

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

EFEITO DO *Lactobacillus casei* subsp. *casei*
ATCC 393 NA REDUÇÃO DO SABOR AMARGO DA CARNE
ESCURA DE ATUM (*Euthynnus pelamis*)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna

FABIANO CLEBER BERTOLDI

Florianópolis
2003

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Aspectos gerais dos tunídeos.....	3
2.2 Estrutura muscular.....	7
2.2.1 Músculo escuro.....	8
2.3 Aminoácidos e peptídios	9
2.4 Bactérias ácido lácticas.....	10
2.4.1 Importância.....	10
2.4.2 Classificação e Caracterização.....	11
2.4.3 Fatores antimicrobianos das bactérias ácido lácticas.....	12
2.4.4 <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Material.....	16
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Processo de fermentação.....	16
3.2.1.1 Ativação e preparação do inóculo.....	17
3.2.1.2 Espectrofotometria da biomassa.....	18
3.2.1.3 Avaliação do número de células viáveis no inóculo.....	18
3.2.2 Análises microbiológicas.....	18
3.2.2.1 Amostragem.....	18
3.2.2.2 Contagem total de microrganismos mesófilos.....	19

3.2.2.3 Contagem total de bactérias psicotróficas.....	19
3.2.2.4 Contagem total de bactérias lácticas.....	19
3.2.2.5 Avaliação microbiológica da carne escura de atum e dos patês elaborados....	19
3.2.3 Análises físico-químicas.....	20
3.2.3.1 Amostragem.....	20
3.2.3.2 Determinação do pH.....	20
3.2.3.3 Acidez titulável total.....	20
3.2.3.5 Composição química da carne escura de atum.....	20
3.2.4 Análise sensorial.....	21
3.2.4.1 Amostragem.....	21
3.2.4.2 Teste de comparação múltipla.....	21
3.2.5 Análise estatística	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Composição química da carne escura de atum.....	22
4.2 Análise microbiológica da carne escura de atum.....	23
4.3 Fermentação da carne escura.....	24
4.3.1 Avaliação do pH e acidez.....	25
4.3.2 Avaliação Bacteriológica.....	28
4.4 Avaliação microbiológica da carne escura fermentada de atum.....	31
4.5 Avaliação sensorial	32
5 CONCLUSÕES.....	35
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXOS.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características fisiológicas e bioquímicas do <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	15
Tabela 2 - Composição química da carne escura de atum (<i>Euthynnus pelamis</i>).....	22
Tabela 3 - Análise microbiológica da carne escura de atum (<i>Euthynnus pelamis</i>).....	24
Tabela 4 - Análise microbiológica da carne escura fermentada de atum (<i>Euthynnus pelamis</i>).....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies, gêneros, tribos, sub-famílias da família Scombridae.....	4
Figura 2 - Diagrama do fluxo operacional da produção do atum enlatado.....	6
Figura 3 - Distribuição da massa muscular do atum (corte perpendicular).....	7
Figura 4 - Diagrama do fluxo operacional da fermentação da carne escura cozida do atum (<i>Euthynnus pelamis</i>).....	17
Figura 5 - Cubas de fermentação com carne escura de atum (<i>Euthynnus pelamis</i>), <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393, glicose e NaCl.....	25
Figura 6 - Variação do pH durante a fermentação da carne escura de atum por <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.....	26
Figura 7 - Variação da acidez, em ácido láctico (%) durante a fermentação da carne escura de atum por <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.....	27
Figura 8 - Variações na contagem de bactérias psicotróficas (Log UFC g ⁻¹) durante a fermentação da carne escura de atum por <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.....	28
Figura 9 - Variações na contagem de bactérias mesófilas (Log UFC g ⁻¹) durante a fermentação da carne escura de atum por <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.....	29

Figura 10 - Variações na contagem de bactérias lácticas (Log UFC g ⁻¹) durante a fermentação da carne escura de atum por <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.....	30
Figura 11 - Médias das notas concedidas pelos julgadores ao padrão e aos diferentes tratamentos.....	33

RESUMO

Durante o processamento do atum enlatado ocorre uma considerável sobra de carne escura, que é utilizada para a elaboração de ração animal, em função de seu sabor amargo. Fermentação com *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 pode ser uma alternativa para redução do sabor amargo da carne escura de atum. As amostras da carne foram preparadas e embaladas à vácuo e congeladas a -18°C . A carne escura congelada foi utilizada imediatamente após o descongelamento. O experimento foi realizado com níveis de 2 e 4% de NaCl com adição de 2 e 4% de glicose respectivamente.

A carne escura de atum foi inoculada com 10^8 UFC g^{-1} de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* e fermentada a 10°C por 30 dias. O processo de fermentação foi monitorado através de análises bacteriológicas e químicas, onde observou-se a elevação da acidez e correspondente decréscimo do pH, em função da predominância da bactéria láctica (BL). A análise sensorial, utilizando teste de comparação múltipla, foi realizada com patês de carne escura de atum fermentada, que apresentou diferença significativa quando comparada com o patê controle, indicando redução do sabor amargo.

Palavras-chave: Pescado fermentado, Bactéria láctica, *Lactobacillus casei*, Atum

ABSTRACT

During the processing of the tuna fish can, there is a considerable discharge of dark meat, which is used to the elaboration of fish meal, due to its bitter taste. Fermentation with *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 is an alternative to reduce the bitter taste of tuna dark meat. Meat samples were prepared, vacuum packaged bags and stored at -18°C . Frozen dark meat was immediately thawed. The experiments were realized at NaCl levels of 2 and 4% after addition 2 and 4% of glucose, respectively.

The dark meat tuna was inoculated with with lactic acid bacteria and fermented at 10°C for 30 days. During this period samples were taken to be evaluated by bacteriological and chemical methods. Sensorial test, using multiple comparison test, was made with dark meat pastes and showed significative difference when compared with paste made with dark meat without fermentation process, which indicate the reduction of bitter taste.

Keywords : Fish fermentation, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei*, tuna

1 INTRODUÇÃO

A mudança de hábito em decorrência da globalização, a agitação cotidiana, aliada ao crescimento da população, vêm ocasionando um aumento no consumo mundial de pescado. Esse tipo de alimento proporciona uma dieta saudável, oferecendo alto valor protéico e rica em gordura insaturada. Em um mundo em que os veículos e os meios comunicação de massa incentivam as pessoas a um maior consumo de alimentos e ao mesmo tempo exigem aparência física, esbelta e elegante, onde pessoas magras se destacam, o pescado torna-se um excelente alimento. Uma categoria alimentar com amplo potencial de mercado a ser explorado tanto pela mídia quanto pelas empresas, beneficiando a saúde do consumidor.

O aproveitamento de resíduos da indústria pesqueira é uma alternativa ecologicamente correta nos dias atuais. A reciclagem, bem como o uso correto dos recursos naturais, proporciona à indústria de pescado lucro extra e argumentos para sua estratégia de marketing.

O atum é uma alternativa arrojada para as empresas processadoras, pois possibilita desenvolver novos produtos com valor nutricional e qualidade organoléptica a partir de resíduos industriais.

Na produção do atum enlatado, os resíduos consistem de cabeça, espinhaço, vísceras, carne escura e uma pequena quantidade de carne branca, totalizando cerca de 60% do peso. Esses resíduos não são utilizados na alimentação humana, destinam-se quase que exclusivamente para a elaboração de ração animal (GUAGLIA e MAIORANO, 1980).

A carne escura do atum, de sabor amargo, constitui uma massa residual representativa em escala industrial, que poderia ser melhor aproveitada como matéria-prima na utilização de produtos de pescado. O principal fator limitante para o consumo dessa carne escura é o sabor amargo, desagradável, causado principalmente por aminoácidos e peptídios hidrofóbicos.

O desenvolvimento de tecnologia com o intuito de reduzir e até mesmo eliminar o sabor desagradável da carne escura do atum é oportuno, considerando a necessidade de inovação e a possibilidade de oferecer um alimento saudável e alternativo.

O presente trabalho teve como objetivo minimizar o sabor amargo da carne escura de atum (*Euthynnus pelamis*), através da fermentação láctica, utilizando *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais dos tunídeos

São peixes pertencentes à classe dos teleósteos, que se caracterizam pela presença de ossos ou espinha dorsal (HICKMAN et al., 1984). Sua coluna vertebral é formada pelas vértebras que têm três espinhos: um neural e dois pleurais (CONTRERAS GUZMÁN, 1994). Possuem escamas cicloídes, nadadeiras peitorais, aleta dorsal, segunda dorsal, caudal, anal e na maioria das espécies aletas ventrais (BERTULLO, 1975; SUZUKI, 1983).

O sistema vascular subcutâneo é responsável pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes para a musculatura natatória. As veias e artérias estão localizadas na vértebra central (SHARP e PIRAGES, 1978).

Segundo COLLETE (1963) citado por RIVERA (1992), os tunídeos pertencem à família Scombridae e dividem-se em quinze gêneros e quarenta e oito espécies, conforme indicado na Figura 1.

Comercialmente, destacam-se as seguintes espécies de tunídeos (ESMINGER et al, 1994):

- *Katswonus pelamis* – gaiado
- *Euthynnus pelamis* - bonito de barriga listrada;
- *Thunnus thynnus* – atum do sol;
- *Thunnus albacares* – albacora de laje;
- *Thunus alalunga* – albacora branca.

No Brasil as espécies mais valorizadas comercialmente são (SUZUKI, 1983):

- Bonito pintado (*Euthynnus alleteratus*);
- Bonito de barriga listrada (*Euthynnus pelamis*);
- Albacoras (*Thunnus alalunga* ou *Germo alalunga*).

Os tunídeos são peixes que apresentam características diferenciadas, colocando-os numa posição de destaque. Possuem temperatura corporal superior à da água (de 1 a 3 °C). Apresentam corpo roliço, fusiforme, que facilita seu deslocamento com pouca perda de

energia, o que possibilita alto nível aerodinâmico, tornando-os rápidos nadadores (ANTUNES, 1981; MARTIN E FLICK, 1990; CONTRERAS GUZMÁN, 1994; SUZUKI, 1983).

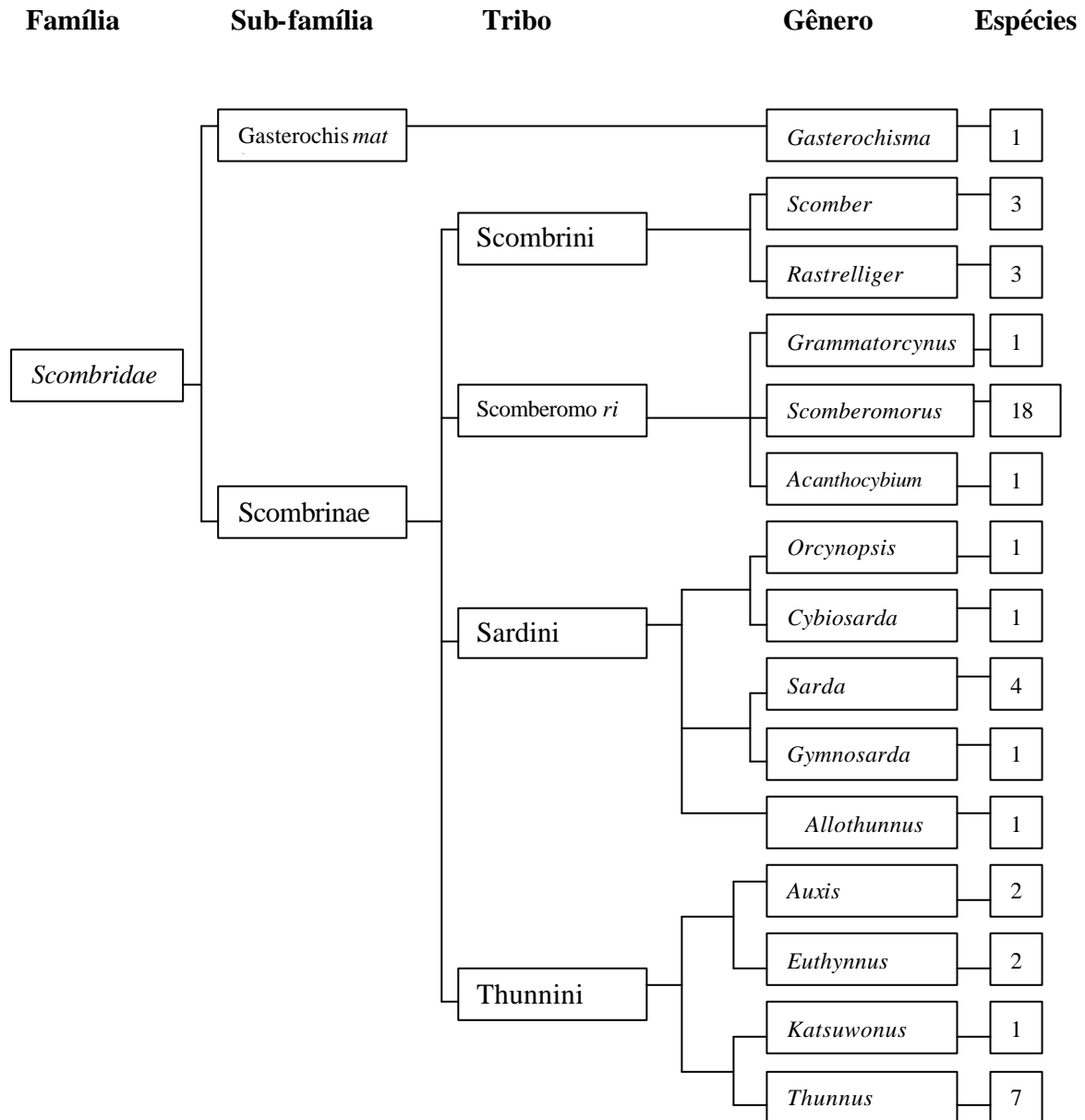


Figura 1: Espécies, gêneros, tribos e sub-famílias da família Scombridae.
Fonte: Collete (1963) citado por Rivera (1992).

