria dos Lactobacilos crescerem melhor em temperatura mesofílicas, com limite máximo perto de 40°C (HAMMES & HERTEL, 2015).

3.3.2.1 AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

Os resultados obtidos do teste de sensibilidade antimicrobiano estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Resultado da medição do diâmetro dos halos (cm) do teste de sensibilidade antimicrobiano realizado com oito extratos de bacteriocinas brutas, controle positivo e negativo, frente aos microrganismos isolados no dia 0 e no dia 14 a 4° C .

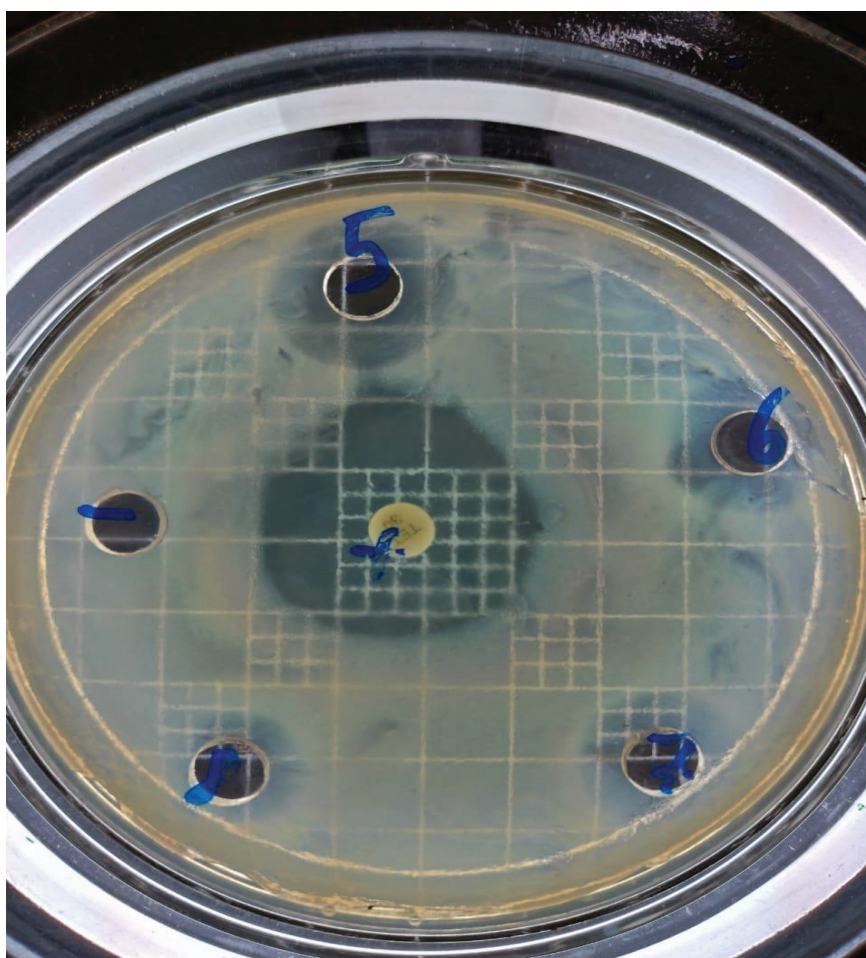
Extrato	Bactéria isolada no tempo zero	Bactéria isolada no tempo quatorze a 4° C
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1,16 ^b ±0,12	1,0 ^a ±0,09
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0 ^a ±0	0,36 ^b ±0,51
<i>Lactobacillus lactis</i>	0, ^a ±0	0,66 ^a ±0,47
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,1 ^b ±0,1	0,70 ^a ±0,49
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1,83 ^c ±0,12	1,43 ^a ±0,23
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0 ^a ±0	0 ^b
<i>Lactobacillus lactis</i>	0 ^a ±0	0,70 ^a ±0,49

<i>Lactobacillus paracasei</i>	0 ^a ± 0	0,66 ^a ± 0,47
Controle positivo	3,86 ^d ± 0,09	4,00 ^c ± 0,08
Controle negativo	0	0

O extrato do *Lactobacillus salivarius* apresentou o maior halo de inibição (FIGURA 8) frente às bactérias isoladas no tempo zero e no tempo quatorze, demonstrando um grande potencial para a utilização como agente de inibição de bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Em um estudo semelhante, as bacteriocinas de *Lb. salivarius* (salivaricinas) demonstraram uma atividade antimicrobiana maior do que a do extrato bruto frente à *Pseudomonas aeruginosa*, sendo termo resistente e ativa em uma ampla faixa de pH, classificando-se no grupo II – bacteriocinas termoestáveis pequenas, com peso molecular <10 kDa (MAHDI et al., 2019).

Figura 8 - Teste de sensibilidade antimicrobiano frente às bactérias psicrotróficas isoladas do filé do pescado, detalhando a técnica de ágar difusão em poços contendo o extrato bruto da bacteriocina e evidenciando os halos de inibição em comparação com o controle



Fonte: elaborada pelo autor

Os extratos do *Lactobacillus reuteri* e do *Lactobacillus plantarum* apresentaram um halo menor e sem diferença significativa entre si frente às bactérias isoladas do tempo quatorze, contudo, os resultados dos testes bioquímicos apontaram que os microrganismos são muito parecidos, fazendo com que esses dois extratos fiquem como segunda opção para a etapa III.

Acredita-se que a inibição menor apresentada pelas bacteriocinas dos outros microrganismos testados frente às bactérias isoladas do tempo quatorze se deve a bacteriocinas de menor ação e à formação de metabólitos antagônicos, como o ácido láctico. O ácido láctico tende a diminuir o pH do meio, sendo suficiente para inibir o crescimento de muitos organismos (PALLERONI, 2015; DUARTE et al, 2013).

Para a avaliação da semi purificação, a bacteriocina bruta do *Lactobacillus salivarius*, após o processo de ultrafiltração, foi avaliada frente à *Pseudomonas* spp. isolada do pescado, resultando em um halo de $1,33 \pm 0,1$ cm para o conteúdo permeado e de $0,33 \pm 0,03$ cm para o conteúdo retido,, indicando que o tamanho da bacteriocina inferior ao corte da membrana, possibilitando a passagem do composto, porém algumas bacteriocinas encontram-se em estado natural como moléculas de alta massa molecular, formando agregados de 90-300 kDa. Esses agregados podem mascarar parcial ou totalmente a atividade antimicrobiana da bacteriocina e também induzir a erros na determinação de seu peso molecular. Isso ocorre principalmente nas bacteriocinas de baixo peso molecular, apolares, que interagem facilmente com o material extracelular de células lisadas durante o processo de extração podendo ser eliminados por extração com metanol-clorofórmio ou por etanol-dietil-éter (MURIANA; KLAENHAMMER, 1991; CONTRERAS et al., 1997).

3.3.3 ETAPA III: APLICAÇÃO NA MATRIZ CÁRNEA E AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA

Nesta etapa o microrganismo com maior halo de inibição (*Lactobacillus salivarius*) foi utilizado para a fermentação do soro de leite com o objetivo de obter maiores quantidades de bacteriocina para aplicação no filé de tilápia e avaliar se houve impacto na vida de prateleira.

3.3.3.1 AUMENTO DA ESCALA DE PRODUÇÃO EM SORO DE LEITE, EXTRAÇÃO E SEMIPURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO

Após 72 horas de fermentação observou-se o aumento da turbidez do meio de cultura, caracterizando a multiplicação microbiana. Além disso, o pH baixou de 6,0 para 5,2, processo característico da fermentação, ocasionado pela liberação de ácido lático pelos lactobacilos durante a fermentação do meio de cultura (MESTRES et al. 2019).

