

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA - HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL

EDIVALDO SAMPAIO DE ALMEIDA
FILHO

COMPORTAMENTO DE MICROBIOTA
RESIDENTE, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia*
enterocolitica, E *Listeria monocytogenes*
INOCULADAS EM CARNE DE ATUM (*Thunnus*
albacares), ESTOCADA SOB REFRIGERAÇÃO
($0\pm 1^{\circ}\text{C}$) EM DIFERENTES ATMOSFERAS
MODIFICADAS

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

Niterói-RJ
2006

EDIVALDO SAMPAIO DE ALMEIDA FILHO

Título: COMPORTAMENTO DE MICROBIOTA RESIDENTE, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, E *Listeria monocytogenes* INOCULADAS EM CARNE DE ATUM (*Thunnus albacares*), ESTOCADA SOB REFRIGERAÇÃO ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) EM DIFERENTES ATMOSFERAS MODIFICADAS.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor. Área de concentração em Higiene Veterinária e processamento tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA (Orientador)
Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO (Co-orientador)

Niterói-RJ
2006

EDIVALDO SAMPAIO DE ALMEIDA FILHO

Título: COMPORTAMENTO DE MICROBIOTA RESIDENTE, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, E *Listeria monocytogenes* INOCULADAS EM CARNE DE ATUM (*Thunnus albacares*), ESTOCADA SOB REFRIGERAÇÃO ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) EM DIFERENTES ATMOSFERAS MODIFICADAS.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor. Área de concentração em Higiene Veterinária e processamento tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 31 de janeiro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Pros. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. SERGIO BORGES MANO
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS DE LIMA
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. GERMANO FRANCISCO BIONDI
Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. VALÉRIA MOURA DE OLIVEIRA
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Niterói-RJ
2006

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Lea Maria Brandão de Almeida por dedicar uma vida inteira a seus filhos e neta.

A minha irmã Simone, por sempre estar ao meu lado nas horas difíceis.

Aos meus amigos Renata Medeiros, Micheli Ferreira, Fábio Áscoli (binho), e Sandro, pelo carinho, amizade, lealdade e companheirismo. Tenham a certeza de que a reciprocidade será eterna.

A minha amiga especial Cleise de Oliveira Sigarini, pelo carinho, companheirismo e lealdade em todos esses anos de amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira, pela competente orientação, e amizade nos 4 anos de curso.

Ao secretário de pós-graduação Drausio de Paiva Ferreira pela amizade demonstrada nesses 4 anos de convívio.

Ao secretário de pós-graduação José Luiz Gomes de Azevedo pela amizade e orientações geográficas sobre Niterói.

A profa. Dra. Mônica Queiroz de Freitas, pela ajuda na parte estatística deste estudo.

A aluna de graduação e bolsista PIBIC Juliana de C. B. da Costa pela grande ajuda no desenvolvimento deste estudo.

Às amigadas conquistadas nesses 4 anos de curso, maior vitória nesta etapa da minha vida, muito obrigado:

Agostinho (Lagosta)

Alessandra Ferreira

Carla

Carmela Kasnoswski

Carolina Pombo

Cecília Pombo

Carlos Frederico

Claudinha (Bonjour)

Fernanda Xavier

John

Marcelo D2

Marivaldo Figueiró

Patricia Maria Rocha Gonçalves

Priscila Firmino

Tatiana Pereira (Tica)

Aos demais colegas de curso, que contribuíram de alguma maneira para este resultado final.

Aos professores Iacir Francisco dos Santos, Teófilo José Pimentel, Zander Barreto de Miranda, Sergio Carmona de São Clemente, Eliana de Fátima Mesquita, Mônica Queiroz de Freitas, Elmo Rampini de Souza, Francisco Carlos de Lima, Luiz Antônio Trindade de Oliveira, Geraldo Abreu de Oliveira, e Marco Antônio Sloboda pela contribuição que deram à minha formação profissional.

“Só a luta dá sentido à vida, o triunfo ou a derrota está nas mãos de Deus, então,
celebrems a luta”

Canção de guerra Suaili, Comores, África.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES,	p12
LISTA DE TABELAS,	p14
LISTA DE ABREVIATURAS,	p17
RESUMO,	P. 19
ABSTRACT,	P.20
1 INTRODUÇÃO,	P.21
2 REVISÃO DE LITERATURA,	p, 25
2.1 O pescado como alimento,	p.25
2.2 Fatores predisponentes da rápida deterioração do pescado,	p.26
2.3 Modificações <i>post mortem</i> do pescado,	p. 28
2.4 Contaminações do pescado,	p.30
2.4.1 Contaminação bacteriana,	p.30
2.5 Métodos de conservação do pescado,	p.35
2.5.1 Refrigeração,	p.35
2.5.2 Congelamento,	p.36
2.6 Embalagens em atmosferas empregadas e diferentes tipos de gases empregados,	p.37
2.6.1 Outros tipos de gases,	p.41
2.6.2 Características do material de envase,	p.42
2.6.3 Vantagens e desvantagens de atmosferas modificadas na conservação do pescado fresco,	p.43
2.6.4 Microbiota contaminante de pescado embalado sob atmosferas modificadas,	p.45
2.6.5 Patógenos em pescado embalado sob atmosfera modificada	p.46
2.6.5.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> ,	p.47
2.6.5.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> ,	p. 52
2.6.5.3 <i>Listeria monocytogenes</i> ,	p. 57
3 MATERIAL E MÉTODOS,	p.63
3.1 Colheita e transporte de amostras,	p.63
3.2 Microrganismos patogênicos utilizados,	p.64
3.3 Preparo do inóculo,	p.64
3.4 Preparação da amostra,	p.65

- 3.5 Preparação das diluições, p.65
- 3.6 Material de envase, p.66
- 3.7 Plaqueamento, p.66
- 3.8 Análises bacteriológicas, p.67
 - 3.8.1 Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, p.67
 - 3.8.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, p.67
 - 3.8.3 Contagem de bactérias lácticas, p.67
 - 3.8.4 Contagem de *Yersinia enterocolitica*, p.68
 - 3.8.5 Contagem de *Aeromonas hydrophila*, p.68
 - 3.8.6 Contagem de *Listeria monocytogenes*, p.68
- 3.9 Análise dos resultados, p.69

4 RESULTADOS, p.71

- 4.1 Amostra controle, p.71
 - 4.1.1 Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, p.72
 - 4.1.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, p.72
 - 4.1.3 Contagem de bactérias lácticas, p.73
- 4.2 *Aeromonas hydrophila*, p.73
 - 4.2.1 Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, p.73
 - 4.2.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, p.74
 - 4.2.3 Contagem de bactérias lácticas, p.74
 - 4.2.4 Contagem de *Aeromonas hydrophila*, p.75
- 4.3 *Listeria monocytogenes*, p.75
 - 4.3.1 Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, p.76
 - 4.3.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, p.76
 - 4.3.3 Contagem de bactérias lácticas, p.77
 - 4.3.4 Contagem de *Listeria monocytogenes*, p.77
- 4.4 *Yersinia enterocolitica*, p.78
 - 4.4.1 Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, p.78
 - 4.4.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, p.78
 - 4.4.3 Contagem de bactérias lácticas, p.79
 - 4.4.4 Contagem de *Yersinia enterocolitica*, p.80

5. DISCUSSÃO, p.81
5.1 Microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, p.81
5.1.1 Contaminações iniciais, p.81
5.1.2 Fases de latência, p.82
5.1.3 Tempos de duplicação, p.84
5.1.4 Vida útil do pescado, p.85
5.2 <i>Enterobacteriaceae</i> , p.86
5.2.1 Considerações gerais, p. 85
5.2.2 Contaminações iniciais, p.86
5.2.3 Comportamento sob EAM, p.87
5.3 Bactérias lácticas, p.88
5.3.1 Considerações gerais, p.88
5.3.2 Contaminações iniciais, p.88
5.3.3 Comportamento bacteriano, p.89
5.3.4 Vida útil do pescado, p.90
5.4 <i>Aeromonas hydrophila</i> , p.91
5.4.1 Contaminação inicial, p.91
5.4.2 Comportamento durante a estocagem, p.91
5.4.3 Risco sanitário, p.92
5.5 <i>Listeria monocytogenes</i> , p.93
5.5.1 Contaminação inicial, p.93
5.5.2 Comportamento durante a estocagem, p.93
5.5.3 Risco sanitário, p.95
5.6 <i>Yersinia enterocolitica</i> , p.95
5.6.1 Contaminação inicial, p.95
5.6.2 Comportamento durante a estocagem, p.96
5.6.3 Risco sanitário, p.97
6 CONCLUSÕES, p.99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.100
8 ANEXOS, p. 114

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 4.1 – Desenvolvimento de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum, p.125

Gráfico 4.2 – Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum, p. 125

Gráfico 4.3 – Desenvolvimento de bactérias láticas em carne de atum, p. 126

Gráfico 4.4 – Desenvolvimento de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum, p. 126

Gráfico 4.5 – Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum, p. 127

Gráfico 4.6 – Desenvolvimento de bactérias láticas em carne de atum, p.127

Gráfico 4.7 – Desenvolvimento de *A. hydrophila* em carne de atum, p.128

Gráfico 4.8 – Desenvolvimento de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum, p.128

Gráfico 4.9 – Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum, p.129

Gráfico 4.10 – Desenvolvimento de bactérias lácticas em carne de atum, p.129

Gráfico 4.11 – Desenvolvimento de *L. monocytogenes* em carne de atum, p.130

Gráfico 4.12 – Desenvolvimento de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum, p.130

Gráfico 4.13 – Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum, p.131

Gráfico 4.14 – Desenvolvimento de bactérias lácticas em carne de atum, p.131

Gráfico 4.15 – Desenvolvimento de *Y. enterocolitica* em carne de atum, p.132

Gráfico 4.16 – Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em ar, p.133

Gráfico 4.17 – Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em vácuo, p.133