Distinguem-se ainda quanto ao metabolismo, digestão, concentração de hemoglobina no sangue, proporção de oxigênio que removem da água, além de movimento contínuo (nunca param para descansar) (ANTUNES et al, 1981).

O atum é consumido no Japão, Estados Unidos, Espanha, Itália e Alemanha, compreendendo 90 % do consumo mundial. A forma de consumo de maior expressão desse pescado encontra-se no produto enlatado. Em conseqüência do elevado valor comercial internacional desse enlatado, estabeleceram-se definições e padrões, tanto de países produtores e consumidores como de organizações internacionais. A *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO), fizeram recomendações internacionais na comissão do *Codex Alimentarius*, publicado em 1975, para o enlatamento do atum, em água e óleo. As seguintes espécies foram determinadas para a linha de produção de enlatamento, de acordo com *Codex Alimentarius Commission*:

- *Thunnus thynnus* (atum grande);
- *Thunnus thynnus orientalis e Thunnus thynnus macoyii*;
- *Thunnus obesus* (atum de olho grande);
- *Thunnus albacares* (albacora de lage);
- *Thunnus atlanticus* (albacorinha);
- *Kishinoella toggol*;
- *Thunnus alalunga* (albacora branca ou atum branco);
- *Euthynnus pelamis* (bonito de barriga listrada);
- *Euthynnus lineatus* (bonito negro);
- *Euthynnus affinis*;
- *Euthynnus alleteratus* (bonito pintado);

A comissão, além de indicar as espécies que podem ser utilizadas na produção do enlatamento, determinou que o nome do produto poderá ser “atum”, “bonito” ou “bonito-atum”, a critério da legislação do país onde o produto será comercializado. O nome poderá também ser acompanhado por termo descritivo relacionado a cor do produto, “white” para espécie *Thunnus alalunga* e as designações “light”, “dark” e “blended”, com critérios do país que o comercializa (ANTUNES, 1981).

O fluxograma do processo de enlatamento do atum é apresentado na Figura 2.

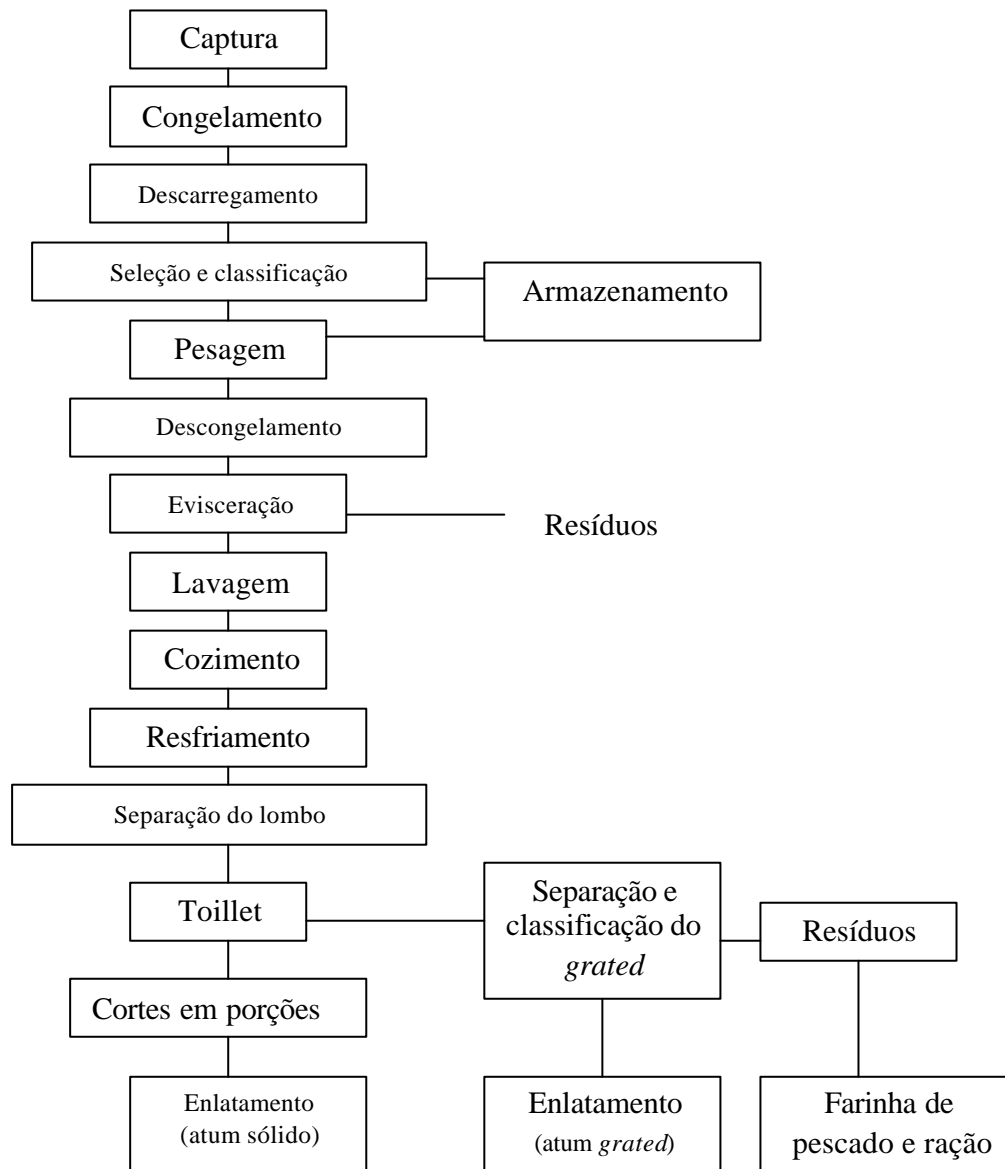


Figura 2: Diagrama do fluxo operacional da produção do atum enlatado.

Fonte: Indústrias Quaker

2.2 Estrutura muscular

As propriedades organoléticas, do ponto de vista alimentar, estão relacionadas à estrutura protéica do músculo e suas reações bioquímicas (HAMM, 1966).

O músculo do pescado assemelha-se funcionalmente ao dos mamíferos, porém o arranjo e a união do tecido conectivo de sua estrutura é diferente. Além disso, entre as espécies, ocorrem variações na forma e microanatomia detalhada, entretanto a estrutura e as unidades moleculares são semelhantes (BEIRÃO, 1986).

A distribuição dos músculos dos tunídeos apresenta-se em quatro partes (lombos) claramente definidas, que podem ser observadas como um quadrante, conforme Figura 3 (CONTRERAS GUZMÁN, 1994).

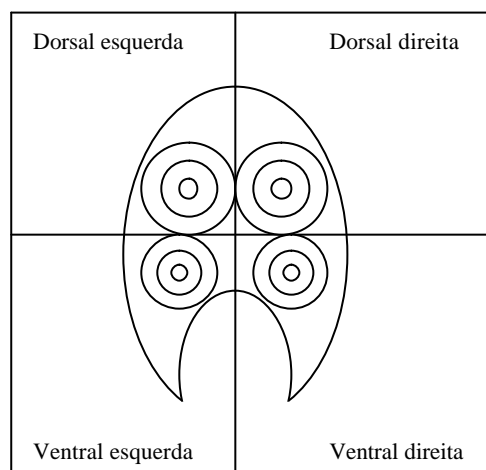


Figura 3: Distribuição da massa muscular do atum (corte perpendicular).
Fonte: Contreras Gusman (1994)

Os músculos possuem sentido principal longitudinal, que são interrompidos por divisórias, denominadas miosepta (colágeno). O comprimento dos segmentos (miômeros ou miotomas) varia em função do tamanho do peixe, esses segmentos vão desde a superfície até a coluna vertebral (CONTRERAS GUZMÁN, 1994).

Os miofilamentos (conjunto de miofibrilas separadas pelo retículo sarcoplasmático) dão origem as fibras musculares. Existem espaços entre as miofibrilas e a membrana plasmática, que são preenchidos pelo sarcoplasma, um líquido viscoso, onde estão presentes mitocôndrias, enzimas, glicogênio, mioglobina, ATP e compostos orgânicos e inorgânicos de baixo peso molecular (MEYER, 1968) citado por (ROMIO, 1999).

2.2.1 Músculo escuro

Segundo SHARP e PIRAGES (1978), a distribuição da massa muscular escura do peixe ocorre no sentido longitudinal do corpo em direção a superfície corporal, entretanto essa característica varia de acordo com as diferentes espécies.

Quanto maior a atividade natatória do peixe, maior será o volume de músculos escuros. Como o atum é um peixe que vive em movimentação constante, apresenta grande quantidade de músculos escuros, ao contrário dos peixes que se movimentam lentamente. Por serem mais aeróbios, os músculos escuros possuem grande quantidade de mioglobina, ao contrário dos músculos brancos. Além disso, os músculos escuros possuem elevado teor de gordura, facilitando o processo de oxidação. A concentração de mioglobina e hemoglobina desse músculo é cinco vezes maior do que no músculo claro de atum, onde a cor escura do músculo está relacionada ao alto teor dessas substâncias (REGENSTEIN e REGENSTEIN, 1991; CHINNAMMA, 1975; BELITZ, 1979).

Cerca de 11% do peso do peixe corresponde ao músculo escuro. É na parte central do peixe que esse músculo está mais concentrado. O conteúdo de umidade, proteína, nitrogênio não protéico, proteínas sarcoplasmáticas, nitrogênio de aminoácidos livres, ácido láctico, fósforo e ribose são mais elevados no músculo claro. Já no músculo escuro estão presentes em maior quantidade, as proteínas solúveis em solução salina, o glicogênio, a gordura e os pigmentos (MUKUNDAN et al, 1979; PERES e POZO, 1990).

Segundo CHINNAMMA (1975), o elevado conteúdo de glicogênio do músculo escuro deve-se às transformações das condições anaeróbicas que ocorrem durante o período de morte, que são mais estressantes para os músculos escuros do que os claros.

Acredita-se que a presença de grandes concentrações de lipídios e vitaminas no músculo escuro caracteriza uma semelhança com o fígado, que transfere metabólitos para os músculos claros adjacentes (KANOH et al., 1988). MUKUNDAN et al. (1979), também evidenciaram semelhança entre o fígado e o músculo devido ao alto teor de ferro.

A presença de peptídios, constituídos de aminoácidos com estrutura hidrofóbica e a oxidação de lipídios são fatores responsáveis pelo sabor amargo da carne escura do atum (BELITZ et al, 1979).

2.3 Aminoácidos e peptídios.

A contribuição do sabor pelos aminoácidos nos alimentos foi reconhecida em 1908, na Universidade de Tóquio, onde o L-glutamato monossódico foi descoberto como um componente essencial do sabor na maioria dos alimentos típicos japoneses (KIRIMURA et al., 1969).