3.3.3.2 AVALIAÇÃO DO IMPACTO NA VIDA DE PRATELEIRA DO FILÉ

3.3.3.2.1 Atividade de água

A atividade de água das amostras de imersão apresentou um leve aumento com 4 segundos de imersão e um aumento significativo com 6 segundos de imersão (TABELA 4)

Tabela 4 Atividade de água inicial do filé de pescado nos diferentes tempos de imersão e na amostra controle (sem imersão)

Amostra	aW
Imersão 2s	0,9841 ±0,002
Imersão 4s	0,9849 ±0,005
Imersão 6s	0,9859 ±0,003
Aspersão 0,4mL	0,9840 ±0,002
Aspersão 0,6mL	0,9841 ±0,001
Aspersão 0,9mL	0,9843 ±0,003
Controle	0,9840 ±0,005

Com as mesmas quantidades de composto, porém aspergido, a atividade de água se manteve estável, aumentando levemente com o aumento da quantidade borrifada, indicando que a forma de aplicação por aspersão exerce menor impacto no aumento da atividade de água em comparação com o método de imersão. O aumento da atividade de água proporciona o aumento da multiplicação dos micro-organismos, tendo efeito principalmente na fase de crescimento exponencial (log), sendo assim, o método de aspersão fornece mais segurança no aspecto da multiplicação bacteriana.

3.3.3.2.2 pH

O pH se manteve estável durante os experimentos, demonstrando que o filé se manteve dentro do pH 7 até o 8º dia para os métodos de imersão (QUADRO 3).

Quadro 5 Resultados da aferição do pH em todos os tratamentos e no grupo controle durante o período de 12 dias.

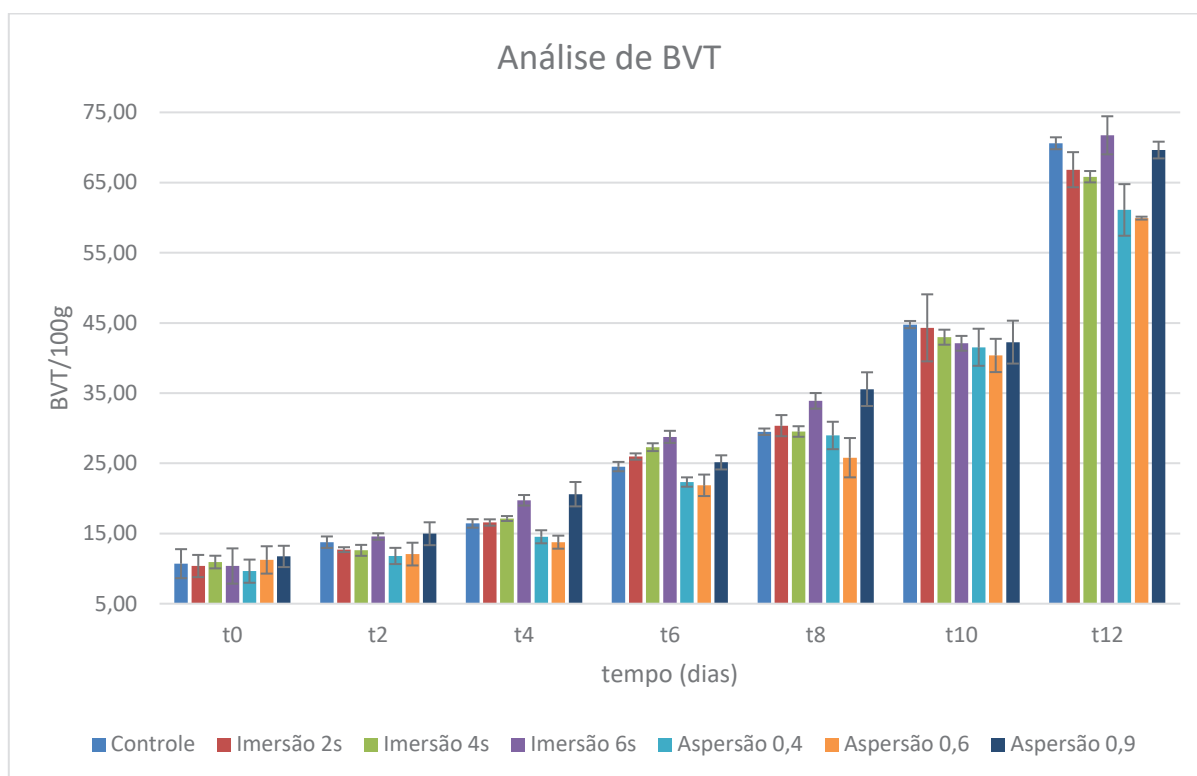
Tempo	0	2	4	6	8	10	12
Controle	6,27±0,05 ^a	6,33±0,05 ^b	6,47±0,11 ^c	6,73±0,12 ^d	6,93±0,05 ^e	7,10±0,1 ^f	7,10±0,1 ^g
Imersão 2	6,27±0,05 ^a	6,27±0,05 ^b	6,33±0,05 ^c	6,57±0,06 ^d	6,93±0,05 ^e	7,17±0,05 ^f	7,15±0,07 ^g
Imersão 4	6,27±0,05 ^a	6,30±0,01 ^b	6,33±0,05 ^c	6,57±0,06 ^d	6,97±0,05 ^e	7,10±0,01 ^f	7,13±0,05 ^g
Imersão 6	6,27±0,05 ^a	6,33±0,05 ^b	6,40±0,1 ^c	6,73±0,06 ^d	6,97±0,05 ^e	7,03±0,05 ^f	7,17±0,11 ^g
Aspersão 0,4	6,20±0,1 ^a	6,27±0,05 ^b	6,30±0,2 ^c	6,53±0,31 ^d	6,90±0,3 ^e	7,20±0,1 ^f	7,23±0,11 ^g
Aspersão 0,6	6,20±0,17 ^a	6,40±0,17 ^b	6,63±0,2 ^c	6,73±0,06 ^d	7,20±0,2 ^e	7,17±0,2 ^f	7,27±0,35 ^g
Aspersão 0,9	6,27±0,28 ^a	6,37±0,32 ^b	6,63±0,15 ^c	6,73±0,35 ^d	7,10±0,36 ^e	7,23±0,3 ^f	7,33±0,30 ^g

O pH da carne de peixes frescos é um parâmetro que fornece informações sobre o estado de conservação do pescado, uma vez que o processo de deterioração altera os níveis de pH devido à decomposição de aminoácidos, porém o uso desta análise deve ser feito em conjunto com outros parâmetros para determinar o frescor do pescado (ANDRÉS-BELLO et al., 2013).

3.3.3.2.3 Bases voláteis totais

As BVTs, durante o experimento no tratamento por imersão, se mantiveram estáveis, alcançando o limite de 30mg / 100g em torno do oitavo dia (FIGURA 10).

Figura 9 Gráfico de barras do comportamento das bases voláteis totais durante 12 dias de armazenamento



Porém, no tratamento por aspersão, nota-se uma diminuição para o tratamento com 0,4 ml e um melhor resultado com a aspersão de 0,6 ml de extrato, fazendo com que o limite de BVT's do filé seja alcançado entre o dia 9 e 10 de refrigeração.

Existem diferentes recomendações de limites BVT's para o frescor das carnes de diferentes espécies, principalmente para peixes e frutos do mar e, portanto, inadequados para outros tipos de carne, são espécies específicas, arbitrários ou têm um elemento de ambiguidade (por exemplo, uma classificação intermediária "obsoleta" entre os estados fresco e estragado), portanto, a definição de limites BVT's pode introduzir imprecisão e subjetividade na avaliação do frescor da carne (BEKHIT et al. 2021).

3.3.3.2.4 Contagem microbiana

Durante a avaliação da vida de prateleira, pode-se perceber que a utilização do extrato contendo bacteriocina do *Lactobacillus salivarius* diminuiu a contaminação inicial, principalmente no método de imersão por 6 segundos (TABELA 5).