Gráfico 4.18 – Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em 40/60 CO₂/N₂, p.133

Gráfico 4.19 – Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em 80/20 CO₂/N₂, p.134

Gráfico 4.20 – Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em 100% CO₂, p.134

Figura 01 – Amostra de atum proveniente da região da bacia de Campos, litoral do Estado do Rio de Janeiro, em excelente estado de frescor, p.135

Figura 02 – Aferição intramuscular da temperatura da amostra, p.136

Figura 03 – Local de pesca das amostras na bacia de Campos, litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, p.136

Figura 04 – Acondicionamento da amostra em caixa de polímero expandido isotérmico contendo gelo, p.137

Figura 05 – Retirada da amostra da caixa de material isotérmico no laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF, p.138

Figura 06 – Preparo da amostra para segmentação do lombo (*Longissimus dorsi*), p.139

Figura 07 – Amostra com lombo segmentado para posterior segmentação, p.140

Figura 08 – Lombo (*Longissimus dorsi*) retirado higienicamente aguardando segmentação, p.141

Figura 09 – Segmentação do lombo (*Longissimus dorsi*) em porções de aproximadamente 50g, p.142

Figura 10 – Porção de lombo em bolsa plástica, p.143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comportamento bioquímico de *A. hydrophila*, p.61

Tabela 2 - Comportamento bioquímico de *Y. enterocolitica*, p.62

Tabela 3 - Comportamento bioquímico de *L. monocytogenes*, p.62

Tabela 4.1 – Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) e taxa máxima de crescimento (Tx Máxima) de *A. hydrophila* e da microbiota contaminante, p.114

Tabela 4.2 – Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) e taxa máxima de crescimento (Tx Máxima) de *L. monocytogenes* e da microbiota contaminante, p.115

Tabela 4.3 – Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) e taxa máxima de crescimento (Tx Máxima) de *Y. enterocolitica* e da microbiota contaminante, p.116

Tabela 4.4 – Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) e taxa máxima de crescimento (Tx Máxima) de *Enterobacteriaceae*, bactérias lácticas, e heterotróficos aeróbios mesófilos que fazem parte da microbiota contaminante do pescado, p.117

Tabela 4.5 – Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra controle, p.117

Tabela 4.6 – Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* efetuadas na amostra controle, p.118

Tabela 4.7 – Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra controle, p.118

Tabela 4.8 – Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra inoculada com cepa de *A hydrophila*, p.118

Tabela 4.9 – Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* efetuadas na amostra inoculada com cepa de *A hydrophila*, p.119

Tabela 4.10 – Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra inoculada com cepa de *A hydrophila*, p.119

Tabela 4.11 – Resultados das análises da amostra inoculada com cepa de *A hydrophila*, p.119

Tabela 4.12 – Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes*, p.120

Tabela 4.13 – Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* efetuadas na amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes*, p.120

Tabela 4.14 – Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes*, p.120

Tabela 4.15 – Resultados das análises da amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes*, p.121

Tabela 4.16 – Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica*, p.121

Tabela 4.17 – Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* efetuadas na amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica*, p.121

Tabela 4.18 – Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica*, p.122

Tabela 4.19 – Resultados das análises da amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica*, p.122

Tabela 4.20 – Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera ar, p.122

Tabela 4.21 – Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera vácuo, p.123

Tabela 4.22 – Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera 40/60 CO₂/N₂, p.123

Tabela 4.23 – Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera 80/20 CO₂/N₂, p.123

Tabela 4.24 – Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera 100% CO₂, p.124

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ICCAT - International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna
YFT - Yellowfin Tuna
FAO - Food and Agricultural Organization
IOC-FDA - Food and Drug Administration
ATCC – American Type Culture Collection
AVC – Acidente Vascular Cerebral
EPA – Eicosapentaenóico
DHA – Docosahexaenóico
 $\omega 3$ – Ômega 3
OMS – Organização Mundial de Saúde
OTMA – Óxido de Trimetilamina
ATP – Adenosina Trifosfato
CP – Creatina fosfato
Pi – Fósforo Inorgânico
ADP – Adenosina Difosfato
AMP – Adenosina Monofosfato
IMP – Inosina Monofosfato
RS – Reticulo Sarcoplasmático
 A_w – Atividade de Água
DAO – Diamina Oxidase
HMT – Histamina N-Metiltransferase
DDT – Diclorodifeniltricloroetano
BHC – Hexaclorobenzeno
EAM – Embalagem em Atmosfera Modificada
PE – Polietileno
PA – Poliamida
PP – Polipropileno
PS – Poliestireno
PVC – Cloreto de polivinil
PVDC – Cloreto de Polivinileno
PET – Poliéster
EVOH – Etilvinil Álcool

BBL4 – Código Industrial
PCA – Plate Count Agar
BHI – Brain Heart Infusion
LPS – Lipopolissacarídeo
CGAT – Glicerofosfolípídeo- Colesterol- Aciltransferase
LLO – Hemolisina Listeriolisina O
RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UFF – Universidade Federal Fluminense
TSB – Trypticase Soy Broth
INPM – Instituto Nacional de Pesos e Medidas
VRBG – Violet Red Bile Glucose
APT – Agar Polisorbato Tiamina
GSP – Glutamate Starch Phenol Agar Base
TD – Tempo de Duplicação
Tx – Taxa Máxima de crescimento

RESUMO

O pescado é um alimento altamente perecível e sujeito à contaminações bacterianas, sendo necessárias medidas tecnológicas no sentido de melhorar sua qualidade e aumentar a vida útil do produto. A utilização do frio em conjunto com embalagem em atmosfera modificada propicia maior segurança, além de aumentar o tempo de vida de prateleira do pescado. Neste estudo procurou-se verificar o comportamento de microbiota residente, e de *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* inoculadas em carne de atum (*Thunnus albacares*) estocada sob refrigeração ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) nas atmosferas ar, vácuo, 40/60 CO_2/N_2 , 80/20 CO_2/N_2 , e 100% CO_2 . Foram utilizadas quatro amostras, sendo que em uma não foi inoculado nenhum patógeno, sendo feitas determinações de bactérias naturais e residentes, e nas outras foram feitas as mesmas análises e ainda inoculado um patógeno em cada. Os resultados demonstraram haver média inibição de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e bactérias lácticas, enquanto *Enterobacteriaceae* Os grupos bacterianos contaminantes analisados foram heterotróficos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, e bactérias lácticas. Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e lácticas não apresentaram grande inibição frente às condições de estocagem. Os efeitos das atmosferas modificadas no crescimento bacteriano foram discutidos, e foi observada intensa inibição de *Enterobacteriaceae*, e de todos os patógenos inoculados, com redução de dois a quatro ciclos logarítmicos. Esta inibição foi provavelmente devido a uma junção de fatores, como o efeito do CO_2 , a ausência ou diminuição do O_2 , a baixa temperatura utilizada, e a competição bacteriana. A atmosfera mais eficiente na inibição do crescimento dos patógenos foi a 40/60 CO_2/N_2 .

ABSTRACT

The seafood is highly perishable and there's many sources of bacterial contamination, so, the technology is necessary to improve quality and shelf life. The use of low temperatures associated with modified atmosphere package become more safety seafood, improving the shelf life too. In this work the behavior of the indigenous microorganisms and *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* inoculated in tuna fish (*Thunnus albacares*) stored in $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ on modified atmospheres (air, vacuum, 40/60 CO_2/N_2 , 80/20 CO_2/N_2 , and 100% CO_2 .) was observed. The indigenous microorganisms studied was heterotrophic aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae* and acid lactic bacteria. The heterotrophic aerobic mesophilic and acid lactic bacteria wasn't show inhibition during storage. The effects of modified atmospheres on the growth of microorganisms was discussed, and was high inhibition of *Enterobacteriaceae* and all the pathogens, from two to four log cycles. This inhibition was probably because the CO_2 effect, the low level of the O_2 , the temperature ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and the microorganism competition. The atmosphere 40/60 CO_2/N_2 , was the most powerfull to inhibition of growth of pathogens.

1 - INTRODUÇÃO

Cerca de 70% da superfície do planeta é recoberta de água dos oceanos, representando um total de 1 bilhão e 400 milhões de quilômetros cúbicos de água, sendo que 97% desse montante são águas salgadas e apenas 3% são compostas de águas doces, e destes apenas 22% pode ser utilizada pelo homem, pois o resto está congelado nas calotas polares, em neves eternas ou se encontram em lugares inacessíveis (A ÁGUA ..., 2004).

O Brasil se encontra em posição bastante confortável, em virtude de possuir aproximadamente 15% do estoque de água doce utilizável do planeta, além de ter uma extensão costeira de cerca de 8000 Km (MOTTA; GUERREIRO, 2004).

Apesar de toda a disponibilidade de águas, e condições climáticas favoráveis, com possibilidade de produção pesqueira o ano todo, o Brasil, no entanto está praticamente estagnado, ocupando atualmente apenas a 25^a posição no “ranking” mundial, com 1,05 milhões de toneladas obtidas em 2003, sendo a aquicultura responsável por 25% deste montante. A China é o maior produtor com 40 milhões de toneladas em 2003 (UMA ANÁLISE...,2006).

Mesmo diante desta situação, o Brasil pode intensificar sua produção e também suas exportações em um mercado que movimenta algo em torno de US\$ 55 bilhões. Uma política de incentivos ao produtor de pescado no Brasil permite avaliar que, a longo prazo, é possível dominar por volta de 20% desse mercado, o que significa divisas da ordem de US\$ 11 bilhões. O mesmo avanço não pode ocorrer,

por exemplo, com a carne bovina e a de frango, pois o Brasil já é detentor de 20% e 30% dos mercados mundiais, respectivamente (ELIAS, 2004).