Os aminoácidos são as principais substâncias responsáveis pelo sabor dos alimentos marinhos, onde a glicina, alanina, serina, e treonina caracterizam-se por serem doces, enquanto a arginina, leucina, valina, metionina, fenilalanina, histidina e isoleucina por serem amargos, segundo IJONG e OHTA (1996).

Segundo SGARBIERI (1996) citado por DAVIES (2000), os aminoácidos podem ser caracterizados pelo sabor em três grupos:

I – Aminoácidos nas formas L e D sem sabor ou ligeiramente perceptíveis (lisina, serina, treolina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico);

II – Aminoácidos com propriedades de gosto complexo e difíceis de serem avaliados no estado puro (cisteína, ácido glutâmico, metionina);

III – Aminoácidos com sabor amargo ou doce, os quais foram comparados quantitativamente com soluções de cafeína e sacarose (arginina, isoleucina, alanina, histidina, leucina, fenilalanina, triptofano, tirosina, valina, glicina).

A cadeia lateral hidrofóbica e o grupo α -amino dos aminoácidos são as principais características correlacionadas ao sabor amargo (TAMURA et al., 1990). NEY (1979) foi o primeiro pesquisador a correlacionar esse sabor com peptídios hidrofóbicos. Ele propôs uma regra na qual o sabor amargo é relacionado com o valor médio de hidrofobicidade do peptídio. O valor da hidrofobicidade do peptídio (Q) é definido como a somatória da variação da energia livre (Δg em cal/mol) na transferência da cadeia lateral do aminoácido da fase alcoólica (etanol) para fase aquosa, dividido pelo número de mols de aminoácidos residuais do peptídio (n), conforme equação: $Q = \Sigma \Delta g/n$. Peptídios com valor de $Q > 1400$ cal/mol são caracterizados como amargos e peptídios com valor < 1300 cal/mol não apresentam amargor. Valores que intermediam 1300 e 1400 cal/mol, não obtiveram nenhuma observação atribuída ao gosto amargo.

De acordo com PEDERSON (1994), a regra é válida para o peso molecular < 6.000 Daltons, pois peptídios com peso molecular acima desse valor e com $Q > 1400$ cal/mol, não apresentaram sabor amargo.

MATOKA e HATA (1972) citados por PEDERSEN (1994), concluíram que, a hidrofobicidade das cadeias laterais dos aminoácidos são as responsáveis pelo sabor amargo dos peptídios. Esses pesquisadores relataram que esse sabor se desenvolve pela hidrólise de peptídios, resultando em aminoácidos hidrofóbicos, os quais anteriormente à degradação mantinham-se protegidos na molécula.

2.4 Bactérias lácticas

2.4.1 Importância

Bactérias Lácticas (BLs) estão entre os microrganismos mais longamente utilizados pelo homem na indústria de alimentos. A relativa simplicidade dessas bactérias permite utilidade ampla, nos mais diversos segmentos tecnológicos e científicos (KONINGS et al. 2000).

A fermentação é uma tecnologia de transformação antiga de alimentos, desde o nascimento da civilização essa técnica é descrita, sendo os registros mais antigos de 6000 a.C. (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). Essas bactérias foram utilizadas, mesmo sem compreensão científica no passado, para conservação e porque conferiam características organolépticas desejáveis ao alimento (FIORENTINI, 1999).

As BLs são muito utilizadas para alterar as propriedades aromáticas e texturiais dos alimentos e principalmente prolongar a vida-de-prateleira de frutas, carnes, leite, vegetais e cereais (LEROI et al., 1996; DESAI e STHETH, 1997). Esses microrganismos são importantes na atualidade, tanto em processos de fermentação, como para a conservação de alimentos (PIARD e DESMAZEAUD, 1992).

Essas bactérias, não são apenas cruciais para a fabricação de produtos fermentados, como também têm sido citadas como eficazes no tratamento de uma variedade de desordens fisiológicas, incluindo colites (prevenção), gastroenterites, hipercolesterolemia,

encefalopatia hepática, má digestão de lactose, infecções urogenitais e prevenção de tumores (MISHRA e LAMBERT, 1996).

O conceito de BL como um grupo de microrganismos surgiu no início do século XX, precedido por estudos pioneiros e desenvolvimento de técnicas na segunda metade do século XIX, destacando-se por exemplo, os estudos de Pasteur, sobre a fermentação láctica, em 1857 e o primeiro isolamento de uma cultura bacteriana pura de *Bacterium lactis*, por Lister, em 1873 (STILES e HOLZAPFEL,1997). As BLs figuram entre os primeiros microrganismos utilizados na produção de alimentos manufaturados (KONINGS et al., 2000). Os avanços obtidos na microbiologia, somados ao início da revolução industrial, com a transformação dos métodos artesanais de produção em pequena escala em bioprocessos industriais, permitiram que se compreendesse profundamente os processos fermentativos. Em decorrência, durante o século XX, o estudo das BLs conduziu a um amplo conhecimento sobre estes microrganismos, e de sua manipulação, como jamais se poderia imaginar no passado (CAPLICE, 1999). De forma que, nos dias atuais, as BLs estão entre os microrganismos mais caracterizados no que diz respeito à sua genética, fisiologia e aplicações (KONINGS et al., 2000).

2.4.2 Classificação e Caracterização

As BLs compreendem os gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e *Vagococcus* (JAY,1996). As bactérias não apenas estão envolvidas na preservação de alimentos como também são responsáveis por uma identidade específica e atributos sensoriais dificilmente obtidas por outros métodos de processamento dada a complexidade e multiplicidade dos compostos envolvidos.

Essas bactérias ocorrem naturalmente em uma quantidade muito grande na natureza, sendo encontradas em matérias-primas alimentares como leite, carne e vegetais, embora, em algumas circunstâncias, possam causar a deterioração do alimento, ou mesmo estar envolvidas em casos clínicos de infecções (STILES e HOLZAPFEL,1997). Devido ao seu metabolismo as BLs são adicionadas intencionalmente aos processos fermentativos, pois além de conferir características sensoriais desejáveis, os fatores antimicrobianos que por elas são produzidos propiciam o aumento da segurança sanitária (por inibição dos

microrganismos deteriorantes e patogênicos) destes alimentos (GOLBERG e WILLIAMS, 1991; JACK et al,1995). Em produtos cárneos curados, as BAL não apenas asseguram boa qualidade aos produtos, como também ajudam no desenvolvimento da cor e aroma e diminuem o tempo de cura (HUANG e LIN,1995).

Bactérias lácticas típicas caracterizam-se como Gram positiva, não esporulada, catalase negativa, desprovida de citocromos, anaeróbia aerotolerante, fastidiosa, ácido tolerante (AXELSSON, 1993 citado por DE MARTINIS, 1997). Todos os integrantes deste grupo têm a capacidade de produzir ácido lático a partir de hexoses, tal que, baseado no metabolismo da glicose, Klyver dividiu as BLs em dois grupos: as homofermentativas, que produzem ácido lático como produto principal ou único de seu metabolismo; e as heterofermentativas, que produzem quantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir das hexoses (JAY,1996).

2.4.3 Fatores antimicrobianos das bactérias lácticas

As BLs exercem um papel fundamental na maioria dos alimentos fermentados, principalmente por aumentar sua vida-de-prateleira (ABEE et al.,1995). Dentre as aplicações das BLs inclui-se a sua habilidade em inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes ou mesmo patogênicos em virtude da produção de fatores antimicrobianos que agem conjuntamente ou isoladamente para proporcionar este efeito (RAY e DAESCHEL, 1992; LERICHE et al., 1999).

Os mecanismos antimicrobianos específicos das bactérias lácticas explorados na biopreservação de alimentos incluem a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, gás carbônico, diacetil, compostos antimicrobianos de largo espectro como a reuterina, etanol e a produção de bacteriocinas (DE VUYST E VANDAMME, 1994). O principal efeito, considerado antimicrobiano, se deve às atividades metabólicas comuns a todas as cepas. Esta apropriada e invariável atuação nos processos fermentativos não se caracteriza somente pela geração de energia celular, mas também exerce uma atividade para produzir ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático com um conseqüente decréscimo do pH do meio (ARIHARA et al., 1998).

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

As bactérias lácticas heterofermentativas podem produzir misturas de ácido láctico e acético, em determinadas circunstâncias. Entretanto, em comparação com as bactérias homofermentativas, elas produzem uma acidificação menor, como nas fermentações naturais de vegetais em que elas são mais importantes no início do processo, inibindo a multiplicação de microrganismos contaminantes e permitindo com isso, a seqüência da fermentação. O efeito antimicrobiano ocasionado pela redução do pH deve ser visto como um coadjuvante nos processos fermentativos e não como um substituto das boas práticas de manipulação (MENSAH et al., 1991).

O uso de BLs tem chamado cada vez mais a atenção pelo fato de que mais de 80% das toxinfecções alimentares são atribuídas a infecções ou intoxicações alimentares por microrganismos (TODD, 1989), e recentes levantamentos epidemiológicos conduzidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos Estados Unidos estimam em 76 milhões o número de casos de toxinfecções alimentares por ano, apenas naquele país (MEAD et al. citado por CLEVELAND et al. 2001). A pressuposição de que o crescimento de microrganismos patógenos pode ser evitado por uma cadeia de frio adequada não é mais válida, pois microrganismos como a *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*, entre outros, podem crescer a temperaturas de refrigeração (HOOVER e STEENSON, 1993)

2.4.4 *Lactobacillus casei* subsp. *casei*

Lactobacillus casei subsp. *casei* é utilizado como coadjuvante na fabricação de queijos. O sistema enzimático desenvolvido pela bactéria tem potencial considerável para influenciar o desenvolvimento do *flavour* desse alimento. Devido à enzima peptidase, o microrganismo está apto a degradar um número considerável de peptídios, incluindo os “amargos” com elevado conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos como a prolina (MARTINEZ-CUESTA et al., 2001)

Segundo ARORA e LEE (1990) o *L. casei* subsp. *casei* apresenta elevada atividade contra os peptídios amargos (fenilalanina-prolina; prolina-fenilalanina e prolina-isoleucina) e derivados de amino e peptídios sulfurados, principais responsáveis pelo sabor amargo em queijos maturados. Não apresentam atividade carboxipeptidase e apresentam maior atividade amino e dipeptidase do que atividade tripeptidase. Cepas de *Lactobacillus casei* e *plantarum* foram avaliadas quanto à atividade de aminotransferase, liase e descarboxilase, utilizando metionina como substrato. A presença de glicose na mistura da reação potencializa a conversão da metionina em 4-metiltio1-2-cetobutanoato e 4-metiltio1-2-hidroxi-butanoato para todas as linhagens. Nenhuma delas apresentou atividade liase e descarboxilase na metionina (AMARITA et al., 2001).

Lactobacillus casei apresentam-se em forma de bastonetes, medindo 0,7 a 1,1 µm de largura e 2,0 a 4,0 µm de comprimento, com tendência a formar cadeias. Não se desenvolvem acima de 45 °C e podem ser isolados de produtos lácteos, silagem, esgoto e trato intestinal humano (KANDLER e WEISS, 1986).

As características fisiológicas e bioquímicas do *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Características fisiológicas e bioquímicas do *Lactobacillus casei* subsp. *casei*

<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	
<i>Fermentação:</i>	
Glicose	+
Sacarose	+
Lactose	d
Maltose	+
Manitol	+
Ribose	+
Configuração do ácido láctico	L
Degradação da arginina	-
Temperatura ótima	45 °C
Percentagem mol G + C de DNA	45 - 47 %
Ácido teicoico	Nenhum

Fonte: Kandler e Weiss (1986).

Símbolos: - (negativo em 90 % ou mais das cepas), + (positivo em 90% ou mais das cepas), d (positivo entre 11 – 89 % das cepas)

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Alimentar do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1 Material

As amostras (carne escura de atum congelada) foram obtidas diretamente de uma indústria de pescado do município de Itajaí

Foi utilizado, como inóculo a bactéria láctica *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393, adquirida na Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello.