Tabela 5 Resultados de contagem inicial, duração da fase lag, velocidade máxima de crescimento e contagem final obtidos através da plataforma Combase®

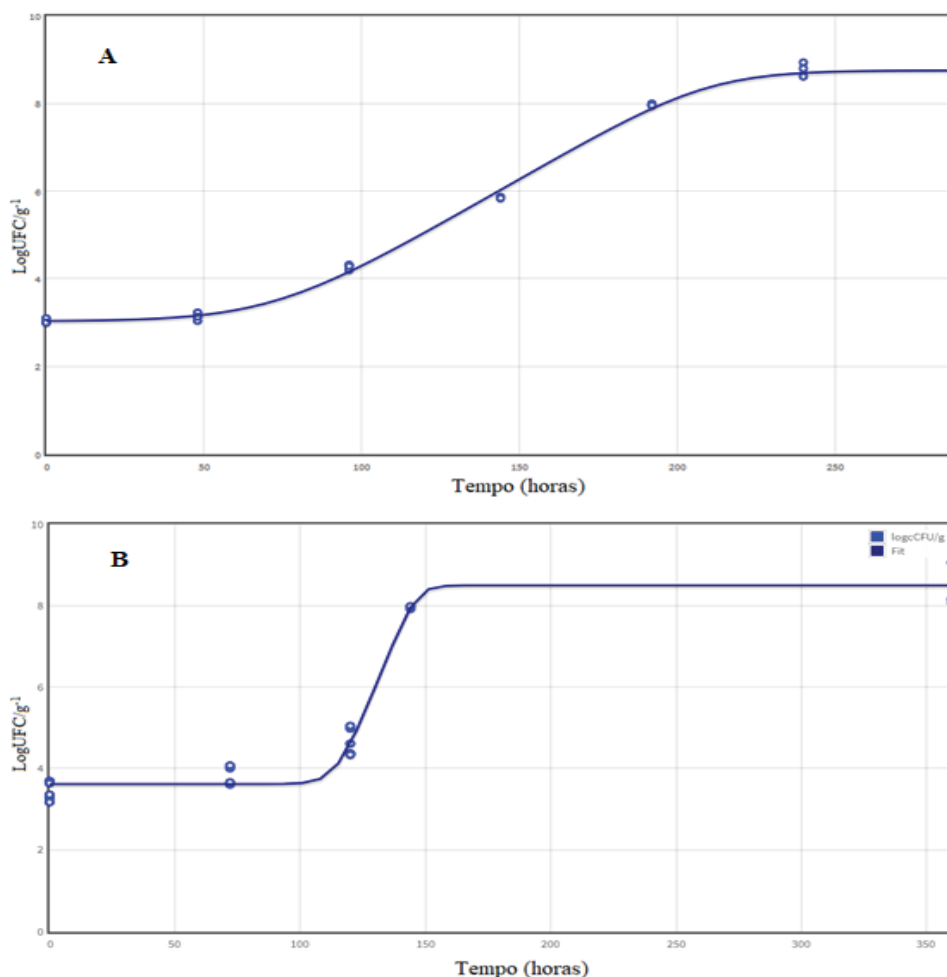
	Controle	2s Imersão	0,4ml Aspersão	4s Imersão	0,6ml Aspersão	6s Imersão	0,9ml Aspersão
Contagem inicial (LogUFC/g)	3.6 ± 0.111	3.545 ± 0.074	3,480 ± 0,188	3.0601 ± 0.138	3,180 ± 0,144	2.798 ± 0.085	3,230 ± 0,100
Duração da Fase Lag (h)	114.55 ± 1.84	74.139 ± 3.223	75.806 ± 3.560	69.806 ± 5.333	82.312 ± 4.711	62.965 ± 2.998	71.343 ± 2.360
Vel. Máx. de Cresc. (LogUFC/g/h)	0.154 ± 0.0176	0.04 ± 0.00134	0.0390 ± 0.00205	0.0417 ± 0.00114	0.0370 ± 0.00402	0.046 ± 0.00246	0.0410 ± 0.00273
Contagem final (LogUFC/g)	8,498 ± 0,157	8,856 ± 0,0519	8,966 ± 0,0475	8,741 ± 0,0876	8,7860 ± 0,0775	8,922 ± 0,0504	8,9860 ± 0,0572

Porém, ao observar a duração da fase Lag, nota-se que o aumento da atividade de água proporcionada pelos métodos de aplicação teve relação negativa com o período em que o microrganismo se adapta ao meio, fazendo com que a fase Lag terminasse mais cedo, principalmente no método de imersão por 6s, onde o filé tem mais contato com o extrato e absorve mais água durante esse período.

O contrário foi observado nos casos de aspersão, porém com a observação de um limite, pois quando se aumenta de 0,4 para 0,6mls a atividade de água não aumenta expressivamente, porém ao aspergir 0,9mls o filé absorve mais água e isso reflete na diminuição da fase lag.

Contudo, ambos métodos de aplicação apresentaram uma redução da velocidade máxima de crescimento dos microrganismos, fazendo com que a curva de crescimento fosse “achatada” (FIGURA 10 A) em comparação com os dados obtidos do controle (FIGURA 10 B).

Figura 10 curva de crescimento do método de aspersão 0,4 ml (A) e do controle (B)



Fonte: elaborada pelo autor, plataforma COMBASE®.

Este “achatamento” da curva fez com que o limite previsto em legislações internacionais de 10^7 UFC.g⁻¹ (ICMSF, 1986) fosse alcançado em diferentes tempos (TABELA 6).

Tabela 6 Tempo necessário para os métodos de aplicação e o controle atingirem o limite estabelecido pela legislação

MÉTODO	TEMPO (h)
Controle	137,251
Imersão 2s	174,933
Imersão 4s	167,865
Imersão 6s	152,173
Aspersão 0,4ml	179,487
Aspersão 0,6ml	189,202
Aspersão 0,9ml	170,731

Fonte: elaborada pelo autor, plataforma COMBASE®.

Todos os tratamentos demonstraram um impacto positivo no aumento do tempo necessário para alcançar o limite da legislação, comprovando a eficácia das bacteriocinas de *L. salivarius* na inibição da multiplicação das *Pseudomonas* spp.. Nesse sentido destaca-se o método de aspersão de 0,6ml, que aumentou em 51,938 horas este tempo.

3.4 CONCLUSÃO

A contaminação inicial do pescado foi alta, demonstrando falhas durante o processo de despesca, abate ou filetagem, impactando no tempo de vida útil do filé resfriado, que foi de menos de 5 dias a 4° C.

Além disso, o isolamento das bactérias presentes durante o processo de deterioração revelou que possivelmente um gênero de bactérias é responsável pela deterioração, e que este se encontra tanto no tempo inicial quanto no tempo final. Pelo resultado dos testes bioquímicos é possível afirmar que o gênero mais compatível é a *Pseudomonas*, bactéria que degrada facilmente a fração de NNP, transformando a em amônia e refletindo no aumento das BVT.

Já na etapa II da pesquisa, é possível concluir que a bacteriocina, juntamente com os compostos produzidos pelo *Lb. salivarius* exerceu a maior inibição frente às bactérias psicrotróficas em comparação com as outras sete BALs.

Na etapa III o método de aspersão demonstrou maior eficácia na comparação com o método de imersão, porém são necessários mais estudos para diminuir o impacto do aumento da atividade de água na matriz cárnea.

4 CONCLUSÃO

A avaliação do frescor do filé de pescado depende de muitos fatores, que, sozinhos não são capazes de indicar com precisão a real condição do pescado, porém quando combinados nos permite uma melhor avaliação sobre o processo de preservação do alimento.

A aplicação por aspersão e por imersão de bacteriocinas semipurificadas de *Lactobacillus salivarius* em filé de pescado fresco resulta no aumento da vida de prateleira desde alimento, sendo o método de aspersão de 0,6mls de extrato o que melhor respondeu, diminuindo a velocidade de crescimento e conseqüentemente aumentando em 51, 938 horas o tempo de conservação do filé resfriado.

Tradicionalmente, vários fatores têm sido usados para determinar o frescor do pescado, incluindo inspeção visual da cor e brilho das guelras, pele cor e textura, cor, cheiro e textura da carne. As tentativas de controlar o crescimento da microbiota causadora de deterioração foram, durante muito tempo, fundamentalmente centradas, além da ação de frio, sobre o uso de atmosferas modificadas. No entanto, esta tecnologia não foi amplamente implementada, pois envolve uma significativa mudança nos navios pesqueiros e nos pontos de despesca que pode restringir sua eficácia e prejudicar a capacidade de pesca. Por disso, a tecnologia de biopreservação, que se refere à extensão e melhoria do prazo de validade usando microorganismos e/ou seus metabólitos, surge como uma alternativa interessante e econômica quando combinada a utilização de refrigeração ou embalagens à vácuo.