Segundo Matias (2004), o setor pesqueiro nacional passou de um “déficit” de US\$ 322,93 milhões em 1998 para um “superávit” de US\$ 222,67 milhões já em 2003. Para 2005, esperava-se um aumento de 12% e o alcance de cerca de US\$ 460 milhões, com lucro de US\$ 300 milhões. Os principais mercados importadores brasileiros são os Estados Unidos da América do Norte, a União Européia e o Japão.

Dentro desse quadro, a pesca de atuns e afins destaca-se pela elevada aceitação destes junto aos consumidores, e também pela importância econômica desses recursos.

A pesca de atuns e afins teve início no ano de 1956 no litoral de Pernambuco com barcos utilizando a pesca em espinhel com bons resultados. Esta atividade foi explorada até 1964 quando, por problemas de ordem financeira foi paralisada, resultando no deslocamento da frota para outras bases do Atlântico. Em 1966 alguns barcos atuneiros baseados em Santos-SP reiniciaram a pesca, mas os resultados não foram satisfatórios, em virtude de restrições de conhecimento tecnológico. A partir de 1977 passaram a operar em águas brasileiras alguns barcos arrendados de origem asiática e a pesca de atuns e afins deu um salto de produtividade, e em 1979 iniciou-se a pesca pelo método de “isca viva”. A “International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna” (ICCAT) é o órgão encarregado de administrar a atividade ao nível mundial (BRASIL, 1997).

A produção brasileira de atuns e afins em 2003 girou em torno de 49 mil toneladas. Este baixo resultado não se justifica em absoluto, pois o Brasil se encontra estrategicamente bem situado em relação às áreas de ocorrência das principais espécies de atuns e afins (STAUB NETO, 2005).

Os atuns pertencem à família *Scombridaeae*, que se divide em 15 gêneros e 48 espécies. As principais espécies de atuns exploradas no mundo são a albacora laje (*Thunnus albacares*), bonito barriga listrada (*Katsuwonus pelamis*), a albacora branca (*Thunnus alalunga*) e a albacora azul (*Thunnus thynnus*). Estas espécies representam cerca de 80% das capturas mundiais de tunídeos. A maioria das espécies da família *Scombridaeae* tem distribuição cosmopolita. Os tunídeos caracterizam-se por serem migratórios e de grande voracidade. Alcançam ótimos níveis de abundância, comprimento e peso, face ao intenso ritmo de reprodução e alta taxa de crescimento em períodos curtos (Ibid, 2005).

Dentre as espécies de atuns, uma é particularmente importante pelas suas qualidades sensoriais e nutritivas, a albacora laje (*Thunnus albacares*), espécie abundante em águas tropicais e equatoriais. Os limites de temperatura da água para a sua captura situam-se entre 18^oC a 31^oC aproximadamente. É uma espécie de grande interesse econômico, sendo classificada como “yellowfin tuna” (YFT) 4 na escala de importância econômica de peixes segundo a “Food and Agricultural Organization” (FAO) que vai de 1 a 4 (NÉCTON..., 2005).

Em geral, a captura do pescado no Brasil não é realizada de maneira planejada, em função do despreparo do pessoal envolvido na cadeia produtiva. Fatores de infra-estrutura como falta de gelo, estocagem e manuseio inadequados contribuem para a veiculação de microrganismos naturalmente não encontrados no pescado, e que depreciam sobremaneira a sua qualidade final (OGAWA, 1999).

Ao longo das etapas da cadeia produtiva, como transporte, recepção, evisceração, estocagem em gelo, manipulação, pode ocorrer contaminação do peixe por patógenos como *Salmonella* spp, *Clostridium botulinum*, *Vibrio vulnificus* (WEEKS, 2003), *Yersinia enterocolitica* (FRANCO; LANDGRAF, 1996), *Aeromonas* spp (MERINO et al, 1995; TSAI; CHEN, 1996), e *Listeria monocytogenes* (RYSER; DONNELLY, 2001) que propiciam a ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos.

De todos os produtos cárneos, o pescado é o mais sensível à deterioração, a oxidação, a hidrólise das gorduras e a alteração por microrganismos, devido a sua própria composição biológica (ASHIE et al, 1996). Portanto os procedimentos tecnológicos de conservação devem ser imediatamente iniciados após a captura. Deve-se destacar que, em virtude destes fatores, à intensidade de tais tratamentos devem ser maior do que as utilizadas para outros produtos.

O uso de técnicas alternativas de conservação, como embalagem em atmosfera modificada, aliadas ao uso do frio, mostra-se extremamente eficiente na inibição da microbiota presente no alimento, aumentando de 50% a 400% seu tempo de vida comercial, além de promover maior segurança dos produtos ao consumidor, por inibir o crescimento de determinados microrganismos patogênicos (STAMMEN et al, 1990).

O presente estudo objetivou verificar o comportamento de microrganismos residentes como bactérias lácticas e microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, além de patógenos como *Aeromonas hydrophila*

(IOC-FDA 110-36), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), inoculados em carne de atum (*Thunnus albacares*), embalada em diferentes combinações de atmosferas modificadas sob refrigeração ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O pescado como alimento

O músculo esquelético do pescado é rico em proteínas, vitaminas e lipídeos. As proteínas apresentam balanceamento de aminoácidos essenciais, comparável à proteína padrão da FAO. Os lipídeos de pescado são ricos em ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (ω 3), como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que apresentam efeitos redutores sobre triacilgliceróis e colesterol sanguíneo. Além de auxiliar na prevenção de enfermidades cardiovasculares, o consumo do pescado também é importante contra outras doenças humanas. Em estudo recente realizado na Universidade de Detroit, EUA, foi evidenciado que pessoas que se alimentam de pescado ao menos uma vez por semana, possuem até 13% menos risco de sofrer de mal de Alzheimer e acidente vascular cerebral (AVC), em virtude do retardo no envelhecimento cerebral (CIÊNCIA, 2005). O pescado possui ainda consideráveis teores de elementos minerais fisiologicamente importantes, como Mg, Mn, Zn, Cu, etc., além de vitaminas do complexo B, e principalmente vitaminas lipossolúveis A e D (OGAWA, 1999).

Apesar de toda a sua excelência nutritiva, o consumo *per capita* de pescados no Brasil ainda é baixo, da ordem de 8,5 Kg / hab. / ano. É nove vezes menor do que

o do Japão (71,9 Kg/hab/ano), quase oito vezes menor do que o de Portugal (60,2 Kg/hab/ano), e bem inferior ao da Noruega e Espanha (41,1 Kg/hab/ano 37,7 Kg/hab/ano) respectivamente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda no mínimo 16Kg/hab/ano (AGUIAR, 2005).

Atualmente a demanda mundial por pescados frescos apresenta um aumento extraordinário, fato que os especialistas chamam de “The blue revolution” (ELIAS, 2004). Em reportagem sobre o tema, a revista “The economist”, em 2003, estima à valorização do pescado fresco em mais de 200% desde 1947, enquanto que os congelados tiveram uma valorização de 100%. Esta mesma pesquisa afirma que o consumo de pescado aumenta à medida que aumenta a renda *per capita*. O frescor exigido pelos consumidores se traduz em pescados minimamente processados, refrigerados e convenientemente embalados, prontos para o consumo (BREMER et al, 2002).

Esta demanda pelo frescor cada vez maior do pescado faz crescer a importância de tecnologias capazes de proporcionar aumento do tempo de vida comercial do produto, que é limitado pela proliferação de microrganismos, sobretudo os deterioradores, que produzem alterações de odor, sabor e consistência no alimento pela sua ação sobre proteínas, carboidratos e gorduras além da ação paralela de enzimas autolíticas, e outras reações químicas como a oxidação lipídica (BREMER et al, 2005).

2.2 - Fatores predisponentes da rápida deterioração do pescado

Dentre os alimentos de origem animal, o pescado se caracteriza por ser o mais perecível, pois desde que é retirado da água inicia-se uma rápida série de alterações que podem tornar o produto inaceitável para o consumo ou para a industrialização. Algumas causas desta acentuada deterioração, são a intensa degradação do glicogênio muscular por ocasião da captura, onde o peixe emprega grande esforço na tentativa de se livrar das redes ou iscas, esgotando suas reservas energéticas (MEDEIROS, 2002).

O teor de glicogênio pode variar no corpo do peixe, aumentando no sentido da cabeça para a cauda, por esta parte necessitar de mais energia para a locomoção. O glicogênio armazenado é decomposto até L - ácido láctico, sendo o conteúdo deste maior em peixes migrantes de carne vermelha do que em peixes

demersais. E devido ao acúmulo de ácido láctico o pH do músculo pode cair para valores em torno de 5,6 a 5,8 no caso de peixes de carne vermelha e 6,0 a 6,2 nos de carne branca (OGAWA, 1999_b).

Segundo OGAWA (1999_b) e MEDEIROS (2002), outra causa de degradação do pescado é a alta quantidade de proteases ácidas como as catepsinas e neutras como as calpaínas, enzimas altamente digestivas que agem na decomposição de proteínas. SIEBERT et al (1962¹) apud KIETZMANN et al (1974) afirmaram que o tecido muscular de peixes tem 10 vezes mais catepsinas do que os mamíferos, o que vem a confirmar que o peixe tem uma atividade proteolítica a 7^oC semelhante a carne de mamíferos estocadas* a 37^oC.

O alto teor de oxido de trimetilamina (OTMA), principalmente no pescado marinho também influencia sua qualidade, por ação enzimática originária, sobretudo de *Shevanella putrefasciens* (STAMMEN et al, 1990), *Alteromonas* spp e *Flavobacterium* spp se converte em trimetilamina o que confere odor desagradável ao pescado (OGAWA; OGAWA, 1999).