3.2 Métodos

3.2.1 Processo de fermentação

A carne escura cozida de atum, acondicionada à vácuo em sacos de polietileno e conservada sob congelamento a -18°C , foi pesada em porções de 400g e distribuída em cubas de fermentação de 1000 ml. Os experimentos foram realizados com adição de 2,0 e 4,0% de NaCl e 2,0 e 4,0 % de glicose. Os tratamentos foram desenvolvidos de forma independente, variando apenas um dos parâmetros operacionais (concentração de NaCl ou glicose). O processo se desenvolveu na condição de salga úmida com a proporção de 1:1, ou seja, 400 g de carne para 400 mL de salmoura. A cultura láctica (*L. casei* subsp. *casei*), após ter sido ativada e preparada, foi adicionada (20 mL) na forma de suspensão (10^8 UFC g^{-1}). Após homogeneização, a carne escura de atum acondicionada nas cubas foi fermentada a 10°C por 30 dias.

A Figura 4 mostra o fluxograma correspondente à operação de fermentação da carne escura de atum.

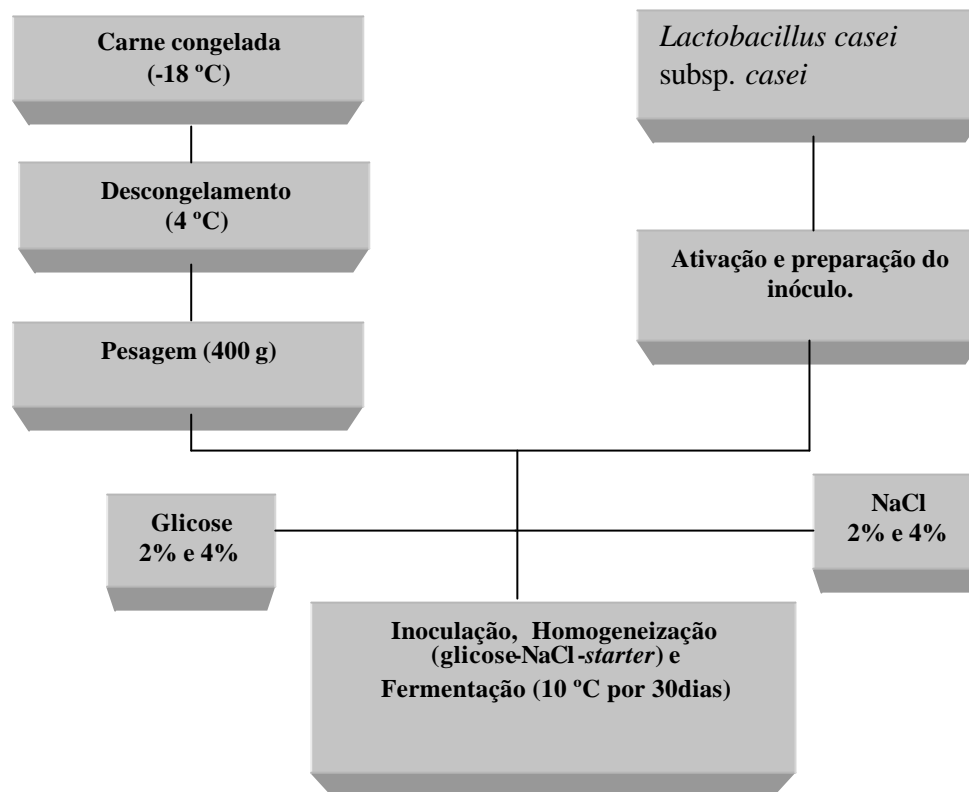


Figura 4: Diagrama do fluxo operacional da fermentação da carne escura de atum (*Euthynnus pelamis*)

3.2.1.1 Ativação e preparação do inóculo

O inóculo foi obtido a partir da ativação da linhagem liofilizada em caldo Man Rogosa Shape - MRS (Merck, Darmstadt, Germany) com incubação a 30 °C durante 18 horas. Uma alíquota de 5 mL foi inoculada em 200mL de caldo MRS e incubada novamente a 30 °C por 12h onde, a partir desse momento, iniciou-se a determinação da densidade ótica por espectrofotometria para controle do crescimento microbiano. Porções de 20 mL da cultura ativada de *L. casei* subsp. *casei* contendo 10^8 UFC g⁻¹, foram

inoculadas nas cubas de fermentação correspondentes aos tratamentos previamente estabelecidos.

3.2.1.2 Espectrofotometria da biomassa

A partir da leitura espectrofotométrica a 520 nm, foi estimado a densidade ótica da biomassa do inóculo. As amostras para leitura foram preparadas a partir de alíquotas de 1 mL que foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*L. casei* subsp *casei*) resuspenso em 3mL de solução de água peptonada a 1%, adicionado de 3 mL de solução de EDTA 1% e alcalinizada com NaOH 10 M (MAZO,1999).

3.2.1.3 Avaliação do número de células viáveis no inóculo

A enumeração das células viáveis foi realizada através de alíquotas de 1 mL das diluições correspondentes, por plaqueamento em profundidade em ágar MRS. As semeaduras foram realizadas em duplicata, e incubadas a 30 °C por 48 horas. A enumeração foi realizada em paralelo com a determinação da densidade ótica onde, posteriormente, foram correlacionadas, obtendo-se, assim, uma referência para a preparação do inóculo (GONZÁLES-FERNÁNDEZ et al., 1997).

3.2.2 Análises microbiológicas

3.2.2.1 Amostragem

Durante o período do processo de fermentação, em intervalos de 0, 3, 7, 14, 24 e 30 dias, 10g de amostra de carne escura foram coletadas assepticamente das cubas e realizadas diluições sucessivas em água peptonada a 0,1%. Foram realizadas análises correspondentes à contagem total de bactérias lácticas, mesófilas e psicrotróficas.

3.2.2.2 Contagem total de microrganismos mesófilos

A contagem dos microrganismos foi realizada pelo método do plaqueamento em profundidade em Plate Count Agar – PCA (Oxoid CM 463, Basingstoke, UK). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas à temperatura de 37 ° por 48 horas (APHA, 1992).

3.2.2.3 Contagem total de bactérias psicotróficas

A contagem foi realizada conforme método de plaqueamento em superfície em Plate Count Agar – PCA (Oxoid CM 463, Basingstoke, UK) e incubadas a 7 °C por 10 dias (APHA, 1992).

3.2.2.4 Contagem total de bactérias lácticas

A contagem das BLs, foi realizada por plaqueamento em profundidade em ágar MRS (Merck, Darmstadt, Germany), seguido-se de incubação a 30 °C por 48 horas (APHA, 1992).

3.2.2.5 Avaliação microbiológica da carne escura de atum e dos patês elaborados

Foram realizadas análises microbiológicas para determinar Coliformes a 45° C, Clostrídios sulfito redutores, Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp. na carne escura, na carne fermentada e nos patês elaborados para a realização da análise sensorial (APHA, 1992)

3.2.3 Análises físico-químicas

3.2.3.1 Amostragem

Durante o processo de fermentação, em intervalos de 0, 3, 7, 14, 24 e 30 dias, foram retiradas amostras de 10g da carne escura do atum das cubas de fermentação para a realização das análises físico-químicas (pH e acidez titulável total). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3.2 Determinação do pH

A determinação do pH, foi realizada com potenciômetro (“pHmetro”), conforme Association of Official Analytical Chemists (técnica 320.10) (AOAC, 1995).

3.2.3.3 Acidez titulável total

Foi realizada por titulação com NaOH 0,1 N, utilizando solução alcoólica a 1% de fenolfetaleína como indicador, expressando o resultado em ácido láctico (técnica 162.76) (AOAC, 1995).

3.2.3.4 Composição química da carne escura de atum

Análises de umidade, cinzas, lipídios e proteína foram realizadas de acordo com as técnicas número 950.46, 938.08, 991.36 e 940.25 respectivamente, da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

3.2.4 Análise sensorial

3.2.4.1 Amostragem

Para a realização da análise sensorial, foram coletadas amostras de 100 g de carne escura de atum fermentada e “não fermentada” (padrão) para elaboração de patês, preparados através de uma formulação básica (anexo I).

3.2.4.2 Teste de comparação múltipla

A avaliação sensorial foi realizada através da aplicação do teste de comparação múltipla, segundo TEIXEIRA (1987), onde 25 julgadores treinados receberam uma amostra padrão (patê de carne escura de atum) e compararam com cinco amostras codificadas de patês. Uma dessas amostras era o próprio padrão e as outras quatro, amostras de patê elaborados com carne escura de atum fermentada constituída dos quatro tratamentos: 2% de glicose e 2% NaCl, 2% de glicose e 4% NaCl, 4% de glicose e 2% NaCl e 4% de glicose e 4% NaCl. Foi solicitado aos julgadores, avaliar o sabor amargo das amostras codificadas em relação ao padrão, segundo escala de comparação múltipla (anexo II).

3.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental para a análise sensorial foi completamente casualizado. Realizou-se a análise de variância (Anova) para comprovar a existência de diferenças significativas entre as amostras e aplicou-se o Teste de Tukey *studentized* a nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), visando determinar diferenças entre as médias (MONTGOMERY, 1996). As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS System, versão 6.12 (1996).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição Química da carne escura de atum

Os valores obtidos da composição química da carne escura de atum (*Euthynnus pelamis*) estão descritos na tabela 2. Os resultados foram expressos em percentuais das médias.

Tabela 2: Composição química da carne escura de atum (*Euthynnus pelamis*)

	Carne escura de atum*
Proteína (%)	26,62
Lipídios (%)	4,75
Umidade (%)	64,80
Cinzas (%)	1,32

* Média de 3 repetições para cada amostra

A composição química de pescados é variável devido a diversos fatores, nos quais se incluem a idade do peixe, sexo e estação do ano no qual foi capturado (MAHAN e ARLIN, 1995).

Os valores obtidos de proteína, estão acima dos encontrados na literatura, que, variam de 15 a 24% em pescados marinhos (SUZUKI, 1981). Especificamente na carne escura de alguns tunídeos, a variação pode atingir 21 a 23%, segundo CONTRERAS-GUZMAN (1994). Esse percentual excessivo de proteína, possivelmente é explicado devido a matéria-prima ter passado pelo processo de cocção (injeção de vapor direto a 100 °C por 40 min) durante a operação da produção do atum enlatado, o que provoca perda de água e, conseqüentemente, concentração protéica .

O resultado referente ao conteúdo lipídico é coerente com os dados encontrados na literatura, onde o teor em pescados varia na faixa de 0,1 a 22% (SUZUKI, 1981). Entretanto, na carne de atum os valores podem chegar a 6,6% de gordura total, sendo 1,7%

apresentada na forma de ácidos graxos saturados, 2,2% na forma de ácidos graxos monoinsaturados e 2,2% na forma de ácidos graxos poliinsaturados (PIGOTT e TUCKER, 1990).

O teor de umidade, 64,80%, apresentou-se abaixo dos mencionados por alguns autores. AQUARONE et al. (1983) e BADOLATO et al. (1994) mencionam, respectivamente, valores na faixa de 66 a 84% e 70 a 80% para peixes marinhos. No músculo escuro de atum CONTRERAS-GUZMAN (1994) relata um percentual numa faixa de 68,1 a 71,3%. A menor umidade aqui encontrada é também decorrente do processo de cocção pela qual a matéria-prima passou na produção do atum enlatado, ocasionando perda de água (ROMIO, 1999).

Com relação à percentagem de cinzas, onde estão contidos os minerais, a carne escura de atum apresentou valores coerentes com os descritos na literatura, 1,29% para carne cozida e 1,20% para a carne crua (DAVIES, 2000). Os pescados em geral são ricos em minerais e, conforme PIGOTT e TUCKER (1990), jamais detectou-se deficiência desses compostos inorgânicos, cuja concentração superam as concentrações de minerais encontrados nas carnes de gado.

4.2 Análises microbiológicas da carne escura de atum

A tabela 3 apresenta os valores da análise microbiológica da carne escura de atum, conforme parâmetros exigidos pela Resolução RDC nº 12, item 7G da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA- M.S (2001), instituição que estabelece critérios e padrões microbiológicos para alimentos no Brasil.

Tabela 3: Análise microbiológica da carne escura de atum (*Euthynnus pelamis*).

Microrganismos	Resultados
Microrganismos mesófilos	$6,4 \times 10^3$ UFC g ⁻¹
Coliformes a 45° C	<3 NMP g ⁻¹
Estafilococos coagulase positiva	<100 UFC g ⁻¹
<i>Salmonella</i> spp	Ausência em 25g

UFC g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônia.