Contudo, mais estudos acerca da aplicação dos compostos se fazem necessários, para entender os mecanismos de ação; os mecanismos limitadores da matriz cárnea, tendo em vista a complexidade da composição deste alimento; a utilização da bacteriocina em seu estado purificado; o efeito da combinação da biopreservação com outros métodos tradicionais, levando a um método mais eficiente e menos agressivo de conservação dos filés de tilápia resfriados, preservando suas características organolépticas e permitindo uma melhor eficácia em sua logística.

5 REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-SIEIRO, P., MONTALBÁN-LÓPEZ, M., MU, D., & KUIPERS, O. P.. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100(7), 2939-2951. 2016.
- ARAUJO, D.A.F.V., SOARES, K.M.P. e GOIS, V.A. Características gerais, processos de deterioração e conservação do pescado. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 9, ed. 114, art. 771, 2010.
- AUBOURG S.P., LAGO H., SAYAR N., GONZÁLES R.. Lipid damage during frozen storage of Gadiform species captured in different seasons. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, ed. 6, p. 608-616, 2007.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, Elsevier, v. 23, p. 277-294, 1994.
- BARBOSA, M.S.; JURKIEWICZ, C.; LANDGRAF, M.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B. D. G. M., Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, biosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 2a in foods during storage at 4 °C: Tests in food models, **LWT - Food Science and Technology**, Elsevier, n. 95, p. 167-171, 2018.
- BARRIAS, F. J. J. T., **Tecnologias de Produção de Frio: Estudo e Análise de Soluções Técnico-econômicas**. Tese (Mestrado em Engenharia Eletrotécnica - Sistemas Elétricos de Energia), Departamento de Engenharia Eletrotécnica do Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto/Portugal, 2015.
- BEKHIT A. E. A., HOLMAN, B. W. B., GITERU S. G., HOPKINS D. L., Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review, **Trends in Food Science & Technology**, Elsevier, v. 109, p. 280-4302. 2021.
- BRASIL, 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da União**, Brasília/DF, 29 mar. 2017.
- BRASIL, **Pesquisa da Pecuária Municipal – PPM**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf Acesso em 18/02/2020
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 101, DE 11 DE AGOSTO DE 1993: Aprovar e oficializar os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos, **Diário Oficial da União**, Brasília/DF, 11 ago. 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 1, DE 07 DE OUTUBRO DE 1981: Aprova os Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, constituindo-se em Métodos Microbiológicos e Métodos Físicos e Químicos, **Diário Oficial da União**, Brasília/DF, 07 out. 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília/DF, 02 jan. 2001.

CAO R.; LIU Q.; YIN B.; WU B., Chitosan Extends the Shelf-life of Filleted Tilapia (*Oreochromis niloticus*) During Refrigerated Storage, **Journal of Ocean University of China**, Science Press, n. 11, ed. 3, p. 408–412, 2012.

CHAHAD, O. B., EL BOUR, M., CALO-MATA, P., BOUDABOUS, A., BARROZ-VELÁZQUEZ, J.. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. **Research in Microbiology**. Elsevier, n. 163, p. 44-54, 2012.

CHANG, S.Y.; CHEN, Y.S.; PAN, S.F.; LEE, Y.S.; CHANG, C.H.; CHANG, C.H.; YU, B.; WU, H.C., Enterocin TW21, a novel bacteriocin from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821, **Journal of Applied Microbiology**, Wiley Online Library n.115, ed. 3, p. 673–678, 2013.

CHAVASIT, V., PHOTI, J., PURTTIPONTHANEE, S., SAEKOO, P. Chapter 11 - Use of Bacterial Growth Curve for Assessing Risk of Microbiological Pathogens in Food Products, in: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. (Ed). **Handbook of Food Bioengineering**, Elsevier, v. 10, p. 341-365, 2018.

COMI, G., Spoilage of Meat and Fish, In: BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M., The Microbiological Quality of Food, Woodhead Publishing Series in Food Science, **Technology and Nutrition**, Elsevier, 2017, ed. 1, c. 8. p. 179-210.

COMI, G.; IACUMIN, L., Meat and fish products. In: GOBETTI, G., VINCENZINI, M., FARRIS, G.A., NEVIANI, E., **Microbiologia dei prodotti alimentari**. Editora Ambrosiana, Milano, Itália, 2012, ed. 1, c. 8, p. 153-195.

DE LIMA, E. L. C.; FERNANDES, J. M.; CARDARELLI, H. R.. Optimized fermentation of goat cheese whey with *Lactococcus lactis* for production of antilisterial bacteriocin-like substances, **LWT - Food Science and Technology**, Elsevier, v. 84, p. 710-716, 2017.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E.. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Wiley, ed. 23, c. 1, p. 130-135, 1960.

DRECHSEL, M. M; SCHWAB, S.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I., biossíntese e atividade de bacteriocinas, e mecanismos bacterianos de autoimunidade. In: SBM, Sociedade Brasileira de Microbiologia, **Microbiologia in foco**. Vox Editora, São Paulo, Brasil, ano 4, p. 11-16, 2011.

Duarte MCKH, Cortez NM dos S, Cortez AS, Franco RM. **Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. 9(16):25-36. 2013.

DUARTE, F. O. S., **Caracterização da carne da tilápia do nilo (*oreochromis niloticus*) submetida a dietas suplementadas com óleo de peixe**. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, 2017.

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

FAO. 2018. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>, Acesso em: 21/05/2019

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme: **Oreochromis niloticus**. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online], 2005. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en. Acesso em: 30/10/2018.

FERNANDEZ, B., VIMONT, A., DESFOSSÉS-FOUCAULT, É., DAGA, M., ARORA, G., & FLISS, I. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. **Food Control**, 78, 350-356. 2017.

FOGARTY C., WHYTE P., BRUNTON N., LYNG J. SMYTH C., FAGAN J., BOLTON D.. Spoilage indicator bacteria in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored on ice for 10 days. **Food Microbiology**, Elsevier, v. 77, p. 38-42, 2019.

GAO, Y.; LI B.; LI, D.; ZHANG, L., Purification and characteristics of a novel bacteriocina produced by *Enterococcus faecalis* L11 isolated from Chinese traditional fermented cucumber, **Biotechnological Letters**, Springer, n. 38, ed.5, p. 871–876, 2016.

GE, J.; SUN, Y.; XIN, X.; WANG, Y.; PING, W., Purification and partial characterization of a novel bacteriocin synthesized by *Lactobacillus paracasei* HD1-7 isolated from Chinese sauerkraut juice, **Scientific Reports**. n. 6, p. 19366, 2016.

GUI, M.; ZHAO, B.; SONG, J.; ZHANG, Z.; PENG, Z.; LI, P., Application as a Biopreservative Agent on Quality and Shelf Life of Rainbow Trout Fillets Stored at 4 °C, *Applied biochemistry and biotechnology*, Springer, v. 174, p. 2295-2306, 2014.

HALIMI, B.; DORTU, C.; ARGUELLES-ARIAS, A.; THONART, P.; JORIS, B.; FICKERS, P., Antilisterial Activity on Poultry Meat of Amylolysin, a Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1, **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, Springer, v. 2, p. 120-125, 2010.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C., *Lactobacillus*. In: WHITMAN, W. B.; *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. **John Wiley & Sons Bergey's Manual Trust**, Nova Jersey/EUA, p. 1-76, 2015.

HELLER, H.M., TORTORA, G., BURGER, H.. *Pseudomonas putrefaciens* bacteremia associated with shellfish contact, **The American Journal of Medicine**, n. 88, v. 1, p. 85-86, 1990.

HOWGATE, P., A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*.v.9 ed.1 p. 58-88, 2010.

HUIS IN'T VELD, J.H.J., Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, n. 33, ed. 1, p. 1-18, 1996.