A pele que reveste o peixe e o protege das influências externas é outro fator agravante. Formada pela epiderme, quase sempre constituída por uma única camada delgada que se encontra sobre outra de tecido conjuntivo frouxo. Por esta razão, a pele opõe pouca resistência à ação da luz e da microbiota contaminante.

A própria constituição muscular do pescado, com pouco tecido conjuntivo facilita o processo de degradação, pois este fica vulnerável à invasão microbiana e a própria ação das enzimas tissulares (MEDEIROS, 2002). Esta autora também afirma que a fraca ligação dos anéis protéicos e a grande quantidade de água são fatores predisponentes do pescado à sua alta digestibilidade. O teor de água intramuscular no pescado é da ordem de 81%, enquanto que em animais de sangue quente é de 76%, o que torna a estrutura coloidal mais tenra (KIETZMANN et al, 1974). A presença de ácidos graxos insaturados também é outro fator predisponente, já que torna essa gordura mais susceptível ao processo de oxidação (MEDEIROS, 2002).

Ainda a respeito da constituição química muscular, há de se destacar também o significativo nível de substâncias nitrogenadas livres como a creatina, taurina, óxido de trimetilamina, anserina, aminoácidos livres e derivados da purina,

* SIEBERT, G.V.; MALORTIE, R.; BEYER, R. Verdauungsenzyme frischgefangener dorsche. *Archieve Fischereiwissenschaft*. v. 13, p. 21-34, 1962.

proporcionando maior teor de substrato para a ação de microrganismos (KIETZMANN et al, 1974).

2.3 - Modificações *post mortem* no pescado

Quando o peixe é retirado da água, imediatamente interrompe-se o suprimento de oxigênio muscular, e o glicogênio não é mais oxidado a CO₂ e H₂O e sim em ácido láctico, o que acarreta a queda do potencial de oxirredução ao nível celular (MEDEIROS, 2002). Inicia-se então a fase de glicólise anaeróbica, sendo que nesta fase a adenosina trifosfato (ATP) restante é degradado, com desfosforilação simultânea de creatina fosfato (CP), liberando fósforo inorgânico (Pi) que estimula a degradação do glicogênio. O ATP é decomposto a adenosina difosfato (ADP), e em seguida a adenosina monofosfato ou ácido adenílico (AMP). A partir do AMP forma-se rapidamente IMP (inosina monofosfato), que por sua vez tem uma desfosforilação mais lenta, e este fato contribui para a definição do paladar do peixe, pois está relacionado ao sabor conhecido como “umami”, bastante apreciado (Informação verbal)*. A degradação de IMP dá origem a níveis cada vez mais altos de inosina e hipoxantina, à medida que o pescado vai se deteriorando (OGAWA; LIMA MAIA, 1999).

Estas reações catalizam a degradação do glicogênio, sendo este decomposto até L-ácido láctico que se acumula no músculo, com a consequente redução dos níveis de pH para valores em torno de 5,6 a 5,8 nos peixes de carne vermelha e 6,0 a 6,2 nos de carne branca (KIETZMANN et al, 1974; OGAWA, 1999).

Quando cai o nível de ATP o músculo não tem mais energia suficiente para manter estáveis as ligações protéicas e então ocorre a união irreversível de actina e miosina formando o complexo actomiosina, produzindo o fenômeno do *rigor mortis*. Este caracteriza - se pelo enrijecimento da musculatura dos animais durante um certo período, e no caso de pescado depende de variantes como espécie, fatores fisiológicos, grau de exaustão, tamanho dos peixes, condições de cultivo, e temperatura. Os fatores que influem no *rigor mortis* são importantes na conservação

* GERALDO ABREU DE OLIVEIRA. Disciplina de Tecnologia de Pescado. Curso de doutorado em Higiene e Tecnologia de pescado. Universidade Federal Fluminense.

do pescado, estando diretamente relacionado aos estágios iniciais de sua deterioração (FAO, 2005; RIGOR MORTIS, 2005).

Logo depois de retirado da água o peixe deve ser imediatamente submetido à baixas temperaturas com o objetivo de prolongar ao máximo o período de pré-rigor e de *rigor mortis*, em que não há ação incisiva de enzimas tissulares e microrganismos. O tempo de vida de prateleira será diretamente proporcional ao período citado anteriormente, pois está relacionado com o frescor do peixe. A temperatura ideal para estocagem do peixe antes do rigor é de 5⁰C a 10⁰C, e uma vez em rigor completo deve-se baixá-la para 0⁰C. Este fato é ocasionado pela redução da capacidade de retenção de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático (RS) a 0⁰C, sendo este liberado no músculo estimulando a ação da Mg²⁺ ATPase responsável pela degradação do ATP e CP. Quando em temperaturas de 5⁰C a 10⁰C o RS funciona normalmente, retendo Ca²⁺ e mantendo o músculo relaxado (OGAWA; LIMA MAIA, 1999_a). Porém na prática esta situação não se aplica muito, pois existe grande variação em termos de tamanho e composição química de pescados, portanto o tempo do início do *rigor* é muito diferente, além do fato de iniciar-se rapidamente na maioria das espécies comerciais. A FAO (HUSS, 1997_a) recomenda que o pescado seja resfriado o mais rapidamente possível depois de obtido, em temperatura de 0⁰C.

Um período crítico para o pescado inicia-se logo após o término do *rigor mortis*, pois a partir desse momento cessam todas as barreiras ao desenvolvimento de microrganismos contaminantes, e de enzimas produzidas por estes ou do próprio peixe. Nesta fase ocorre a chamada flacidez muscular que se desenvolve rapidamente se não foram tomadas medidas como a rápida refrigeração. Esta fase de degradação envolve uma série de reações bioquímicas envolvendo lipídeos, proteínas e carboidratos, causadas simultaneamente por enzimas tissulares e microbianas (FAO, 2005).

A flacidez tecidual tem origem na fragilidade do disco Z causada pela decomposição da α actinina que é a proteína construtiva do disco Z pela calpaína. Outro fator que contribui para a flacidez é a degradação da fibra de colágeno por meio da decomposição da conectina, proteína responsável pela junção de miosina com o disco Z. As enzimas mais atuantes na decomposição do pescado são as proteases ácidas como as catepsinas e as neutras como as calpaínas, decompondo principalmente as proteínas miofibrilares hidrolizando as ligações

peptídicas (OGAWA; LIMA MAIA, 1999_a). O resultado desta ação é a liberação de uma série de aminoácidos e outros compostos de baixo peso molecular. Estes aminoácidos são descarboxilados por enzimas bacterianas formando aminas e CO₂ que causam impacto nas características sensoriais do peixe (FAO, 2005).

A degradação das gorduras ocorre, sobretudo por oxidação, e esta é facilitada pela existência de numerosos ácidos graxos poliinsaturados com formação de peróxidos, e posteriormente aldeídos, cetonas, derivados carbonílicos e produtos de polimerização, compostos de elevada toxicidade. A combinação de aldeídos com ácidos graxos insaturados, e trimetilamina origina compostos de cor parda característica de carne de pescado deteriorado. Esta é uma reação em cadeia e aumenta à medida que o processo avança (OGAWA; OGAWA, 1999). Estes autores ainda citam que, em relação aos açúcares, a sacarose, glucose, e frutose são desdobrados por ação bacteriana originando compostos como ácidos acético, láctico, butírico, succínico, álcool etílico, diacetil CO₂, dentre outros. A microbiota láctica é composta basicamente de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, e *Leuconostoc*. As alterações no pescado ocorrem simultaneamente, por ação autolítica e microbiana, e desta forma o conhecimento da contaminação bacteriana torna-se importante do ponto de vista higiênico, pois a partir dele poderão ser tomadas medidas no sentido de prevenir a rápida perda de qualidade do alimento.

2.4 - Contaminações do pescado

Nesta etapa serão revisados os principais tipos de contaminação do pescado, sua origem, e as etapas da cadeia produtiva onde ocorrem as maiores contaminações, assim como os principais agentes responsáveis pela deterioração deste produto.

2.4.1 - Contaminação bacteriana

Após a conclusão do *rigor mortis* aumenta rapidamente a flacidez muscular e a multiplicação microbiana iniciando o processo de putrefação. As características próprias da estrutura muscular, estudadas anteriormente, propiciam a rápida penetração de bactérias na musculatura, que por meio de enzimas, atuam principalmente em compostos de baixo peso molecular como Nitrogênio não protéico

(DAINTY; MACKEY, 1996), aminoácidos livres, açúcares, ácidos orgânicos e, posteriormente, suas proteases quebram proteínas em aminoácidos e peptídeos, e estes sofrerão desaminação que pode ser oxidativa, redutiva, hidrolítica e dessaturativa, além de descarboxilação alterando as características sensoriais do peixe e tornando-o impróprio ao consumo (OGAWA; OGAWA, 1999_b). Essa atuação da microbiota causa alteração no pH e ocorre a formação de compostos tóxicos, gás e limo superficial característicos de pescado em deterioração (VELD, 1996).

A microbiota do peixe vivo depende da carga bacteriana ambiental, que sofre influência do nível de poluição da água (WARD; BAJ, 1988). Estes autores mencionam a relação envolvendo a temperatura das águas, onde é conhecido o fato de que a microbiota de peixes capturados em águas tropicais e subtropicais é constituída basicamente de microrganismos mesófilos Gram (+) como *Micrococcus* spp, *Bacillus* spp, e *Corynebacterium* spp, enquanto que em peixes oriundos de águas temperadas predomina a microbiota psicotrófica Gram (-). As regiões naturalmente mais contaminadas são a pele, as guelras e o trato intestinal. No muco que recobre a pele existem bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Serratia*, *Shevanella*, *Vibrio*, *Bacillus* (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; DALGAARD, 1995;), *Cytophaga* spp (FARBER, 1991), e *Aeromonas* (WARD e BAJ, 1988). Na pele essa carga microbiana é de aproximadamente 10^2 a 10^4 cm², enquanto que nas guelras há os mesmos gêneros, com uma carga de 10^3 a 10^6 /g (OGAWA; LIMA MAIA, 1999_b). Segundo ainda estes autores, no trato intestinal a microbiota é composta basicamente por *Vibrio* spp (10^3 a 10^8 /g), sendo também encontrado *Photobacterium phosphoreum* (DALGAARD, 1995).