NMP: Número Mais Provável.

Os resultados descritos (tabela 3) atendem aos padrões da Resolução RDC nº 12, indicando uma matéria-prima de qualidade aceitável.

4.3 Fermentação da carne escura

A carne de peixe decompõe-se rapidamente; por essa razão, o experimento foi realizado a baixa temperatura. A escolha da temperatura de 10° C, levou em consideração relatos encontrados na literatura, onde autores mencionam que bactérias lácticas têm habilidade de se desenvolver em baixas temperaturas e que a degradação da histamina é menor a temperaturas baixas do que em temperaturas mais elevadas (GELMAN, et al., 2001; PALUDAN-MULLER, et al., 2002). Em contra partida, a baixa temperatura prolonga o tempo necessário para atingir o ponto desejável da fermentação. As cubas de fermentação utilizadas no experimento estão ilustradas na figura 5

A carne escura de atum, por apresentar reduzido teor de carboidrato livre, necessitou da adição de glicose para promover uma adequada fermentação. Os valores de glicogênio variam entre 0,05 e 0,85% nos tecidos musculares, tornando-os insatisfatórios nos processos fermentativos (FAO, 1995). A finalidade da adição de NaCl é de reduzir a microbiota deteriorante presente na matéria-prima.



Figura 5: Cubas de fermentação com carne escura de atum (*Euthynnus pelamis*), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393, glicose e NaCl.

A avaliação do processo fermentativo foi monitorado pelo decréscimo do pH com a correspondente elevação da acidez e o balanço entre a contagem das bactérias lácticas e as bactérias deteriorantes, resultados expressos nas figuras 6, 7, 8, 9 e 10.

4.3.1 Avaliação do pH e acidez

O pH inicial da carne foi de 6,00. Após a adição da cultura láctica (*Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393) ocorreu um decréscimo do pH no decorrer da fermentação, tendendo a estabilizar entre 4,32 a 4,55, após 24 dias, como demonstra a figura 6, que ilustra a reprodução dos tratamentos com adição do inóculo, associado a 2 e 4% de glicose e 2 e 4% de NaCl .

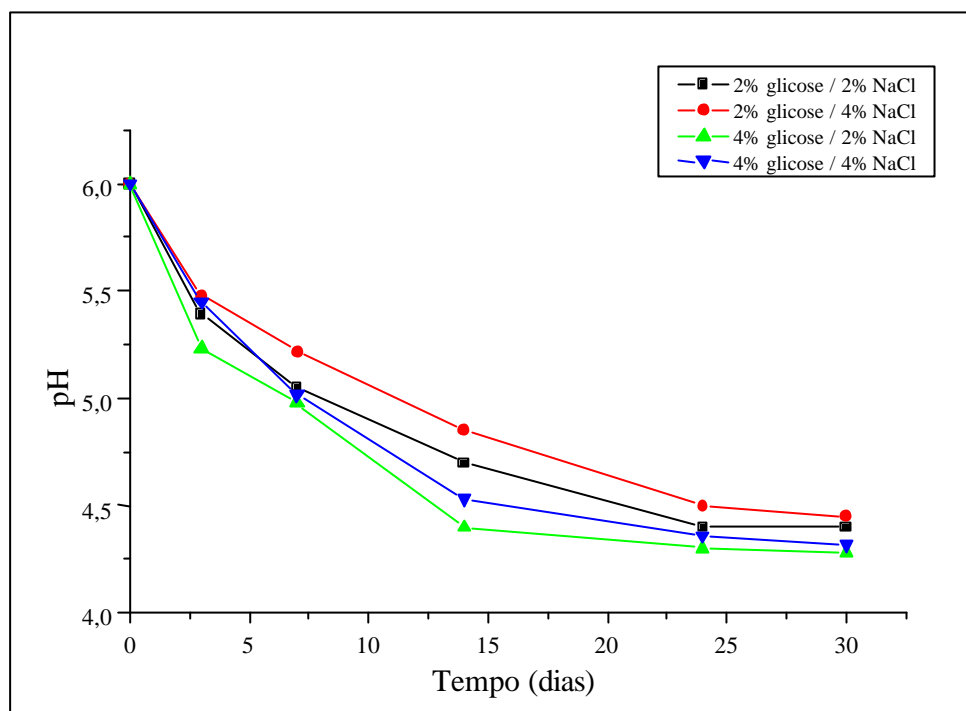


Figura 6: Variação do pH durante a fermentação da carne escura de atum por *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.

Nos tratamentos onde se utilizou 2 % de glicose, o aumento da concentração de 2 para 4% de NaCl diminui a performance da fermentação. No tratamento com concentração de 2 % de glicose e 2% de NaCl, o pH decresce de 6,00 para 5,39 após 3 dias, atingindo 4,40 no 30º dia de fermentação

Os tratamentos com 4% de glicose, apresentaram redução de pH mais acentuada, chegando a 5,23 no 3º dia e 4,28 após 30 dias de fermentação para o tratamento com 2% de NaCl.

Os resultados obtidos são coerentes com os encontrados por MORZEL et al. (1997) onde foi avaliado o efeito de culturas *starters* e redução do pH na fermentação de filés de salmão, utilizando combinações de concentrações diferentes de açúcar, NaCl e NaNO_2 . Eles observaram que, a maior produção de ácido lático ocorre com a concentração de 5% de açúcar. Entretanto, além dessa concentração não ter apresentado efeito significativo, fornece uma quantidade de carboidrato que se mantém no sistema após a fermentação, servindo de substrato para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Por outro lado, o aumento drástico de NaCl ocasionou um efeito negativo no

crescimento das BLs e, conseqüentemente, no decréscimo do pH. Resultados obtidos por GELMAN et al. (2001) na fermentação de filés de atum, utilizando temperatura de incubação de 10° C, inoculação de diferentes BLs, juntamente com a adição de NaCl , açúcar e conservantes químicos, mostraram redução gradual e lenta do pH na evolução da fermentação, levando 21 dias para chegar a um nível máximo de redução para todas as amostras. O pH atingiu o maior decréscimo para a amostra inoculada com *L. plantarum* (4,00) e mínimo para *P. pentosaceus* (4,50). A partir do 21° dia e até o 51° os valores de pH mantiveram-se praticamente inalterados.

A figura 7 mostra que a acidez aumenta no decorrer da fermentação para todos os tratamentos.

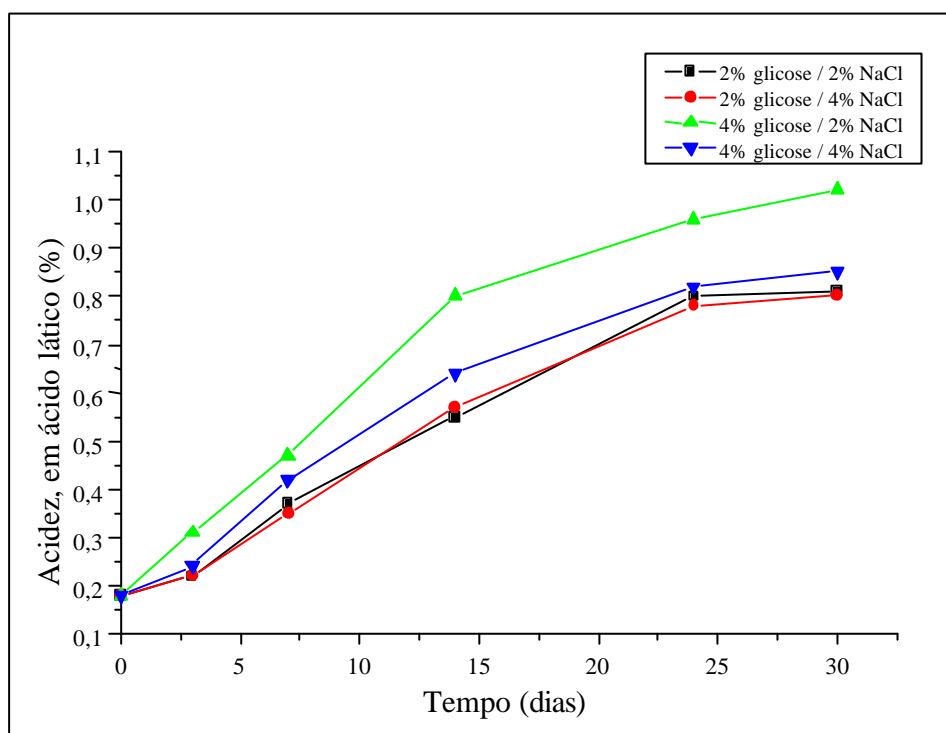


Figura 7: Variação da acidez, em ácido láctico (%), durante a fermentação da carne escura de atum por *L. casei* subsp. *casei* ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.

Nos tratamentos com 2% de glicose, o aumento da concentração de NaCl, de 2 para 4%, não afetou o desempenho da fermentação, ocorrendo uma sutil elevação a 0,22% no terceiro dia, para ambas concentrações, e 0,81 e 0,80% no 30° dia, não apresentando grande

diferença entre as duas concentrações. Entretanto, quando se aumentou a concentração de glicose de 2 para 4% a elevação da acidez foi expressiva, principalmente para a combinação 4% de glicose com 2% de NaCl, onde a percentagem de acidez atingiu 0,31 no 3º dia e 1,02 no 30º dia de fermentação.

A acidez resultante da fermentação corresponde principalmente à produção de ácido láctico produzido pelo *L. casei* subsp. *casei*. Esse ácido possui acentuada atividade antimicrobiana, inibindo a multiplicação da microbiota deteriorante, permitindo a continuação da fermentação. Os resultados da análise química mostraram que a acidez aumenta no processo fermentativo com a elevação do teor de glicose e redução de NaCl.

4.3.2 Avaliação Bacteriológica

As figuras 8 e 9 ilustram o aumento do crescimento de bactérias deteriorantes até 14º dia; a partir desse período, o crescimento manteve-se estável, decrescendo gradualmente até o 30º dia de fermentação para todas as amostras.

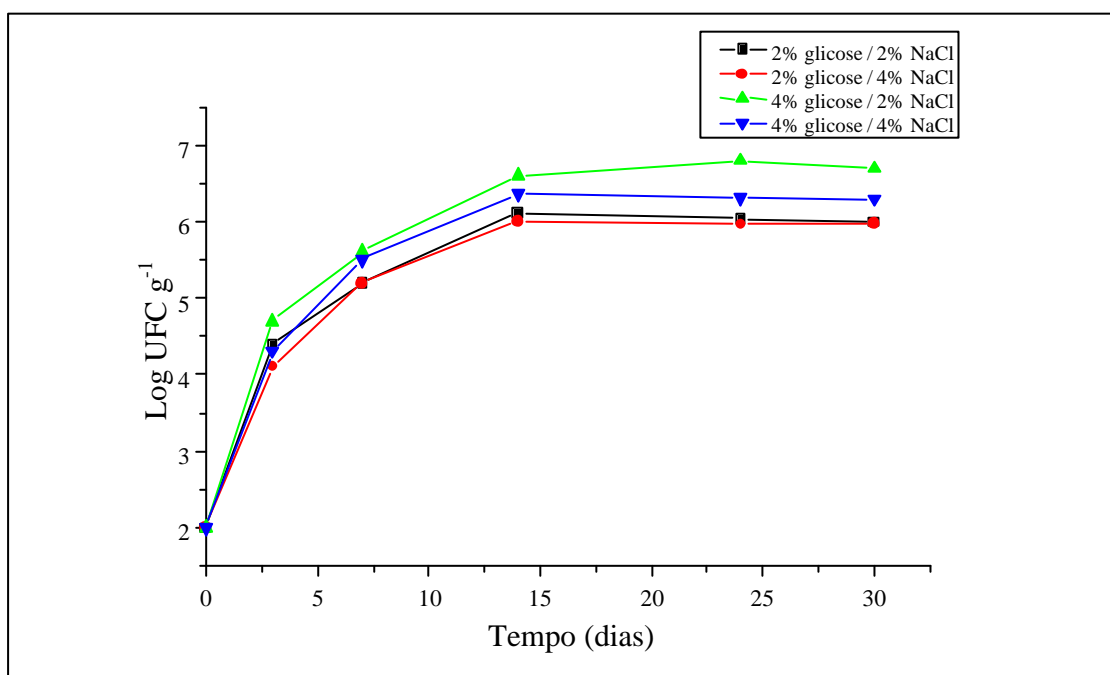


Figura 8: Variações na contagem de bactérias psicrotróficas (Log UFC g⁻¹) durante a fermentação da carne escura de atum por *L. casei* subsp *casei* ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.