IBRAHIM, S. M. & DESOUKY, S. G., Effect of Antimicrobial Metabolites Produced by Lactic Acid Bacteria (Lab) on Quality Aspects of Frozen Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillets, *World Journal of Fish and Marine Sciences*, **IDOSI Publications**, v. 1, ed. 1, p. 40-45, 2009.

ICMSF , The International Commission On Microbiological Specifications For Foods. *Microorganisms in foods: sampling for microbiological analysis: principles and scientific applications*. 2. ed. New York: **Blackwell Scientific Publications**, 1986.

KAKTCHAM, P. M.; KOUAM, E. M. F.; TIENTCHEU, M. L. T.; TEMGOUA, J-B.; WACHER, C.; NGOUFACK, F. Z.; PÉREZ-CHABELA, M. L.. Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2MT isolated from freshwater Nile tilapia in Cameroon: Bacteriocin screening, characterization, and optimization in a low-cost medium, **LWT - Food Science and Technology**, Elsevier, v. 107, p. 272-279, 2019.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, n.150, p.10-23, 2015.

LV, X.; DU, J.; JIE, Y.; ZHANG, B.; BAI, F.; ZHAO, H.; LI, J., Purification and antibacterial mechanism of fish-borne bacteriocin and its application in shrimp (*Penaeus vannamei*) for inhibiting *Vibrio parahaemolyticus*, **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Springer, n. 33, p. 156, 2017.

MACÉ, S., CORNET, J., CHEVALIER, F., CARDINAL, M., PILET, M. F., DOUSSET, X., JOFFRAUD, J. J., Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE. **Food Microbiology**, Elsevier, n. 30, p. 164–172, 2012.

MAHDI, L. H., JABBAR, H. S., AUDA, I. G.. Antibacterial immunomodulatory and antibiofilm triple effect of Salivaricin LHM against *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection model, **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier, v. 134, p. 1132-1144. 2019.

MALDONADO-BARRAGÁN, A.; CABALLERO-GUERRERO, B.; MARTÍN, V.; RUIZ-BARBA, J.L.; RODRÍGUEZ, J.M., Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel coculture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman, **BMC Microbiology**, n. 16, ed.1, p. 37, 2016.

MENOUSEK, J., MISHRA, B., HANKE, M. L., HEIM, C. E., KIELIAN, T., & WANG, G.. Database screening and *in vivo* efficacy of antimicrobial peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 39(5), 402-406. 2012.

MESTRES, C.; MUNANGA, B. J. C.; GRABULOS, J.; LOISEAU, G.. Modeling mixed fermentation of gowé using selected *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kluyveri* strains, **Food Microbiology**, Elsevier, v. 84, a. 103242, 2019.

NODA, M.; MIYAUCHI, R.; DANSHITSOODOL, N.; HIGASHIKAWA, F.; KUMAGAI T.; MATOBA, Y.; SUGIYAMA, M., Characterization and mutational analysis of a two-

polypeptide bacteriocin produced by Citrus iyo-derived *Lactobacillus brevis* 174A, **Biological and Pharmaceutic Bulletin**, J-Stage, n. 38, ed.12, p. 1902–1909, 2015.

O'CONNOR, P. M., ROSS, R. P., HILL, C., & COTTER, P. D.. Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. **Current Opinion in Food Science**, 2, 51-57. 2015.

OLIVEIRA, R.C.; BERNARDI, J.V.E.; WANDERLEY, R.; ALMEIDA, R.; MANZATTO, A.G., Fish consumption by traditional subsistence villagers of the Rio Madeira (Amazon): impact on hair mercury. **Annals of Human Biology, Informa Healthcare**, n. 37, p. 629–642, 2010.

PACQUIT A., FRISBY J., DIAMOND D., LAU K. T., FARRELL A., QUILTY B., DIAMOND, D.. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. **Food Chemistry**, Elsevier, v. 102, ed. 2, p. 466-470, 2007.

PALLERONI, N.J. Pseudomonas. In: Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. **John Wiley & Sons**, Bergey's Manual Trust; 2015.

PARLAPANI, F.F., BOZIARIS, I.S.. Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures. **LWT - Food and Science Technology**. Elsevier, v. 66, p. 553–559 2016.

RANI, R.P.; ANANDHARAJ, M.; HEMA, S.; DEEPIKA, R.; RAVINDRAN, A.D., Purification of antilisterial peptide (Subtilosin A) from novel *Bacillus tequilensis* FR9 and demonstrate their pathogen invasion protection ability using human carcinoma cell line, **Frontiers in Microbiology**, n. 7, p. 1910, 2016.

SABO. S. S.; CONVERTI A.; ICHIWAKI, S.; OLIVEIRA, R. P. S.. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations, **Journal of Dairy Science**, Elsevier, v. 102, p. 87-99, 2019.

SAHOO, T. K.; JENA, P. K.; PRAJAPATI, B.; GEHLOT, L.; PATEL, A. K.; SESHADRI, S., In Vivo Assessment of Immunogenicity and Toxicity of the Bacteriocin TSU4 in BALB/c Mice, **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, Springer, n. 9, p. 345-354, 2017

SAHOO, T.K.; JENA, P.K.; PATEL, A.K.; SESHADRI, S., Purification and molecular characterization of the novel highly potent bacteriocin TSU4 produced by *Lactobacillus animalis* TSU4, **Applied biochemistry and biotechnology**, Springer, n. 177, ed. 1, p. 90–104, 2015.

SARIKA, A. R.; LIPTON, A. P.; AISHWARYA, M. S.; DHIVYA, R. S., Isolation of a Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* and Application of Its Bacteriocin to Manage Spoilage Bacteria in High-Value Marine Fish Under Different Storage Temperatures, **Applied biochemistry and biotechnology**, Springer, v. 167, p. 1280-1289, 2012.

SCHELEGUEDA, L. I.; VALLEJO, M.; GLIEMMO, M. F.; MARGUET, E. R.; CAMPOS C. A., Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*, **LWT - Food Science and Technology**, Elsevier, n. 64, p. 794-801, 2015.

- SONG, D.F.; ZHU M.Y.; GU, Q., Purification and characterization of Plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5, **Plos One**, n. 9, ed.8, p. 105549, 2014.
- STANBOROUGH, T. B, FEGANA, N., POWELL, S. M., SINGHA, T., TAMPLIN, M., CHANDRYA, S. P.. Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**, Elsevier, n. 265, p.61-72
- SUGAWARA E., NIKAIDO, H.. Properties of AdeABC and AdeIJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii* compared with those of the AcrAB-TolC system of *Escherichia coli* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 58 v.12 p. 7250-7257, 2014.
- VENEMA, K., CHIKINDAS, M. L., SEEGER, J. F. M. L., HAANDRIKMAN, A. J., LEENHOUTS, K. J., VENEMA, G., KOK, J., Paid and efficient purification methods for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **American Society for Microbiology**, n. 63, p. 305-309, 1997.
- VERA, E. C. S.; AZEVEDO, P. O. S.; DOMÍNGUEZ, J. M.; OLIVEIRA, R. P. S.. Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier, v. 133, p. 168-178, 2018.
- VICENTE, I. S. T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C. E., Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil, **Revista de Ciências Agrárias**, Scielo Portugal, v.37 n.4, 2014.
- WAYAH S. B., PHILIP K.. Purification, characterization, mode of action, and enhanced production of Salivaricin mmaye1, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* SPW1 of human gut origin. **Electronic Journal of Biotechnology** 35. 2018.
- WORAPRAYOTE, W.; PUMPUANG, L. A.; TOSUKHOWONG, A.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W., Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets, **LWT - Food Science and Technology**, Elsevier, n. 89, p. 427-433, 2018
- YI, L.; DANG, Y.; WU, J.; ZHANG, L.; LIU, X.; LIU, B.; ZHOU, Y.; LU, X., Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang, China, **Journal of Dairy Science**, Elsevier, n. 99 ed. 9, p. 7002–7015, 2016.
- ZOU, J., JIANG, H., CHENG, H., FANG, J., & HUANG, G.. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 117, 781-789. 2018.

**APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA RESEARCH,
SOCIETY AND DEVELOPMENT**

Research, Society and Development, v. 9, n. 8, e998986666, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.6666>

Biopreservação de alimentos utilizando antimicrobianos de bactérias ácido-láticas

Food biopreservation using antimicrobials produced by lactic acid bacteria

Bioconservación de alimentos utilizando antimicrobianos de bacterias ácido lácticas

Recebido: 13/07/2020 | Revisado: 20/07/2020 | Aceito: 28/07/2020 | Publicado: 06/08/2020

Lariane Strack

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5008-6701>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: laristrack@hotmail.com

Rodrigo Cavalheiro Carli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0409-2024>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: 175534@upf.br

Raíssa Vieira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3397-5440>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: 166370@upf.br

Kátia Bitencourt Sartor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6141-9225>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: 166367@upf.br

Luciane Maria Colla

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9745-4452>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: lmcolla@upf.br

Christian Oliveira Reinehr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4710-3635>

Universidade de Passo Fundo, Brasil

E-mail: reinehr@upf.br

Resumo

Há uma crescente demanda dos consumidores por alimentos naturais, sendo de grande interesse desenvolver e produzir substâncias naturais e eficazes para a conservação de alimentos, que

substituíam os conservantes sintéticos. O crescimento de bactérias pode ocorrer nos alimentos devido às condições ambientais durante o manuseio e armazenamento, mesmo que tenham sido observadas as boas práticas de fabricação. Isto pode ocasionar perdas para a indústria, tornando-se também um risco de contaminação ao consumidor, havendo a necessidade de desenvolver novas técnicas de controle dessas fontes de contaminação. As bactérias ácido-láticas são conhecidas por seus benefícios aos organismos de quem os consome e pela capacidade de produzir, em condições adequadas, compostos antimicrobianos naturais, os quais podem ser utilizados como bioconservadores nos alimentos e contribuir para o aumento da sua vida de prateleira. As bacteriocinas são proteínas ou peptídios produzidos nos ribossomos que possuem capacidade de agir contra determinados patógenos, evitando sua multiplicação nos produtos durante os períodos de armazenamento e distribuição. O objetivo desta revisão é apresentar os principais microrganismos produtores de bacteriocinas, as formas de produção, bem como as técnicas pelas quais esses bioprodutos têm sido aplicados na biopreservação de produtos alimentícios e os resultados obtidos. A biopreservação por bacteriocinas vem sendo estudada e estabelecida como um novo e importante método, entretanto é necessária a busca por processos de produção dessas bacteriocinas em maior escala e com redução do custo, para que cada vez mais seu potencial possa ser explorado pela ciência e pela indústria. Estudos relacionados aos mecanismos de ação e às aplicações em alimentos são também necessários, a fim de subsidiar as decisões das agências reguladoras.

Palavras-chave: Bacteriocinas; Conservação; Probióticos.

Abstract

There is a growing consumer demand for natural foods, and it is of great interest to develop and produce natural and effective substances for food preservation, replacing synthetic preservatives. The growth of bacteria can occur in food due to environmental conditions during handling and storage, even if good manufacturing practices have been observed. This can cause losses for the industry, also becoming a risk of contamination to the consumer, being necessary to develop new techniques for controlling these sources of contamination. Lactic acid bacteria are known for their benefits to the organisms of those who consume them and for the ability to produce, under appropriate conditions, natural antimicrobial compounds, which can be used as biopreservatives in food and contribute to the increase of shelf life. Bacteriocins are proteins or peptides produced in ribosomes that have the capacity to act against certain pathogens, preventing their multiplication in products during the periods of storage and distribution. The aim of this review is to present the main bacteriocin-producing microorganisms, the forms of

production, as well as the techniques by which these bioproducts have been applied in the biopreservation of food products and the results obtained. Biopreservation using bacteriocins has been studied and established as a new and important method, however it is necessary to search for production processes of these bacteriocins on a larger scale and with cost reduction, so that their potential can be increasingly explored by science and industry. Studies related to mechanisms of action and applications in food are also necessary in order to support the decisions of regulatory agencies.

Keywords: Bacteriocins; Preservation; Probiotics.

Resumen

Existe una creciente demanda de los consumidores de alimentos naturales, y es de gran interés desarrollar y producir sustancias naturales y efectivas para la conservación de alimentos, que reemplacen a los conservantes sintéticos. El crecimiento de bacterias puede ocurrir en los alimentos debido a las condiciones ambientales durante la manipulación y el almacenamiento, incluso si se han observado buenas prácticas de fabricación. Esto puede causar pérdidas para la industria, y también convertirse en un riesgo de contaminación para el consumidor, con la necesidad de desarrollar nuevas técnicas para controlar estas fuentes de contaminación. Las bacterias del ácido láctico son conocidas por sus beneficios para los organismos de quienes las consumen y por su capacidad para producir, en condiciones apropiadas, compuestos antimicrobianos naturales, que pueden usarse como bioconservadores en los alimentos y contribuyen al aumento de la vida útil de los productos. Las bacteriocinas son proteínas o péptidos producidos en los ribosomas que tienen la capacidad de actuar contra ciertos patógenos, evitando su multiplicación en productos durante los períodos de almacenamiento y distribución. El propósito de esta revisión es presentar los principales microorganismos productores de bacteriocinas, las formas de producción, así como las técnicas por las cuales estos bioproductos se han aplicado en la bioconservación de productos alimenticios y los resultados obtenidos. La biopreservación con bacteriocinas se ha estudiado y establecido como un método nuevo e importante, sin embargo, es necesario buscar procesos de producción de estas bacteriocinas a mayor escala y con reducción de costos, de modo que su potencial pueda ser explorado cada vez más por la ciencia y la industria. Los estudios relacionados con los mecanismos de acción y las aplicaciones en los alimentos también son necesarios para apoyar las decisiones de las agencias reguladoras.

Palabras clave: Bacteriocinas; Conservación; Probióticos.

ANEXO A – TESTES BIOQUÍMICOS

I. Coloração de Gram.

O esfregaço foi preparado a partir de uma colônia bacteriana suspensa em água estéril. Após fixação do esfregaço em chama, este foi corado com a solução de violeta genciana fenicada por um minuto, escorrendo ao final sem lavar; e a seguir cobriu a lâmina com lugol fraco e esperou atuar por um minuto; lavou-se com solução descorante (à base de álcool-acetona) até que o líquido se tornou incolor (15 – 30 segundos); lavou em água corrente e cobriu a lâmina com fuscina para Gram, deixando atuar por 30 – 60 segundos e, por fim, lavamos com água corrente, deixando secar na posição vertical, observando ao microscópio, com o uso da objetiva de imersão (100x de aumento total).

Interpretação dos resultados:

Bactérias Gram negativas – As células apresentam coloração de tonalidade avermelhada.

Bactérias Gram positivas – As células apresentam coloração púrpura escura.

II. Motilidade no meio SIM, Teste de produção de Indol e H₂S

O teste de motilidade foi realizado em um meio SIM (Biobás). O meio foi inoculado com uma colônia isolada da bactéria (18 - 24 horas de incubação) através de uma picada com agulha de níquel-cromo. O tubo inoculado foi incubado a 30 °C, durante 48 horas. Após 48 horas foram utilizadas algumas gotas do reagente de Kovacs para a reação de indol.

Interpretação dos resultados:

Meio turvo - motilidade positiva;

Produção de H₂S – meio escuro;

Positivo Indol - desenvolvimento de um anel vermelho escuro na superfície do tubo.

III. Teste de Catalase

Uma colônia foi colocada em uma lâmina de microscópio limpa. Em seguida adicionou-se, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, homogeneizando o conteúdo.

Interpretação dos resultados:

A presença de bolhas de gás dentro de alguns segundos indica uma reação positiva.

A ausência de bolhas de gás indica uma reação negativa.

IV. Teste de OF

As bactérias foram semeadas em dois tubos contendo o meio de Hugh Leifson, pH 7,1, usando agulha (inoculação por picada em profundidade). Foi adicionado a um dos tubos óleo mineral estéril (5 a 6 mm altura), para criar um ambiente de anaerobiose. Incubou-se a 30 °C e foi examinado diariamente durante 14 dias, pois alguns microrganismos só produzem ácidos (resultado da utilização da glicose) após vários dias de incubação.