Quando o pescado chega a bordo da embarcação sua contaminação em geral é da ordem de 10^5 a 10^6 / cm², e se a classificação e separação forem efetuadas de maneira higiênica seguidas de lavagem com água do mar esta carga microbiana pode ser reduzida para 1/3 a 1/10 da contaminação inicial. O método de captura também influencia na qualidade microbiológica do pescado, sendo que a pesca de rede proporciona muito mais possibilidades de contaminação do que a linha e anzol, em virtude do acentuado “stress” do peixe, do arrasto geralmente por longo tempo podendo inclusive ocorrer à morte deste ainda na água, e a ocorrência de esmagamento em virtude do grande volume do cardume (WARD; BAJ, 1988;

FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Outros fatores também são importantes como a repleção das vísceras, pois quanto maior a quantidade de alimentos maior será a carga microbiana, o que aumenta a probabilidade de contaminação durante a evisceração (BRESSAN; PERES, 2001).

Os materiais utilizados nas operações de pesca como caixas, ganchos, redes, gelo e até mesmo o piso do convés da embarcação podem contribuir para a contaminação do pescado durante a despesca, evisceração, limpeza, e estocagem, por meio de deficiências higiênicas na manipulação e contaminação cruzada (SHEWAN, 1971; FRAZIER; WESTHOFF, 1993; OGAWA, 1999_c; BRESSAN; PEREZ, 2001).

Com o objetivo de minimizar os efeitos da multiplicação bacteriana em pescados e sua conseqüente deterioração, deve-se tentar manter um ambiente o mais higiênico possível e submeter imediatamente o pescado à ação do frio. Segundo PELCZAR et al (2004) todos os processos metabólicos bacterianos são afetados pela temperatura, sendo os microrganismos capazes de crescer em uma ampla variação desta, que pode ser maior para uns do que para outros, existindo registros de multiplicação desde -35°C a 90°C . Para todos existem 3 temperaturas importantes, a mínima, a máxima e a ótima, sendo conhecidas como temperaturas cardinais. Estas podem variar de acordo com o aporte nutritivo, as condições do meio como pH, potencial redox, e atividade de água (a_w). A faixa ótima de crescimento normalmente é mais próxima do limite superior, pois está estritamente relacionada com a velocidade das reações enzimáticas, até o ponto em que as próprias enzimas são danificadas pelo calor e a célula cessa o crescimento. Os microrganismos podem ser divididos em 3 grupos segundo a variação de temperatura na qual crescem melhor: mesófilos, psicotróficos e termófilos.

No grupo dos mesofílicos está a grande maioria dos microrganismos, sejam aqueles patogênicos ou deterioradores, crescendo em uma faixa compreendida entre 25°C e 40°C . A presença destas bactérias, em grandes números, em alimentos é um indicativo de deficiências higiênicas ao longo da cadeia produtiva do mesmo, que pode ser desde a matéria prima, manipulação, contato com superfícies contaminadas, processo tecnológico inadequado ou estocagem em condições impróprias. Estes microrganismos poderão evidenciar informações a respeito do possível prazo de vida de prateleira de alimentos ou iminentes alterações sensoriais nos produtos (MORTON, 2001). Os principais microrganismos mesofílicos

deterioradores em pescado são *Brochotrix thermosphacta* e *Phosphobacterium phosphoreum* como microbiota Gram positiva, e cepas mesófilas de *Pseudomonas* spp, *Alteromonas* spp, e *Shewanella putrefasciens* como microbiota Gram negativa (GALVEZ et al, 1995; SIVERTSVICK et al, 2003). Considerando que entre os microrganismos mesófilos encontram-se a grande maioria dos patógenos, sua presença em alimentos em grandes quantidades pode indicar risco à saúde pública (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

O grupo dos psicrotróficos, quando presentes em números elevados podem causar uma variedade de alterações em alimentos mantidos sob refrigeração, em virtude da capacidade proteolítica e lipolítica da maioria dos gêneros deste grupo. Sua presença em pescados pode ser considerada normal pois a água faz parte de seu “hábitat” natural (BRASIL, 1993). Segundo FRAZIER; WESTHOFF (1993) existem diversos tipos de microrganismos responsáveis pela deterioração do pescado, porém sem dúvida, bactérias psicrófilas e psicrotróficas, por poderem crescer em temperaturas normalmente utilizadas nos processos de refrigeração são as maiores causadoras de alterações em pescados. Estes autores citam ainda que, diferentemente das bactérias psicrófilas, que tem seu ótimo nível de multiplicação a cerca de 15⁰ C, a temperatura ideal de crescimento das psicrotróficas não coincide com as temperaturas de refrigeração, estando compreendida geralmente entre 25⁰ C e 30⁰ C.

Bactérias termófilas pertencem a um grupo bastante resistente aos tratamentos térmicos, e sua presença em pescados está relacionada à qualidade da matéria prima ou a um tratamento térmico insuficiente (BRASIL, 1993)

A poluição interfere na intensidade de contaminação do pescado no ato da captura, e se este for obtido em águas próximas às cidades ou a desembocaduras de redes de esgoto poderá ocorrer à adição de microrganismos oriundos de matéria fecal, como os da família *Enterobacteriaceae*, e dentre estes os coliformes e coliformes fecais, com ênfase em *Escherichia coli*. Outros patógenos pertencentes a esta família como *Salmonella* spp, *Shigella* spp, e *Yersinia enterocolitica* podem ser contaminantes de pescado, constituindo-se em grave problema de saúde pública (WEEKS, 2003; PELCZAR, 2004). Muitas espécies normalmente não associadas a casos de enterites podem atuar como patógenos oportunistas, causando uma variedade de alterações como bacteremia, meningite, infecções nos tratos urinário e respiratório, e infecção bacteriana secundária em feridas (HOLT, 1994_a). Apesar de

serem associadas à contaminações de origem fecal, os integrantes desta família não necessariamente têm o trato intestinal de homens e animais como “hábitat” natural, estando presentes no meio ambiente de um modo geral, sobretudo aquele envolvendo unidades de manipulação e beneficiamento de alimentos, especialmente quando a higiene é deficiente. Portanto os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* são considerados indicadores de qualidade higiênico-sanitária de alimentos. A família *Enterobacteriaceae* inclui microrganismos bastonetes retos Gram negativos, usualmente com 0,3 a 1,8µm de comprimento, anaeróbios facultativos, os quais fermentam a glicose produzindo ácidos e, em muitas espécies, gás, são oxidase negativos, usualmente catalase positivos, exceto para *Shigella dysenteriae*, reduzem nitrato a nitrito, e são móveis com flagelos peritríquios ou imóveis. Crescem bem a 37°C, porém algumas espécies podem crescer também entre 25°C a 30°C Os gêneros comuns a esta família compreendem *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*. Estes microrganismos são de caráter mesofílico, porém algumas cepas psicrótróficas de *Enterobacter*, *Hafnia* e *Serratia* podem crescer em temperaturas abaixo de 0°C (HOLT et al, 1994_a; KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Alguns autores como Mossel (1963)^{*†} *apud* KORNACKI; JOHNSON, (2001), recomendam o uso de *Enterobacteriaceae* como indicador de qualidade de alimentos, pois pode proporcionar melhores resultados que a pesquisa de coliformes, pois os microrganismos lactose negativos não iriam ser percebidos.

Outros microrganismos importantes em produtos cárneos são as bactérias lácticas, que são representadas principalmente pelos gêneros *Lactobacillus* (SIVERTSVC et al, 2003), *Leuconostoc*, *Streptococcus*, e *Pediococcus*. Outros gêneros também podem estar associados à fermentações, como *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. A principal capacidade destes organismos é fermentar os carboidratos existentes nos alimentos e produzir ácidos. Esta propriedade pode ser benéfica em algumas ocasiões quando a indústria se utiliza desta propriedade para

* MOSSEL, D.A.A., VISSER, M., CORNELISSEN, A.M.R. The examination of foods for *Enterobacteriaceae* using a test of the type generally adopted for the detection of *Salmonellae*. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 3, p. 444, 1963.

conferir qualidades sensoriais agradáveis ao alimento, mas em produtos cárneos e pescados frescos obtidos de maneira não higiênica, se forem fornecidas determinadas condições de crescimento, haverá perda de qualidade sensorial do produto final (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Estes microrganismos são ubíquos e conseqüentemente associados à contaminações de alimentos frescos e processados, o que chega a causar prejuízos de milhões de dólares anualmente. São bastonetes Gram positivos, não formadores de esporos, e desdobram carboidratos presentes no alimento produzindo ácidos diversos, principalmente o ácido láctico (HALL et al, 2001). Além dos ácidos produzidos, que alteram o pH dos alimentos, outras características da microbiota láctica estão associadas à inibição de outros microrganismos, sobretudo os patogênicos, como a própria degradação dos nutrientes do meio, a formação de peróxido de hidrogênio e a produção de bacteriocinas (SANTOS et al, 1999; BARAKAT; HARRIS, 1999).

Alguns microrganismos patogênicos também podem estar presentes no pescado, e se tornar um problema de saúde pública. Podem ser oriundos do próprio “hábitat”, e também de deficiência na execução de boas práticas de higiene, como *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Clostridium botulinum*, (HACKNEY; DICHARRY, 1988), *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp (WARD; BAJ, 1989), e *Aeromonas hydrophila* (TSAI; CHEN, 1996; ISONHOOD; DRAKE, 2002).