Levando em consideração a contagem inicial de $1,0 \times 10^2$ UFC g^{-1} para bactérias psicrotróficas e $1,6 \times 10^6$ UFC g^{-1} para mesófilas, observou-se um aumento expressivo na contagem nos primeiros 3 dias de fermentação, variando com relação aos diversos tratamentos de $1,2 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC g^{-1} para as bactérias psicrotróficas e $3,1 \times 10^7$ a $7,8 \times 10^7$ UFC g^{-1} para as mesófilas. O tratamento com concentrações de 2% de glicose e 4% de NaCl, apresentou maior efeito de inibição, $9,6 \times 10^5$ UFC g^{-1} para psicrotróficas e $8,0 \times 10^7$ UFC g^{-1} para mesófilas. Entretanto, quando aumentou a concentração de glicose de 2 para 4%, o crescimento microbiano é expressivo, especialmente para a amostra com 4% de glicose com 2% de NaCl, onde o crescimento para psicrotróficas e mesófilas atingiu $5,0 \times 10^7$ UFC g^{-1} e $2,5 \times 10^8$ UFC g^{-1} respectivamente, após 30 dias de fermentação.

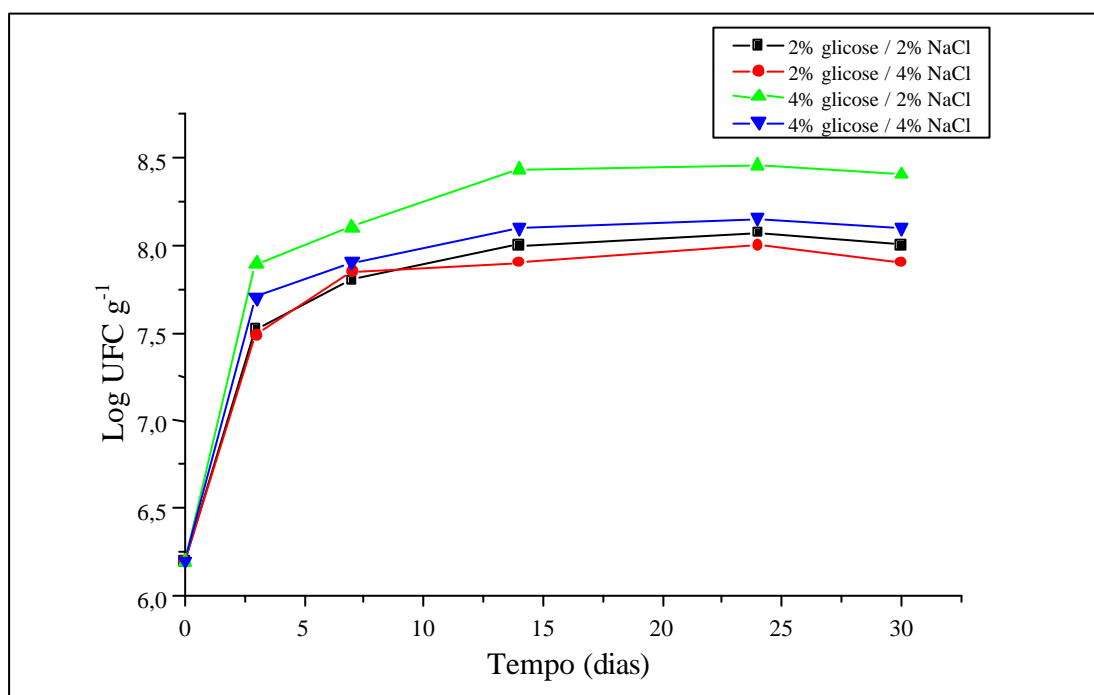


Figura 9: Variações na contagem de bactérias mesófilas (Log UFC g^{-1}) durante a fermentação da carne escura de atum por *L. casei* subsp. *casei* ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.

A contagem das bactérias lácticas, conforme ilustra a figura 10, foi maior do que a dos microrganismos deteriorantes durante todo processo de fermentação. A população microbiana inicial, variou de $4,8 \times 10^6$ a $5,4 \times 10^6$ UFC g^{-1} , nos diversos tratamentos. Ocorreu

crescimento em todos os tratamentos durante os primeiros 14 dias de fermentação. Após esse período, o crescimento manteve-se até o 30º dia, onde a contagem máxima variou $1,0 \times 10^8$ a $3,6 \times 10^8$ UFC g^{-1} .

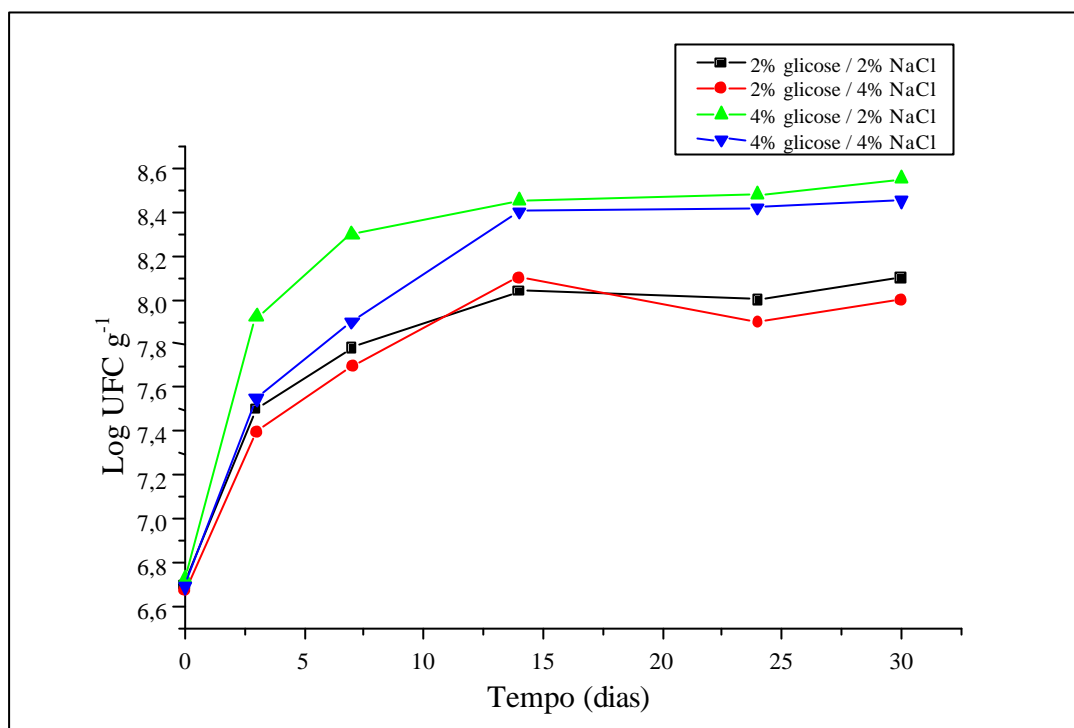


Figura 10: Variações na contagem de bactérias ácido lácticas (Log UFC g^{-1}) durante a fermentação da carne escura de atum por *L. casei* subsp. *casei* ATCC 393 com combinações de 2 e 4% de glicose e NaCl.

Os resultados apresentados nas figuras 8, 9 e 10, demonstraram que durante todo período de fermentação, as BLs foram predominantes, inibindo o crescimento dos microrganismos deteriorantes, especialmente a partir do 14º dia. Essa inibição pode ser compreendida principalmente pela sensibilidade dos microrganismos deteriorantes frente à elevada acidez do meio. Os resultados são coerentes com os descritos na literatura, como estudos realizados por ADAMS et al. (1997) em fermentação de pescados com adição de glicose e NaCl, que mostraram uma multiplicação das BLs com decréscimo das bactérias deteriorantes. O desempenho da fermentação aumentou, quando se elevou o teor de açúcar de 1 a 5%, à medida que, aumentando a concentração de NaCl de 1 a 6%, ocorreu uma redução da performance da fermentação. PALUDAN-MULLER et al. (2002) estudaram a fermentação do *plaa-som*, um fermentado de pescado típico da Tailândia, com diversas

concentrações de NaCl e relataram que o crescimento de BL na faixa de 10^8 a 10^9 UCFg⁻¹ permite obter um decréscimo significativo de pH, similar a outros produtos de pescado fermentado. Entretanto, o crescimento otimizado dessas BLs é dependente do teor de sal, onde o aumento da concentração de 6 para 11% inibe o crescimento das BLs e, conseqüentemente, o processo de fermentação do *plaa-som*. Dessa forma, o autor sugere que se utilize no máximo a concentração de 6 a 7% de sal no processamento desse produto e também em outros produtos fermentados de pescado, com o objetivo de facilitar o rápido crescimento das BLs, diminuindo assim o pH para menos de 4,5. Outros estudos demonstraram que as altas concentrações de sal inibem o crescimento de BL, possibilitando o crescimento de *Staphylococcus spp.*, que foram identificados em produto de pescado fermentado (Thai-fermented fish) com concentração de 5% de sal (TANASUPAWAT et al.,1991; TANASUPAWAT et al.,1992) e do pescado fermentado coreano com concentração entre 8 a 26% de NaCl (UM e LEE, 1996), onde o pH desses produtos coreanos variou de 4,8 a 6,6.

Os resultados obtidos e expressos na figura 10 também são coerentes com os publicados por GELMAN et al.(2001), que avaliaram a fermentação de filés de atum utilizando temperatura de incubação de 10° C, e diferentes BLs como culturas iniciadoras, juntamente com a adição de NaCl, sacarose e conservantes químicos, e mostraram que o máximo de crescimento das BLs varia numa faixa de 2,9 a 6,4 x 10⁸ UCFg⁻¹ para as diversas culturas lácticas com 35 dias de fermentação.

4.4 Avaliação microbiológica da carne escura fermentada de atum

Após 30 dias de fermentação, foi realizada análise microbiológica (tabela 4) da carne escura fermentada, afim de avaliar a qualidade da mesma.

Tabela 4: Análise microbiológica da carne escura fermentada de atum (*Euthynnus pelamis*).

	2% glicose 2% NaCl	2% glicose 4% NaCl	4% glicose 2% NaCl	4% glicose 4% NaCl
Clostrídios sulfito redutores a 46° C	<10 UFC g ⁻¹	<10 UFC g ⁻¹	<10 UFC g ⁻¹	<10 UFC g ⁻¹
Coliformes a 45° C	<3 NMP g ⁻¹	<3 NMP g ⁻¹	<3 NMP g ⁻¹	<3 NMP g ⁻¹
Estafilococos coagulase positiva	<100 UFC g ⁻¹	<100 UFC g ⁻¹	<100 UFC g ⁻¹	<100 UFC g ⁻¹
<i>Salmonella</i> spp	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

UFC g⁻¹: Unidades Formadoras de Colônia.

NMP g⁻¹: Número Mais Provável.

Os resultados descritos (Tabela 4) atendem aos padrões da Resolução RDC nº 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA- M.S (2001), indicando uma matéria-prima de qualidade aceitável.

4.5 Avaliação sensorial da carne escura de atum

Para a realização da análise sensorial, foram elaborados patês, através de uma formulação básica (anexo I). Após a elaboração, os patês foram submetidos a análise microbiológica, onde os resultados das análises estão apresentados no anexo III. Considerando que as amostras apresentaram qualidade aceitável, realizou-se então a análise sensorial, aplicada pelo teste de comparação múltipla.

O resultado das médias das notas dos 25 julgamentos, do padrão e dos demais tratamentos estão demonstradas na figura 11.