Interpretação dos resultados:

Utilização da Glicose	Tubo aberto	Tubo com óleo
Por oxidação	Amarelo	Verde
Por fermentação	Amarelo	Amarelo
Sem reação	Verde ou azul	Verde

Fermentativa: Enterobactérias como *Escherichia coli*

Oxidativa: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*

Sem reação: *Alcaligenes faecales*

V. Crescimento em meio Mac Conkey (MC)

O MC é seletivo para bactérias gram-negativas porque possui sais de bile e de cristal violeta, que interferem no metabolismo das bactérias gram-positivas. É também diferenciador devido à presença de lactose na sua composição, distinguindo as bactérias que fermentam a lactose (LAC+) das que não fermentam (LAC-). Este meio possui como indicador de pH o vermelho

neutro, cuja cor a pH ácido é rosa e pH alcalino é incolor. Este teste foi usado para verificar se a bactéria for gram-negativa e para observar se a mesma fermentava ou não a lactose. As culturas puras foram semeadas com a ajuda de uma alça de platina e semeadas em Agar MC, sendo incubadas a 21 °C por 24 horas.

Interpretação dos resultados:

- Fermentam a lactose (LAC+) - formam colônias róseas ou vermelhas.
- Não Fermentam a lactose (LAC-) – não formam colônias róseas ou vermelhas.

VI. Teste de Oxidase

Para este teste utilizamos tiras de papel contendo o reagente pfenilenodiamina (Laborclim). Utilizando um palito de madeira estéril foi transferido assepticamente uma ou duas colônias recém isoladas (18-24h de cultura em NA a 21 °C) e homogeneizada sobre a superfície da tira.

Interpretação dos resultados:

- Bactéria Oxidase positiva - coloração violeta,
- Oxidase negativa – incolor

VII. Teste de Agar de Ferro e Açúcar Tríplice em Meio de TSI

O teste foi feito inoculando por picada a base (crescimento em anaerobiose) do meio TSI (Difco) e a seguir a parte inclinada (aerobiose) até a extremidade final fazendo uma estria em “zigue-zague”.

Interpretação dos resultados:

- * Inclinação vermelha (alcalino) e fundo amarelo (ácido): apenas fermentação da glicose;
- Inclinação amarela (ácida) e fundo amarelo (ácido): fermentação da glicose juntamente com a lactose e/ou sacarose;
- * Meio preto: produção de H₂S (Salmonella). * Produção de gás: presença de gás no meio.

VIII. Teste de Vermelho de metila (VM)

Esta prova bioquímica foi utilizada para caracterizar os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. O teste foi realizado utilizando uma colônia da placa de NA ou BHI crescida a 21 °C por 18 a 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina a cultura foi inoculada ao meio, e em seguida incubada a 30 °C por até cinco dias. Após incubação, adicionaram-se algumas gotas do indicador VM.

Interpretação do resultado:

Positivo – meio muda de cor para vermelho.

Negativo – meio permanece amarelo.

IX. Teste de Urease

A partir da cultura crescida em BHI ou NA (cultura com 24 horas de incubação), foi inoculado com uma alça de platina um tubo contendo o meio. Incubou-se a 35 °C por 24 horas ± 2 . Quando o resultado obtido for negativo, deixar o tubo por mais sete dias à temperatura ambiente, pois o resultado ainda pode ser alterado.

Foi utilizado um tubo não inoculado (controle negativo).

Interpretação de resultados:

Urease positiva - o meio muda para rosa claro

Urease negativo - o meio se mantém com a cor inicial amarelo

X. Teste de Citrato de Simmons

Esta prova bioquímica tem como finalidade a caracterização de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e fundamenta em determinar a capacidade dos microrganismos utilizarem o citrato de sódio como única fonte de carbono, resultando em alcalinidade do meio.

A partir da cultura crescida em BHI ou NA (cultura com 18 - 24 horas de incubação) inoculou-se com uma agulha de níquel-cromo um tubo contendo o meio Citrato de Simmons (Agar inclinado). O teste foi realizado inoculando uma estria sobre a superfície do meio. Incubado a 35 °C por 96 horas ± 2 . Foi utilizado um tubo não inoculado (controle negativo). Os microrganismos que não conseguem utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, não crescem no meio de cultura, e o mesmo permanece com a sua coloração inicial (verde).

Interpretação de resultado:

Positiva – alcaliniz

ação do meio que se torna azul intenso, principalmente no ápice.

ANEXO B – DETERMINAÇÃO DE BASES VOLÁTEIS TOTAIS EM PESCADOS POR ACIDIMETRIA



MAPA/SDA/CGAL
Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS
Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV
Método de Ensaio - MET

Código: MET POA/SLAV/25/02/01
Página 1 de 8
Emissão: 18/07/2014

Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

1 Escopo

Este método tem por objetivo determinar o teor de bases voláteis totais em pescados, indicando o seu grau de conservação.

2 Fundamentos

As bases voláteis totais (N-BVT) compreendem compostos como amônia, trimetilamina e dimetilamina. No início do processo degradativo do pescado, a base volátil mais representativa é a amônia, originária dos produtos da desaminação dos derivados do ATP. No início da putrefação, o teor de N-BVT ultrapassa $30 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, podendo ultrapassar $50 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ quando o produto está bastante deteriorado.

O presente método se baseia na destilação por arraste de vapor da amônia e das aminas voláteis presentes no pescado, em meio levemente alcalino. Em seguida, procede-se à titulação com solução ácida para sua quantificação.

3 Reagentes, padrões e materiais

Todos os reagentes são de grau analítico, exceto quando especificado. Toda a água utilizada nos procedimentos deve ser destilada e deionizada, exceto quando especificado.

3.1 Reagentes

- Ácido bórico (H_3BO_3) p.a.;
- Ácido clorídrico (HCl) 37%;
- Alaranjado de metila ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$);
- Álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) p.a.;
- Óxido de magnésio (MgO);
- Verde de bromocresol ($\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$);
- Vermelho de metila ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$).

3.2 Padrão

- Carbonato de sódio (Na_2CO_3).



Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

3.3 Materiais

- Anti-espumante;
- Balão de 1000 mL;
- Béquers ;
- Bureta de 25 mL;
- Erlenmeyers de 250 mL;
- Pipetas volumétricas (100 mL);
- Proveta de 50 mL;
- Tubos Kjeldahl.

4 Equipamentos

- Balança analítica e semi-analítica;
- Destilador de nitrogênio.

5 Precauções analíticas

Este método emprega substâncias químicas nocivas e procedimentos que podem representar risco ao operador. Equipamentos de proteção individual e uniforme apropriado à condução da marcha analítica devem ser utilizados durante todo o processo.

Amostras de alimentos em geral devem ser consideradas como de risco biológico, evitando-se o contato direto com pele e mucosas.

Deixar o item de ensaio atingir a temperatura ambiente antes da pesagem, em frascos totalmente fechados.

Caso haja gasto excessivo do ácido clorídrico 0,01 M, trocar a solução titulante para ácido clorídrico 0,1 M.

Não esquecer de adicionar anti-espumante na amostra ao passá-la ao tubo.

6 Procedimentos

Todos os procedimentos devem ser registrados no formulário "Dados brutos", Anexo A do POP POA/SLAV/15 "Procedimentos de rotina na análise físico-química de produtos de origem animal".



Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

6.1 Preparo de soluções

6.1.1 Solução de ácido bórico 4% (m/v)

Em um béquer de 1000 mL, pesar 40 g de ácido bórico p.a utilizando uma balança semi-analítica. Adicionar cerca de 600 mL de água deionizada levando para chapa de aquecimento, sob temperatura branda. Agitar. Quando dissolver o precipitado, transferir para um balão de 1000 mL e avolumar. Adicionar 8 mL do indicador misto.

A solução deverá ser armazenada em frasco âmbar à temperatura ambiente.

6.1.2 Solução de álcool etílico 70% (v/v)

Em uma proveta, medir 140 mL de álcool etílico. Transferir para balão de 200 mL e avolumar com água deionizada.