2.5 - Métodos de conservação do pescado

Em virtude das características intrínsecas do pescado, que o tornam um produto altamente perecível, bastante delicado e altamente susceptível a uma série de contaminantes de natureza biológica, química ou física, a cadeia produtiva deve dispor de métodos e processos tecnológicos que garantam uma extensão de sua vida de prateleira, mantendo suas características sanitárias, sensoriais e nutritivas minimamente alteradas. Existem diversos métodos de conservação que são empregados de acordo com o tipo de pescado que se deseja comercializar, tais como o frio, aplicação de atmosferas modificadas, enlatamento, salga, defumação, fermentação, Irradiação, e alta pressão hidrostática, dentre outros. Serão descritos os métodos de utilização de frio e de atmosferas modificadas, que devem ser utilizados conjuntamente, e que são objeto do presente estudo.

2.5.1 - Refrigeração

É uma prática eficazmente empregada na conservação de alimentos, baseada na diminuição da temperatura com o objetivo de minimizar os efeitos das ações químico enzimáticas envolvidas no processo de autólise (OGAWA; LIMA MAIA, 1999_a). O uso de temperaturas baixas para a conservação de alimentos se baseia também no fato de que a atividade dos microrganismos que contém, pode ser retardada a temperaturas acima da temperatura de congelamento, e geralmente pode ser detida em temperaturas abaixo desta. Seu fundamento consiste em que todas as reações metabólicas dos microrganismos estão catalisadas por enzimas, e que a velocidade das reações catalizadas por enzimas é diretamente proporcional à temperatura (FRAZIER; WESTHOFF, 1994).

Sob condições normais de refrigeração, a vida de prateleira do pescado é limitada pela ação enzimática e microbiológica da microbiota deteriorante natural, ou advinda de contaminações posteriores. Contudo, com o aumento da demanda de pescados frescos, com um maior “shelf life”, e o aumento do custo em função da maior necessidade de energia para um tratamento mais rigoroso dos produtos, a indústria pesqueira deve buscar métodos alternativos que mantenham o grau de frescor do pescado por um tempo mais prolongado.

Os pescados comercializados na forma *in natura* são denominados de: Pescado fresco (mantido em gelo); pescado resfriado (acondicionado em gelo e mantido a $-0,5^{\circ}\text{C}$ a $+2^{\circ}\text{C}$) e pescado congelado (-18°C a -25°C). Além dessa caracterização baseada no que estabeleceu o regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997), existem diferentes métodos de tratamento pelo frio.

O super resfriamento, um método que utiliza uma temperatura pouco inferior a do ponto de congelamento do pescado ($-1,5^{\circ}\text{C}$). Esta aplicação previne a formação de cristais de gelo nos tecidos, e a consequente destruição destes. O outro é o congelamento parcial que submete o pescado a temperaturas de -3°C , o que resulta em congelamento parcial do produto, conferindo a este um maior tempo de vida de prateleira (BRESSAN; PEREZ, 2001).

2.5.2 - Congelamento

Este tratamento mais drástico tem por objetivo uma melhor preservação do pescado, e um aumento considerável de seu tempo de vida de prateleira. Inicia-se normalmente a temperatura de $-1,5^{\circ}\text{C}$, e à medida que a temperatura é reduzida uma maior proporção do produto é congelada, sendo a maior velocidade de congelamento situada entre as temperaturas de -1°C e -5°C . É importante que essa temperatura seja ultrapassada rapidamente para que se tenha um pescado de melhor qualidade, do contrário irão se formar grandes cristais na musculatura, uma vez que no congelamento lento formam-se cristais primeiramente no interstício, devida a menor concentração de solutos. Estes cristais tendem a aumentar rapidamente de tamanho, exercendo forte atração que faz com que os líquidos celulares deixem a célula, levando à formação de grandes cristais que por sua vez exercem compressão e acabam rompendo a parede celular causando extravazamento de líquido quando do descongelamento (BRESSAN; PEREZ, 2001; PRATA; FUKUDA, 2001).

Os métodos mais utilizados na indústria de pescados segundo BRESSAN; PEREZ (2001), e HALL (2001) são os seguintes:

Túnel de congelamento – congelamento por ar parado “still air Sharp freezing”. Este é um método lento, onde o produto é colocado em bandejas acima das serpentinas de evaporação, sendo a temperatura de -25°C a -30°C . Este método é utilizado para manutenção de alimentos em câmaras frias.

Túnel de congelamento – congelamento por ar forçado “air blast freezing”. Neste tipo de tratamento o ar é forçado a circular a uma velocidade de 3 a 5 m/s. A temperatura de evaporação é de -45°C , sendo a do túnel em média -35°C com umidade relativa entre 60 a 70%. Este é um processo utilizado para o estabelecimento da temperatura ideal de estocagem, sendo o alimento posteriormente encaminhado para a câmara de manutenção.

Congelamento em placas “contact freezing”. Neste método as placas recebem diretamente o refrigerante já a uma temperatura de -25°C a -40°C . Os pescados são embalados e colocados entre as placas, e em seguida aplica-se uma pressão de contato de 0,1 a 0,2 kg/cm^2 .

Congelamento por imersão em salmoura “brine immersion freezing”, onde são utilizadas soluções de NaCl, CaCl, propilenoglicol entre outros. Neste sistema, a velocidade de circulação da salmoura é de aproximadamente 0,04 a 0,09 m/s.

Congelamento criogênico “cryogenic freezing”. Neste tipo de processamento faz-se a aplicação de “sprays” de N₂ e CO₂ líquido nos alimentos. O N₂ líquido evapora-se a -193,56^oC e retira 47,65 kcal/kg de calor latente do ambiente, enquanto que o CO₂ evapora a -78,9^oC e retira 37,33 kcal/kg de calor latente do meio.

Fatores predisponentes, como a não adoção de critérios higiênicos a bordo, gelo em quantidade insuficiente, ou mesmo gelo de má qualidade microbiológica podem propiciar a multiplicação dos citados microrganismos.

2.6 - Embalagem em atmosferas modificadas (EAM) e diferentes tipos de gases empregados.

Atualmente há uma necessidade crescente mundial por avanços tecnológicos que permitam a extensão do prazo de vida de prateleira de produtos perecíveis, mantendo ao máximo o seu estado de frescor (HINTLIAN; HOTCHKISS, 1986; STAMMEN et al, 1990), em detrimento do consumo de produtos enlatados e congelados (FARBER, 1991). A técnica de EAM consiste no envase de produtos perecíveis envolvidos em um ambiente onde o ar foi removido e substituído por uma mistura de gases, usualmente CO₂, N₂, e O₂, utilizados isoladamente ou em diversas combinações. O objetivo é inibir ou retardar alterações físico-químicas e microbiológicas que levam o produto à deterioração comprometendo sua qualidade (STAHAM, 1984; DANIELS et al, 1985; DIXON; KELL, 1989; STAMMEN et al, 1990; SIVERTSVIK et al, 2002). A embalagem a vácuo também é considerada uma variante de EAM, pois o ar também é retirado, e o teor de CO₂ é de 10% a 20% oriundos da atividade respiratória microbiana (SILLIKER; WOLFE, 1980; HINTLIAN; HOTCHKISS, 1986). Uma vez introduzido o gás, ou a mistura de gases, torna-se impossível o controle da composição da atmosfera da embalagem ao longo da estocagem, pois esta inevitavelmente irá se alterar em função da atividade respiratória bacteriana e alterações bioquímicas teciduais (SIVERTSVIK et al, 2002). Esta é a diferença básica entre esta tecnologia, e a de atmosferas controladas (AC) onde por meio de equipamentos é possível manter o balanço gasoso inicial ao longo da estocagem (WOLFE, 1980).

Dentre os gases citados o CO₂ tem se mostrado mais efetivo no uso de EAM em virtude das suas propriedades bacteriostáticas e fungistáticas. Este gás inibe a microbiota deteriorante dos alimentos de origem animal, composta originalmente por

microrganismos aeróbios Gram negativos em sua maioria (GILL; PENNEY, 1988; SIVERTSVIK et al, 2002). A carga microbiana original passa por sensíveis modificações quando o alimento encontra-se sob EAM. Nestas condições passam a prevalecer bactérias anaeróbias facultativas Gram positivas como as bactérias lácticas (SORHEIM; NISSEN, 2005). A atmosfera gasosa não é o único fator relacionado à eficiência da técnica de EAM, sendo igualmente importante à temperatura empregada na estocagem, pois estará diretamente relacionada à solubilidade do CO₂ e conseqüentemente a inibição microbiana. Esta solubilidade é inversamente proporcional à temperatura (DIXON; KELL, 1989).

O CO₂ é conhecido desde a antiguidade. Sua presença foi detectada próximo à vulcões e reservas minerais na Europa, sendo inicialmente denominado de “espírito letal”. Nos anos 20 John Baptista van Helmont introduziu a palavra gás, chamando-o de “gás silvestre”. Este pesquisador verificou logo as propriedades do CO₂ como extinguir chamas e também causar sufocação em animais. É possível que essas propriedades, agora largamente conhecidas deste gás, tenham despertado o interesse em sua ação inibitória contra microrganismos (VALLEY; RETTGER^o apud DIXON; KELL, 1989).