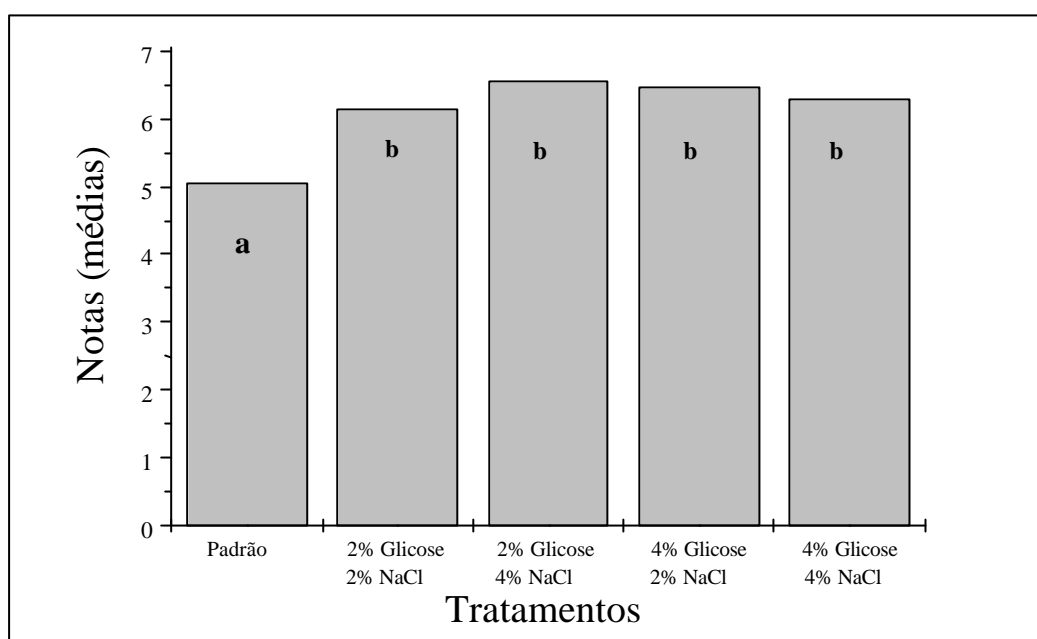


Figura 11: Médias das notas concedidas pelos julgadores ao padrão e aos diferentes tratamentos.

Ao aplicar a Análise de Variância (Anova), observou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos através do nível descritivo ($p < 0,001$).

Aplicando o teste Tukey a nível de 5% de probabilidade, foi observado que todas as amostras de carne escura de atum fermentadas não diferem estatisticamente entre si, porém, todas diferem estatisticamente do padrão. As médias seguidas pela mesma letra, ilustradas na figura 10, indicam que as amostras não possuem diferença estatística.

Observando os resultados, todos os tratamentos obtiveram notas superiores e significativamente diferentes em relação ao padrão, indicando que o sabor amargo diminuiu com inoculação do *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393, possivelmente pela sua ação enzimática sobre os aminoácidos e peptídeos hidrofóbicos durante a fermentação ou então, porque a acidez mascarou o sabor amargo da carne escura.

ARORA e LEE (1990), observaram que linhagens de *L. casei* subsp. *casei*, incluindo o ATCC 393, apresentaram elevada atividade enzimática contra os peptídios amargos (fenilalanina-prolina; prolina-fenilalanina e prolina-isoleucina), importante para a remoção do sabor amargo em queijos maturados. Os autores revelaram que as linhagens possuem atividades específicas e que em geral os *Lactobacillus casei*, tem alta atividade amino- e dipeptidase e baixa tripeptidase.

MARTINEZ-CUESTA et al. (2002) mostraram em seu experimento, que o sistema enzimático desenvolvido por uma linhagem de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, tem potencial considerável para influenciar o desenvolvimento do *flavour* em queijos, devido à ampla especificação da atividade peptidase, o microrganismo está apto a degradar um número considerável de peptídios, incluindo os amargos com elevado conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, como por exemplo, a prolina.

5 CONCLUSÕES

Durante todo período de fermentação, as bactérias lácticas foram predominantes, e o pH diminuiu em todos os tratamentos.

O desempenho da fermentação aumentou quando se elevou o teor de glicose de 2 para 4% e diminuiu com o aumento da concentração de NaCl de 2 para 4%.

A inoculação da carne escura de atum com *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393, favoreceu significativamente a diminuição do sabor amargo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T.; KROCKEL, L. & HILL, C.. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**. v. 28, p. 169-185, 1995.
- ADAMS, M.R; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**. v.8, n.5/6, p.227-239, 1997.
- AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blücher, 1983. 227p.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington, 1992. 1219p.
- AMARITA, F.; REQUENA, T.; TABORDA, G.; AMIGO, L., PELAEZ, C. *Lactobacillus casei* and *plantarum* initiate catabolism of methionine by transamination. **Journal of Applied Microbiology**. v.300, n.6, p.971-978, 2001
- ANTUNES, A.S. **Processamento e enlatamento de bonito e atuns**. Superintendência do Desenvolvimento da Pesca – SUDEPE, Ministério da Agricultura, série documentos técnicos 37, Brasília, 1981.
- ARIHARA K, OTA H, ITOH M, KONDO Y, SAMESHIMA T, YAMANAKA H, AKIMOTO M, KANAI S, MIKI T. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. **Journal of Food Science**, v.63, n.3, p.544-547, 1998.
- ARORA, G & LEE, B. H. Comparative studies on peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.274-279,1990.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed., Washington, 1995. 1141p.

- BADOLATO, E.S.G. et al. Composição centesimal de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.54, n.1, p.27-35, 1994
- BARCINA, Y.; IBANEZ, F.C; ORDONEZ, A.I. **Food Control**, v.16, p.161,1995.
- BEIRÃO, L. H. **Proteolytic digestion of fish flesh during processing with particular reference to minced fish**. Aberdeen, Scotland, 1986. 218p. p.H.D theses – Department of Bioscience and Biotechnology, Food Science Department, University of Strachclyde
- BELITZ, H.D. ET AL. **Sweet and bitter compounds**. In: Food Taste Chemistry Society. p. 175-184, 1979.
- BERTULLO, V.H. **Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos**. Buenos Aires, Editorial Hemisfério Sul, 1975.
- BOIN, C. **Elephant (napier) gras silage production effect of additive on chemical composition nutritive value and animal preformance**. Cornaell1975. 215p. p.H.D theses Faculty of the Gradute School of Cornell University.
- CAPLICE, E. & FITZGERALD, G. F.. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, n.1-2, 1999
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L., LORIENT, D. **Proteínas alimentares**. Zaragoza: Acribia, 1989, 337p.
- CHINNAMMA, G. Biochemical differences between the red and white meat of tuna and changes in quality during freezing and storage. **Fishing Technology**, v.12, p.70-74, 1975.
- CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; FERNANDEZ, M. F.; HERNANDEZ, P. E.. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, n.15, p.289-298, 1998.

- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F. & CHIKINDAS, M. L.. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology** , v.1, n.1, p.1-20, 2001.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E.S., **Bioquímica de pescados e derivados**. Editora FUNEP – UNESP, 1994.
- DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, n.43, p.164-167, 1989.
- DAVIES, V. F. **Influência de antioxidantes e de um encapsulante molecular na qualidade química e sensorial da carne escura cozida de atum**, 2000. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DE MARTINIS, E. C. P. **Isolamento de bactérias ácido lácticas produtoras de bacteriocina e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal**. São Paulo, 1997. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- DE VUYST, L. & VANDAMME, E.J.. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Properties, biosynthesis, fermentation and application. In: De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. Editors, 1994. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic and Professional, London, p. 152-221, 1994.
- DESAI, P., SHETH, T. Controlled fermentation of vegetables using mixed inoculum of lactic cultures. **Journal Food Science Technology**, v.34, n.2, p.155-158, 1997.
- ESMINGER, A.H.; ESMINGER, M. E.; KONLANDE, J.E & ROBSON, R.K. **Food & Nutrition Encyclopedia**. 2 edition, 1994.
- FIorentini, A. M. **Influência de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN na vida útil da carne bovina refrigerada**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- GELMAN, A.; DRABKIN, V.; GLATMAN, L. Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from lightly preserved fish products, as starter cultures for new fish-based food products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.1, p. 219-226, 2001.
- GOLBERG, I.; WILLIAMS, R. **Biotechnology and food ingredients**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p.577
- GONZÁLES-FERNANDEZ, C.; SANTOS, E.M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Utilización de cultivos iniciadores en la elaboración de chorizo y su influencia en las propiedades sensoriales. **Food Science and Technology International**, v.3, n.1, p.31-32, 1997.
- GUAGLIA, G. B. & MAIORANO, R. Preparazione di un lisato proteico dai sottoprodotti della lavorazione del tonno sott'olio. **Industrie Alimentari**, p.931-935, dicembre, 1980.
- HAMM, R. Heating of muscle systems. In: **Response to physical and chemical treatment**. Madison: University of Wisconsin Press, 1966, p 363-385.
- HAMMES, W.P. Bacterial starter cultures in food production. **Food Biotechnology**. v.4, p.383-387, 1990.
- HICKMAN, C.P.J.; ROBERTS, L.S.; HICHAMAN, F.M. The Fishes. In: **Integrated Principles of Zoology**. 7 ed. St Louis: Times Mirror/ Mosby College, 1984. 518 p.
- HOOVER, D. G. & STEENSON, L.R.. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. London: Academic Press Inc. 1993.
- HUANG, C.C & LIN, C.W.. Change in quality of Chinese-style sausage inoculated with Lactic acid bacteria during storage at 3 °C and 25 °C. **Journal of Food Protection**. v.58, n.1., p.1227-1233, 1995
- HUGAS, M. Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. **Meat Science**, v.49, p.139-150, 1998.

- IJONG, F. A. & OHTA, Y.. Physicochemical and microbiological changes associated with Bakasang processing – A traditional Indonesian fermented fish sauce. **Journal Science Food Agriculture**, n.1, v.71, p.69-74, 1996.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R. & RAY, B.. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, n.2, p.171-200, 1995.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5. ed. London: Chapman & Hall, 1996.
- KANDLER, O., WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck, 1901. **Bergey' Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, p.1226, 1986.
- KANO, S.; POLO, J.M.A.; KARIYA, Y.; KANEKO, T.; WATABE, S.; HASHIMOTO, K. Heat induced textural and histological changes of ordinary and dark muscles of yellowfin tuna. **Journal of Food Science**, v.53, n.3, p.673-678, 1988.
- KIRIMURA, J.; SHIMIZU, A.; KIMIZUKA, A.; NINOMIYA, N. The contribution of peptides and amino acids to the taste of food stuffs. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.17, p.689-695, 1969.
- KONINGS, W. N.; KOK, J.; KUIPERS, O. P. & POOLMAN, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, n.3, p.276-282, 2000.
- LERICHE, V.; CHASSAING, D., & CARPENTIER, B. Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a Nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.51, n.2-3, 1999.
- LEROI. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.497-504, 1996.
- MAHAN, K.; ARLIN, M.T. Krause – **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8 ed. São Paulo, Roca, 1995.

- MARTIN, R.E; FLICK, G.J. Pelagic Fish. In: **The Seafood Industry**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. 67 p.
- MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; PALENCIA DE, P.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 for flavour development in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p.577-585, 2001.
- MAZO, J.Z. **Detecção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN em melaço de cana-de-açúcar sob fermentação submersa.**, 1999. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MENSAH P, TOMKINS AM, DRASAR BS, HARRISON TJ Antimicrobial effect of fermented ghanaiian maize dough. **Journal of Applied Bacteriology**. v.70, n.3, p.203-210, 1991.
- MISHRA, C. & LAMBERT, J.. Production of anti-microbial substances by probiotics. **Asia Pacific Journal Clin. Nutr.** v.5, p.20-24 ,1996
- MOK, J., MIYAMOTO, T., KATAOKA, K. Properties of antibacterial substance produces by wild *Lactobacillus* strains IMC-1 from inner Mongolian cheese. **Animal Science Technology**, v.69, n.8, p.768-778, 1998.
- MONTGOMERY, D.C. **Desining and Analisis of Experiments**. 4° ed. New York: Jonh Wiley & Sons, 1996, 704p.
- MORZEL, M.; FRANSEN, N.G.; ELKE, K.A. Defined starter cultures used for fermentation of salmon fillets. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.6, p.1214-1218, 1997.
- MUKUNDAN, M.K.; JAMES, M.A.; RADHAKRISHNANA; ANTONY, P.D. Red and white meat of tuna (*Euthynnus affinis*). Their Biochemical Role and Nutrition Quality. **Fishing Technology**, v.16, n.2, p.77-82, 1979.
- NEY, K.R. Bitterness of Peptides: Amino Acid composition and Chain Lenght. **American Chemical Society**, p. 149-173, 1979.