Armazenar em frasco à temperatura ambiente.

6.1.3 Indicador misto

Pesar 0,1320 g de vermelho de metila e 0,0600 g de verde de bromocresol em uma balança analítica. Dissolver em 200 mL de álcool etílico 70% (v/v).

Filtrar se necessário e guardar em frasco âmbar. Armazenar à temperatura ambiente.

6.1.4 Solução de ácido clorídrico 0,1 M

Na capela de exaustão, adicionar com cuidado e lentamente pelas paredes de um balão de 1000 mL contendo 10 mL de água deionizada, 8,35 mL de ácido clorídrico, com auxílio de uma pipeta. Completar o volume com água deionizada e transferir a solução preparada para frasco de vidro e rotular. Essa solução poderá ser armazenada à temperatura ambiente.

6.1.5 Solução de ácido clorídrico 0,01 M

Com uma pipeta volumétrica de 100 mL, tomar quantitativamente 100 mL da solução de HCl 0,1 M e transferir para uma balão volumétrico de 1000 mL, completando com água deionizada.



Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

6.1.6 Solução de alaranjado de metila 0,5% (m/v)

Em um béquer de 100 mL, pesar 0,5 g de alaranjado de metila, utilizando uma balança semi analítica. Dissolver com água quente deionizada (40-50°C), com auxílio de um bastão de vidro. Transferir em temperatura ambiente para um balão de 100 mL completando com água deionizada. Essa solução deverá ser armazenada em frasco de vidro à temperatura ambiente.

6.2 Determinação das bases voláteis totais

Pesar aproximadamente 10 g de amostra em um béquer de 100 mL. Transferir para o tubo de destilação, com auxílio de 20 mL de água. Trabalhar em duplicata.

Adicionar 2 g de óxido de magnésio no tubo de destilação, com ajuda de uma espátula de pesagem, e duas a três gotas de anti-espumante.

Proceder à destilação por arraste de vapor por um período de 30 minutos, mantendo a temperatura da caldeira média.

Recolher o destilado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL de solução de ácido bórico a 4% com indicador misto. Fazer isso até que a cor do indicador demonstre que o meio se tornou básico. Pode-se testar o ponto final da destilação com papel indicador de pH até que não ocorra mais reação alcalina. A solução coletora deve ser mantida fria durante a destilação.

Titular as aminas voláteis com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M (ou 0,01 M, dependendo da concentração do analito), até a viragem.

Registrar o volume gasto da bureta no Formulário "Dados brutos", Anexo A do POP POA/SLAV/15.

Fazer uma prova em branco, com todos os reagentes, menos amostra.

6.3 Fatoração das soluções

6.3.1 Solução de ácido clorídrico 0,1 M



Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

Pesar cerca de 5 g de Na_2CO_3 em cadinho de porcelana de 50 mL. Comprimir a substância contra as paredes do cadinho, com uma espátula.

Aquecer a 300°C , durante duas horas em forno mufla. Transferir o cadinho com Na_2CO_3 para um dessecador e deixar esfriar.

Pesar, em balança analítica, cerca de 0,1300 g de Na_2CO_3 com auxílio de uma papel para pesagem e transferir para um erlenmeyer de 250 mL.

Adicionar cerca de 75 mL de água deionizada e uma gota de alaranjado de metila a 0,5%. Titular com HCl 0,1 M.

Realizar a padronização em triplicata.

Calcular o fator de correção (f), utilizando a seguinte fórmula:

$$f = \frac{m}{0,053 \times V \times M}$$

Onde:

m = massa (g) de Na_2CO_3 usada na titulação;

V = volume (mL) de HCl gasto na titulação;

M = molaridade da solução.

6.3.2 Solução de ácido clorídrico 0,01 M

O procedimento deverá ser igual ao descrito da fatoração da solução de ácido clorídrico 0,1 M, utilizando os dados da tabela 1. A solução de ácido clorídrico 0,01 M deverá ser padronizada mensalmente.

Tabela 1. Quantidade aproximada de Na_2CO_3 anidro, necessária para a padronização de 25 mL de ácido clorídrico.

Molaridade do ácido clorídrico	Na_2CO_3 (g)
0,01	0,0132
0,1	0,1320

$$\text{g Na}_2\text{CO}_3 = 0,053 \times 25 \times M$$



Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

7 Resultados

O resultado a ser expresso é a média das duplicatas, em mg de N-BVT.100g⁻¹, e deve ser calculado através da planilha “Cálculos – Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” (Anexo A) de acordo com a fórmula abaixo:

$$NBVT \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{(V - B) \times f \times 140}{m}$$

Onde:

V = volume de solução de HCl 0,1 M gasto na titulação (mL);

B = volume do branco (mL);

f = fator de correção da solução de HCl 0,1 M (ou 0,01 M, dependendo do método usado);

m = massa de amostra (g).

7.1 Aceitabilidade dos resultados

Todos os resultados devem ser aceitos se os requisitos para execução do ensaio forem atendidos. Em caso de funcionamento inadequado do equipamento, falta de energia durante o ensaio, ou outro motivo, o ensaio deve ser interrompido, e os resultados não devem ser emitidos.

7.2 Validação da planilha

A planilha “Cálculos – Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” (Anexo A) deve ser validada conforme descrito no POP POA/SLAV/15, através de cálculos manuais os quais devem ser registrados no formulário “Validação de planilhas eletrônicas”, Anexo M do POP POA/SLAV/15.

8 Arquivamento dos registros

A de planilha “Cálculos – Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” (Anexo A) deve ser mantida protegida na pasta eletrônica “Resultados”. O formulário de validação da planilha de cálculos deve ser arquivado conforme descrito no POP POA/SLAV/15.



Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

9 Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 001/81, de 7 de outubro de 1981. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físico-químicos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 13/10/1981.

10 Anexos

Anexo A MET POA/SLAV/25/02 Planilha “Cálculos - Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria”.

11 Alterações

Item 6: **incluído** “Todos os procedimentos devem ser registrados no formulário “Dados brutos”, Anexo A do POP POA/SLAV/15 “Procedimentos de rotina na análise físico-química de produtos de origem animal”;

Item 6.2: **excluído** “Dados Brutos – Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” (Anexo A)”. **Incluído** “Dados brutos”, Anexo A do POP POA/SLAV/15;

Item 7: **incluída** “através da planilha “Cálculos – Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” (Anexo A)”;

Item 7.2: **substituído** “Anexo B” por “Anexo A”;

Item 7.4: **excluído** “quinzenalmente”, **incluído** “conforme descrito no POP POA/SLAV/15”. **Excluído** “Validação da Planilha de Cálculos - Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” (Anexo C)”, **incluído** “Validação de planilhas eletrônicas”, Anexo M do POP POA/SLAV/15”;

Item 8: **excluído** “Os Anexos A e B devem ser arquivados na pasta “Dados Brutos” do POA/SLAV”. O Anexo C deve ser arquivado na pasta “Validação de Planilha de Cálculos” da unidade.”. **Incluído** “A de planilha “Cálculos – Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” (Anexo A) deve ser mantida protegida na pasta eletrônica “Resultados”. O formulário de validação da planilha de cálculos deve ser arquivado conforme descrito no POP POA/SLAV/15”;



Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria

Anexo A: Formulário “Dados brutos - Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria” **substituído** por planilha “Cálculos - Determinação de bases voláteis totais em pescados por acidimetria”;

Anexo B e C: **excluídos**.

Estas alterações não implicam em complementação de confirmação de desempenho.

12 Responsabilidades

O Responsável pelo POA/SLAV deve garantir a elaboração, aprovação, emissão, distribuição de cópias, implementação, capacitação do pessoal para execução, gerenciamento de não conformidades, análise crítica e revisão deste MET.

A UGQ é responsável pela verificação deste MET.

Elaboração/Revisão:	Aprovação:	Verificação:
Ana Paula Pereira de Melo – POA/SLAV	Cristhiane Cattani – POA/SLAV	Rosane Carlessi – UGQ
Data: 16/07/2014	Data: 17/07/2014	Data: 18/07/2014