Estas pesquisas despertaram a idéia de uma tecnologia envolvendo modificações na atmosfera circundante do alimento visando à inibição microbiana. Em 1877 Pasteur e Joubert observaram que *Bacillus anthracis* poderia ser inibido por CO₂ (VALLEY, 1928), e 5 anos mais tarde foi publicado o primeiro artigo sobre o efeito do CO₂ na preservação de carne bovina (KOLBE, 1882). Há pouco menos de um século surgiram outros estudos sobre esta tecnologia (KILLEFFER, 1930; COYNE, 1932; STANSBY; GRIFFITHS, 1935), impulsionados pela utilização do CO₂ nos anos 30 na conservação de carnes transportadas de navio a partir da Austrália e Nova Zelândia até a Inglaterra (SILLIKER; WOLFE, 1980; SORHEIM; NISSEN, 2005). Ainda nos anos 30 surgiram também os primeiros estudos sobre a utilização do CO₂ na conservação de pescados na Inglaterra, Estados Unidos e antiga União Soviética (KILLEFFER, 1930; STANSBY; GRIFFITHS, 1935). Nestes experimentos os peixes mantidos em altas concentrações de CO₂ tiveram tempos de vida de prateleira 2 a 3 vezes maiores que os controles mantidos em ar, na mesma temperatura. Diversas observações foram feitas, como a queda do pH final do

^o* VALLEY, G., RETTGER, L.F. The influence of carbon dioxide on bacteria. *Journal of Bacteriology*. v. 14, p. 101-137, 1927.

produto mantido em CO₂ de 6,6 para 6,2, com reversão quando novamente mantido em ar, e a importância da temperatura, pois verificaram melhores resultados em peixes mantidos em torno de 0°C. A atuação do CO₂ também se mostrou mais eficiente quando os alimentos foram obtidos, manipulados e embalados em condições sanitárias satisfatórias (COYNE, 1933* *apud* SIVERTSVIK et al, 2002).

Nos anos 70, com o avanço de embalagens individuais para um público cada vez mais exigente a tecnologia de EAM experimentou grande impulso (WOLFE, 1980), e foi introduzida no comércio varejista de alimentos de origem animal, na França em 1974 por meio da companhia Scopa que começou a embalar carne bovina, e na Inglaterra, quando a rede atacadista Marks & Spencer lançou a técnica na conservação de carnes (CHURCH, 1994). A tecnologia de EAM é atualmente difundida em praticamente todos os países desenvolvidos, e cerca de 10% a 40% dos produtos de origem animal já são comercializados sob EAM. A Noruega é o país onde se verifica a maior proporção de alimentos comercializados sob EAM, com aproximadamente 60% do total do país (SORHEIM; NISSEN, 2005).

O CO₂ é um gás incolor inodoro e de sabor ligeiramente ácido, considerado o principal gás por suas propriedades inibitórias à microbiota, que estão diretamente relacionadas com a sua solubilidade na água e na gordura do alimento (FARBER, 1991). Inicialmente, pensava-se que a preservação de alimentos envolvidos em CO₂ era devido ao deslocamento de todo ou de parte do O₂ presente no meio, que seria utilizado no metabolismo microbiano. Esta possibilidade foi logo desconsiderada, pois se verificou a inibição também de bactérias anaeróbias quando submetidas ao CO₂. Apesar da redução do O₂ ter algum efeito no metabolismo de alguns microrganismos, este aspecto não parece ser um fator decisivo para a inibição microbiana (DANIELS et al, 1985).

O CO₂ não possui apenas um efeito bacteriostático, mas também interfere nas propriedades respiratórias do produto embalado. Um dos efeitos marcantes deste gás é a extensão da fase lag microbiana e a diminuição do crescimento durante a fase logarítmica. Quando entra em contato com o alimento, o CO₂ é rapidamente dissociado na fase líquida do mesmo, sendo convertido em ácido carbônico (H₂CO₃). Em pH ≥ 6,0, o ácido carbônico irá se dissociar em bicarbonato (HCO₃⁻) e íon H⁺, e em pH acima de 11,5 irá ocorrer uma nova dissociação, com a

*COYNE, F.P. The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. Part II. *Journal of Society of Chemical Industry*. v. 52, p. 19-24, 1933.

formação de carbonato (CO_3^{2-}) e 2H^+ , como demonstrado na fórmula abaixo, o que explica o ligeiro decréscimo de pH observado em muitos estudos, mas que não chega a ter um grande efeito antimicrobiano (DANIELS et al, 1985; DIXON; KELL, 1989; FARBER, 1991). Este pH alterado tem como consequência a ocorrência de “drip” ou gotejamento, causado pela diminuição da capacidade de retenção de água pela célula tecidual (STAHAM, 1984).



Para haver máxima dissociação do CO_2 na porção aquosa do alimento é necessária a intervenção do frio, pois está comprovado que este gás se solubiliza com mais intensidade em baixas temperaturas, o que potencializa o efeito da tecnologia de EAM (STAMMEN, et al, 1990; SIVERTISVIK et al, 2002). REDDY et al (1995), verificaram a importância da temperatura na conservação de tilápia (*Tilapia* spp) estocada em ar e sob EAM com 75% / 25% CO_2 / N_2 a 4°C , 8°C e 16°C , e ratificaram esta importância, pois houve um decréscimo do efeito conservador de EAM a medida que se aumentava a temperatura. HONG et al (1996), porém estudando a eficiência de EAM em cavala (*Scomber scombrus*) estocada a -2°C em 90% CO_2 , observou uma longa extensão do prazo de vida de prateleira, pois obteve pescado apto ao consumo até 21 dias. Muitas teorias têm sido propostas na tentativa de elucidar o real mecanismo bioquímico que envolve a ação do CO_2 na célula microbiana, sendo atualmente posicionadas em 4 hipóteses (DANIELS et al, 1985; DIXON; KELL, 1989):

A alteração da permeabilidade da membrana celular bacteriana, com a consequente alteração na absorção de nutrientes, pois foi observada a interação do CO_2 com lipídios da membrana e a diminuição da absorção de íons pela célula, além da modificação na absorção de aminoácidos e glicose, tendo como consequência a inibição da divisão celular.

Penetração na célula microbiana, com alteração direta no pH intracelular, por meio de mecanismo demonstrado anteriormente.

A inibição direta de enzimas ou diminuição da velocidade das reações enzimáticas, especialmente as reações de descarboxilase também são afetadas pelo decréscimo do pH interno celular. Esta influência é resultado da ação direta do CO_2 sobre as propriedades bioquímicas das enzimas.

Alterações diretas nas propriedades físico químicas das proteínas. O CO₂, pode reagir com aminoácidos, peptídeos e proteínas da célula causando interferências nas propriedades eletrostáticas internas de atração ou repulsão de elementos protéicos, ou entre estes e minerais.

2.6.1 - Outros tipos de gases

O O₂ não é o único gás existente no ar atmosférico. O ar é uma mistura de gases e vapores inodoros e incolores, sendo sua composição básica, ao nível do mar a seguinte: 21% O₂, 78% de azoto, e o 1% restante é composto por O₃, H₂, CO₂, e gases raros como argônio, neônio, xenônio, cripton e hélio (COMPOSIÇÃO..., 2005). O O₂ geralmente estimula o crescimento da microbiota aeróbia e inibe os microrganismos anaeróbios, apesar de haver variação na sensibilidade entre estes. A presença de O₂ é muito importante na estocagem de carnes vermelhas, tendo como objetivo principal a manutenção do pigmento mioglobina na sua forma oxigenada, oximioglobina, o qual concede à carne uma cor vermelho atrativa ao consumidor (PHILLIPS, 1996). Em pescado o O₂ é utilizado em peixes de carne vermelha como o atum como o mesmo objetivo, e em pescado de carne branca é utilizado para reduzir o “drip”, causado pela ação do CO₂, e em peixes gordos seu uso deve ser abolido em virtude da possibilidade do desenvolvimento de rancificação oxidativa (STAMMEN et al, 1990). Têm sido proposto a utilização de ao menos 10% de O₂, nas embalagens como tentativa de estimular o crescimento de microbiota competitiva e inibir o desenvolvimento de patógenos anaeróbios como o *Clostridium botulinum*, porém esta alternativa é viável quando se trata de atmosfera controlada, uma vez que o teor de O₂ vai diminuindo durante a estocagem em atmosfera modificada (CHURCH, 1994).

O N₂ é um gás inerte, incolor, inodoro, insípido, insolúvel em água e gordura. É utilizado como complemento gasoso na substituição do ar, e com isso auxilia na prevenção de rancificação. Também tem como objetivo manter a integridade da embalagem, evitando o colapso ocasionado por diferença de pressão pela retirada do ar (CHURCH, 1994).

Uma variedade de outros gases têm sido estudadas, para uso experimental em EAM. Dentre estes estão o SO₂, N₂O, NO, O₃, He, e CO. Dentre este merece destaque a utilização do CO em virtude da formação do composto carboximioglobina

em carnes vermelhas, um pigmento mais estável do que a oximioglobina, que mantém a carne mais tempo com uma coloração agradável. Porém o uso deste gás é proibido nos Estados Unidos e na União Européia por motivo de segurança uma vez que é tóxico, e explosivo em altas concentrações, apesar de ser inofensivo quando seu teor é abaixo de 1%. Em virtude desse parâmetro, a Noruega conseguiu permissão especial para uso em concentrações abaixo de 0,5%. A segurança dos funcionários dos entrepostos de alimentos é garantida pela entrega de cilindros contendo menos de 1% de CO, sendo o restante composto por N₂ (SORHEIM; NISSEN, 2005).