- PALUDAN - MÜLLER, C. et al. Fermentation and microflora of *plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.61-70, 2002.
- PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Technology**, p.96-98, 1994
- PEREZ-VILLARREAL, B & POZO, R.. Chemical composition and Ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). **Journal of Food Science**. v 55, p. 678-682, 1990.
- PIARD, J. C., DESMAZEAUD. M. Inhibiting factor produce by lactic acid bacteria: bactericins and other antibacterial substancies. **Agricultural Economics and Policy: International Challenges for the Nineties**, v.72, n. 2, p.33-142, 1992.
- PIGOTT, G. M.; TUCKER, B.M. Lipids on seafood. In: **Seafood: Effects of Technology on Nutrition** New York: Marcel Dekker Incorporation, p.262, 1990
- RAY, B., & DAESCHEL, M.. **Food biopreservatives of microbiological origin**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla ,1992.
- REGENSTEIN, J.M. & REGENSTEIN, C.E. Introduction to fish tecnology. **The Chemical Biology of Fishes**. New York, publised by Van Nostrand Reinhold, , 1991. 175p.
- RIVERA, M. J. G. N. **Utilização de resíduos da indústria pesqueira de atum para elaboração de patê como um produto rentável**, 1994. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- ROMIO, R. C. **Caracterização química de carne escura e carne clara de atum (*Katsuwonus pelamis*) – Elaboração e análise sensorial de patês destinados ao consumo humano a partir da carne escura, resíduo da indústria atuneira**, 1999. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SAHA, B. C. & HAYASHI, K. Debittering of protein hydrolyzates. **Biotechnology Advances**, v.19, p.355-370, 2001.

SAS INSTITUTE INC. Sas Campos Drive. Cary, NC, USA. SAS Institute Inc. **SAS System for Windows**, versão 6.12, 1996

SGARBIERI, V. C. Propriedades, degradações, modificações. In: **Proteínas em Alimentos Protéicos**. São Paulo: Varela, p.312-335, 1996.

SHARP, G.D. & HRAGES, S. III The distribution of red and white swimming muscles, their biochemistry, and the biochemical phylogeny of selected scombrid fishes. **The Physiological Ecology of tunas**. Academic Press p.41-78, 1978.

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

STONE, H. & SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 2^a ed. Academic Press – San Diego, California – USA. p.143-242, 1993.

SUZUKI, C.R.. Guia de peixes do litoral brasileiro, 1983.

SUZUKI, T. **Fish and Krill protein. Processing Technology**. London: Applied Science, 1981

TAMURA, M.; MORI, N.; MIYOSHI, T.; KOHRI, H.; OKAI, H. Practical debittering using model peptides and related compounds. **Agriculture Biological Chemistry**, v.54, n.1, p.41-51, 1990.

TANASUPAWAT, S., HASHIMOTO, Y., EZAKI, T., KOZAKI, M., KOMAGATA, K. Identification of *Staphylococcus carnosus* strains from fermented fish and soy sauce mash. **Journal. Gen. Appl. Microbiol.**, v.37, p.479-494, 1991.

_____, HASHIMOTO, Y., EZAKI, T., KOZAKI, M., KOMAGATA, K. Identification of *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from fermented fish in Thailand. **International Journal. Syst. Bacteriol** V.42, p.577-581, 1992.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. & BARBETTA, P.A **Análise sensorial de alimentos**. Ed. UFSC, Florianópolis, 1987.

TODD, E.C.D.. Preliminary estimates of foodborne disease in United States. **Journal of Protection.** v.52, p.234-239, 1989.

UM, M.-N., LEE, C.-H., Isolation and identification of *Staphylococcus* sp. from Korean fermented fish products. **J. Microbiol. Biotechnol** v.6, p.340-346, 1996.

ANEXOS

Anexo I**Formulação básica do patê**

Ingredientes	Porcentagem (%)
Carne escura de atum	37
Óleo	13
Água	20
Gema de ovo	9,0
Amido	10
Açúcar	1,0
Pimenta do reino	0,2
Cebola	2,0
Leite em pó	5,0
Alho	1,5
Sal	1,2

Anexo II

Teste de Comparação Múltipla

Nome: _____ Data: ___/___/___

- Você está recebendo uma amostra identificada como Padrão (P) e mais outras codificadas.
- Compare cada amostra e identifique se é melhor, igual ou inferior somente em relação ao sabor amargo, utilizando o seguinte critério:

1 = extremamente inferior que o padrão;

5 = igual ao padrão;

9 = extremamente melhor que o padrão.

	CÓDIGO DAS AMOSTRAS			
ESCALA				
Igual ao P				
Melhor que P				
Inferior ao P				

	CÓDIGO DAS AMOSTRAS			
GRAU DE DIFERENÇA				
Nenhuma diferença do P				
Leve diferença do P				
Regular diferença do P				
Extrema diferença do P				

Comentário adicional: _____

Anexo III

Certificados de Análise dos patês elaborados para realização da análise sensorial



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
COORDENADORIA DE EXTENSÃO
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES

Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 334-2047 / 334-4888 - E-mail: labcal@cca.ufsc.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Protocolo: 2085

Data de Entrada: 24/06/2002

Nome do Produto: **PATÊ DE ATUM (AMOSTRA A)**

Data de Fabricação: 23/06/2002

Data de Vencimento:

Marca:

Nº do Lote:

N. Amostras: 1

Peso ou Volume/Unidade: 0200 gramas

Fabricante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Solicitante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Responsável: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Av./Rua: Rod. Admar Gonzaga 1346

Complemento:

Bairro: Itacorubi

CEP: 88034001

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CGC/CPF: 11579874932

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DAS ANÁLISES

MICROBIOLOGIA

Analista : Eliane Bressa Dalcin

Clostrídios sulfito redutores a 46°C

< 10 UFC/g

Coliformes a 45°C

< 3 NMP/g

Estafilococos coagulase positiva

< 100 UFC/g

Salmonella spp

Ausência em 25g

CONCLUSÃO

Amostra satisfaz os padrões de qualidade quanto aos parâmetros analisados

Florianópolis-SC, 1 de Julho de 2002

Obs.: Este CERTIFICADO DE ANÁLISE, refere-se somente ao material submetido à análise e não poderá ser reproduzido, total ou parcialmente, sem a prévia autorização por escrito do CAL.

Drª Cleide Rosana Vieira Batista - CRF 1042

Coordª. do Núcleo de Microbiologia em Alimentos

CAL/CCA/UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
COORDENADORIA DE EXTENSÃO
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES

Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 334-2047 / 334-4888 - E-mail: labcal@cca.ufsc.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Protocolo: 2086

Data de Entrada: 24/06/2002

Nome do Produto: **PATÊ DE ATUM (AMOSTRA B)**

Data de Fabricação: 23/06/2002

Data de Vencimento:

Marca:

Nº do Lote:

N. Amostras: 1

Peso ou Volume/Unidade: 0150 gramas

Fabricante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Solicitante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Responsável: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Av./Rua: Rod. Admar Gonzaga 1346

Complemento:

Bairro: Itacorubi

CEP: 88034001

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CGC/CPF: 11579874932

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DAS ANÁLISES

MICROBIOLOGIA

Analista : Eliane Bressa Dalcin

Clostrídios sulfito redutores a 46°C

< 10 UFC/g

Coliformes a 45°C

< 3 NMP/g

Estafilococos coagulase positiva

< 100 UFC/g

Salmonella spp

Ausência em 25g

CONCLUSÃO

Amostra satisfaz os padrões de qualidade quanto aos parâmetros analisados

Florianópolis-SC, 1 de Julho de 2002

Obs.: Este CERTIFICADO DE ANÁLISE, refere-se somente ao material submetido à análise e não poderá ser reproduzido, total ou parcialmente, sem a prévia autorização por escrito do CAL.


Drª Cleide Rosana Vieira Batista - CRF 1042

Coord.ª do Núcleo de Microbiologia em Alimentos

CAL/CCA/UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
COORDENADORIA DE EXTENSÃO
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES

Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 334-2047 / 334-4888 - E-mail: labcal@cca.ufsc.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Protocolo: 2087

Data de Entrada: 24/06/2002

Nome do Produto: **PATÉ DE ATUM (AMOSTRA C)**

Data de Fabricação: 23/06/2002

Data de Vencimento:

Marca:

Nº do Lote:

N. Amostras: 1

Peso ou Volume/Unidade: 0200 gramas

Fabricante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Solicitante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Responsável: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Av./Rua: Rod. Admar Gonzaga 1346

Complemento:

Bairro: Itacorubi

CEP: 88034001

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CGC/CPF: 11579874932

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DAS ANÁLISES

MICROBIOLOGIA

Analista : Eliane Bressa Dalcin

Clostrídios sulfito redutores a 46°C

< 10 UFC/g

Coliformes a 45°C

< 3 NMP/g

Estafilococos coagulase positiva

< 100 UFC/g

Salmonella spp

Ausência em 25g

CONCLUSÃO

Amostra satisfaz os padrões de qualidade quanto aos parâmetros analisados

Florianópolis-SC, 1 de Julho de 2002

Obs.: Este CERTIFICADO DE ANÁLISE, refere-se somente ao material submetido à análise e não poderá ser reproduzido, total ou parcialmente, sem a prévia autorização por escrito do CAL.


Drª Cleide Rosana Vieira Batista - CRF 1042

Coord. do Núcleo de Microbiologia em Alimentos

CAL/CCA/UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
COORDENADORIA DE EXTENSÃO
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES

Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 334-2047 / 334-4888 - E-mail: labcal@cca.ufsc.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Protocolo: 2088

Data de Entrada: 24/06/2002

Nome do Produto: **PATÊ DE ATUM (AMOSTRA D)**

Data de Fabricação: 23/06/2002

Data de Vencimento:

Marca:

Nº do Lote:

N. Amostras: 1

Peso ou Volume/Unidade: 0200 gramas

Fabricante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Solicitante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Responsável: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Av./Rua: Rod. Admar Gonzaga 1346

Complemento:

Bairro: Itacorubi

CEP: 88034001

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CGC/CPF: 11579874932

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DAS ANÁLISES

MICROBIOLOGIA

Analista : Eliane Bressa Dalcin

Clostrídios sulfito redutores a 46°C

< 10 UFC/g

Coliformes a 45°C

< 3 NMP/g

Estafilococos coagulase positiva

< 100 UFC/g

Salmonella spp

Ausência em 25g

CONCLUSÃO

Amostra satisfaz os padrões de qualidade quanto aos parâmetros analisados

Florianópolis-SC, 1 de Julho de 2002

Obs.: Este CERTIFICADO DE ANÁLISE, refere-se somente ao material submetido à análise e não poderá ser reproduzido, total ou parcialmente, sem a prévia autorização por escrito do CAL.


Drª Cleide Rosana Vieira Batista - CRF 1042

Coordª. do Núcleo de Microbiologia em Alimentos

CAL/CCA/UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL
COORDENADORIA DE EXTENSÃO
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES

Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001
Fone/fax: (48) 334-2047 / 334-4888 - E-mail: labcal@cca.ufsc.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Protocolo: 2089

Data de Entrada: 24/06/2002

Nome do Produto: **PATÊ DE ATUM (CONTROLE)**

Data de Fabricação: 23/06/2002

Data de Vencimento:

Marca:

Nº do Lote:

N. Amostras: 1

Peso ou Volume/Unidade: 0150 gramas

Fabricante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Solicitante: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Responsável: FABIANO CLEBER BERTOLDI

Av./Rua: Rod. Admar Gonzaga 1346

Complemento:

Bairro: Itacorubi

CEP: 88034001

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CGC/CPF: 11579874932

Inscrição Estadual:

Observações Gerais:

RESULTADOS DAS ANÁLISES

MICROBIOLOGIA

Analista : Eliane Bressa Dalcin

Clostrídios sulfito redutores a 46°C

< 10 UFC/g

Coliformes a 45°C

< 3 NMP/g

Estafilococos coagulase positiva

< 100 UFC/g

Salmonella spp

Ausência em 25g

CONCLUSÃO

Amostra satisfaz os padrões de qualidade quanto aos parâmetros analisados

Florianópolis-SC, 1 de Julho de 2002

Obs.: Este CERTIFICADO DE ANÁLISE, refere-se somente ao material submetido à análise e não poderá ser reproduzido, total ou parcialmente, sem a prévia autorização por escrito do CAL.


Drª Cleide Rosana Vieira Batista - CRF 1042

Coordª. do Núcleo de Microbiologia em Alimentos

CAL/CCA/UFSC