2.6.2 - Características do material de envase

O sucesso da utilização de EAM está também intimamente relacionado a qualidade dos materiais usados no envase do produto. Este material deve manter a atmosfera interna mais isolada possível do ambiente externo, com o fim de proteger o alimento durante maior tempo possível. Como no mercado não se localiza facilmente um filme plástico que tenha essa característica, as indústrias utilizam filmes multicamadas, formados por polímeros de diferentes características. Estes materiais devem possuir determinadas qualidades, como resistência a abrasão, ruptura e perfuração, ter espessura suficiente para evitar o problema da microporosidade, e transparência para permitir a visualização do produto. Os polímeros mais utilizados em EAM são: polietileno (PE), poliamida (PA), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloreto de polivinil (PVC), cloreto de polivinileno (PVDC), poliéster (PET), etilvinil álcool (EVOH), e combinações entre estes para melhorar a eficiência do filme (STAMMEN, 1990). No presente estudo foi utilizado o filme PE BBL4 multicamadas de baixa permeabilidade, da empresa “Cryovac”.

O pescado pode ser acondicionado em EAM de diferentes formas:

Grandes “containers”. Buscando mais eficiência no transporte de salmões frescos oriundos de fazendas pesqueiras de regiões remotas dos Estados Unidos da América do Norte, as indústrias de pescados do Alaska iniciaram o transporte marítimo desses produtos a partir de Anchorage até Seattle visando à distribuição do pescado fresco no noroeste da Califórnia. Os “containers” foram revestidos por filme de polietileno (PE), e após os peixes serem acondicionados era injetada a atmosfera desejada (VERANTH; ROBE, 1979).

Embalagem individual. Este tipo de embalagem é mais utilizado na Europa e Canadá, e atende a consumidores específicos em gôndolas de supermercados (FARBER, 1991).

“Master pack”. Neste tipo de embalagem, o pescado é envolvido por um filme de PVC, e posteriormente colocado em recipiente maior, lacrado com filme de baixa permeabilidade, onde é aspergido o CO₂, na concentração desejada. Uma vez que o consumidor retira o pescado envolvido em PVC do recipiente maior, este terá um prazo de validade de 3 a 4 dias (VERANTH; ROBE, 1979).

2.6.3 - Vantagens e desvantagens de EAM na conservação de pescado fresco.

Esta tecnologia oferece múltiplas vantagens à indústria de pescados e ao consumidor. Tradicionalmente, pescados são capturados ou despescados e estocados em gelo. A utilização de EAM automaticamente eliminaria esta etapa de estocagem, com evidentes vantagens do ponto de vista econômico e sanitário (STAMMEN et al, 1990) quando associada à refrigeração, tem conseguido prolongar de 50% a 400% o prazo de vida de prateleira de pescados por inibir a ação deteriorante da microbiota, o que aumenta perspectivas de avanços mercadológicos (FARBER, 1991). O acondicionamento de pescado em EAM ainda confere ao industrial, mais possibilidade de controle no processo, o que reduz perdas econômicas, além de oferecer ao consumidor um produto diferenciado e seguro (LIOUTAS, 1988). Apesar de possuir muitas vantagens em relação à comercialização tradicional de pescados, o uso de EAM também é cercado de algumas preocupações, tanto de natureza tecnológica quanto sanitária. Dentre os produtos de pescado submetidos à EAM estão aqueles em que se consome sem qualquer tipo de tratamento térmico prévio, como sashimi / sushi, peixes crus, defumados, assim como ostras e mexilhões previamente cozidos, e são justamente estes tipos alimentos que oferecem mais riscos ao consumidor, pela possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos (SIVERTISVIK et al, 2002).

Em alimentos submetidos a condições anaeróbias quando em altas concentrações de CO₂ ocorre uma modificação na característica da microbiota contaminante original, composta basicamente por bactérias aeróbias, que é substituída por microbiota anaeróbia ou microaerófila. Esta mudança no ambiente da

embalagem pode propiciar o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, além de outros patógenos (STAHAM, 1984; CHURCH, 1994; STAMMEN et al, 1990).

Em relação a alterações de ordem tecnológica merecem destaque as modificações na coloração normal em peixes de carne vermelha pela formação de metamioglobina. Isto é evidente em produtos cárneos, porém em pescado, como o teor de mioglobina é reduzido, este defeito tecnológico torna-se insignificante. Outras conseqüências do uso de CO₂ em altas concentrações podem ser observados em pescado, como a descoloração da córnea, tornando-se mais acinzentada, o branqueamento da pele e a perda de brilho natural da musculatura quando o pescado é submetido a > 60% CO₂ (STAHAM, 1984).

LANNELONGUE et al (1982) observaram formação de pigmentos esverdeados em carne de pescado (*Ziphius gladius*) em CO₂ após 11 dias de estocagem. PARKIN et al (1981), porém não observaram diferença de coloração entre filés de pescado estocado em 80% CO₂ e filés frescos. Formação de odor ácido, alguma alteração de textura e perda de líquido “drip”, também são observados (STAMMEN et al, 1990).

2.6.4 - Microbiota contaminante de pescado conservado em embalagens sob atmosfera modificada.

O pescado assim como outros alimentos de origem animal, é bastante susceptível ao processo de deterioração química e microbiológica. Os organismos mais acusados de alteração em pescados são os *Pseudomonas* spp, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, e *Shevanella putrefasciens* (WARD e BAJ, 1988; FARBER, 1991; FRAZIER; WESTHOFF, 1993; DALGAARD, 1995; SIVERTSVIK et al, 2003). Esta deterioração ocorre pela ação conjunta destes e outros gêneros, e muitos são completamente inofensivos ao homem (HUSS et al, 1997).

Na busca de alternativas capazes de minimizar esta multiplicação e conseqüentemente as alterações ocorridas no pescado, a utilização de atmosferas modificadas tem se mostrado bastante eficiente, aumentando o “shelf life” deste

alimento, sobretudo quando empregada simultaneamente com baixas temperaturas, sendo atualmente uma das mais fortes ferramentas tecnológicas que se dispõe. Muitos organismos são incapazes de crescer em temperaturas abaixo de 10°C, e mesmo os psicotróficos se multiplicam lentamente, com uma fase lag em geral aumentada em função de condições adversas. Como explicado anteriormente, a solubilidade do CO₂ aumenta em baixas temperaturas, maximizando o efeito de EAM em pescado (SIVERTSVIK et al, 2002). A susceptibilidade ao CO₂ varia entre as espécies contaminantes, sendo que *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* são considerados bastante sensíveis ao gás, enquanto *Proteus* está entre os mais resistentes (STAHAM, 1984), sendo que o nível de inibição está diretamente relacionado a concentração de CO₂ (STAMMEN et al, 1990).

LANNELONGUE; FINNE (1986) isolaram *Micrococcus varians*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio* spp, *Moraxella* e *Corynebacterium* spp de pescado (*Pogonias cromis*) e inocularam em meio de cultura sólido a 4°C e 25°C, em ar e atmosferas contendo de 25% a 100% de CO₂. Em 25% de CO₂ e a 4°C não foi observado crescimento, porém em ar houve multiplicação. Em temperatura de 25°C *Vibrio* spp foi o mais sensível ao CO₂, enquanto *Micrococcus varians* foi o mais resistente. Em estudo onde utilizou como amostras filés de peixe pedra (*Sebastes* spp), PARKIN et al (1981) puderam observar o efeito inibidor do CO₂, pois verificou nas contagens de microrganismos heterotróficos mesófilos, que os filés estocados em ar sofreram rápido processo de deterioração em comparação com aqueles mantidos sob 80% CO₂. SIVERTSVIK et al (2003) também chegaram à mesma conclusão, ao estudar o comportamento da microbiota heterotrófica mesofílica em filés de salmão (*Salmo salar*) estocados em ar e em 60% CO₂. Estes autores verificaram que, no décimo dia de estocagem em ar, a contagem em “plate count Agar” (PCA) já atingira log 7 UFC/g, quantidade suficiente para considerar produtos cárneos impróprios para consumo (AYRES, 1960). Outros autores, como REDDY et al (1994), REDDY et al (1995), ao estudarem o comportamento de heterotróficos aeróbios mesófilos em filés de tiápias (*Oreochromis nilótica*) e LÓPEZ-GALVEZ et al (1995), trabalhando com filés de Atum (*Thunnus alalunga*) também observaram aumento de “shelf life” destes filés quando submetidos à ação do CO₂, em variadas concentrações.

A *Shevanella putrefasciens* é outro microrganismo deteriorante de pescado que apresenta certa resistência ao CO₂, e como esta bactéria é capaz de reduzir

OTMA até TMA, e também produzir H₂S, esta resistência torna-se importante do ponto de vista higiênico (STAMMEN et al, 1990).

A microbiota contaminante do pescado, composta essencialmente por bactérias Gram (-), além de *Enterobacteriaceae* (CHURCH, 1994), quando submetida à ação do CO₂, ou quando estocada sob vácuo experimenta forte modificação com inibição desta, passando a prevalecer após poucos dias microrganismos Gram (+), com predominância de bactérias lácticas, especialmente *Lactobacillus* spp, o qual se mostra bastante resistente ao gás (SIVERTSVIK et al, 2002). MOKHELE et al (1983) e STENSTRÖM (1985) também obseraram a predominância de *Lactobacillus* spp em filés de bacalhau (*Gadus mohua*) e peixe pedra (*Sebastes* spp) estocados em altas concentrações de CO₂. Neste último estudo, os outros microrganismos mais encontrados foram *S. putrefasciens*, e *B. thermosfacta*. As Bactérias lácticas não são consideradas como microrganismos potencialmente deteriorantes, apesar de contribuir com este processo quando em altas concentrações (SORHEIM ; NISSEN, 2005).

2.6.5 - Patógenos em pescados embalados em atmosfera modificada

Apesar de todas as vantagens da utilização de EAM em pescados, dentre outras, por diminuir sensivelmente a multiplicação de microrganismos deteriorantes característicos, esta tecnologia deve ser motivo também de muita cautela em sua execução. A própria extensão do prazo de vida de prateleira, tida como uma das principais vantagens do uso de EAM, pode se tornar um perigo biológico, uma vez que há a possibilidade de proporcionar o crescimento de determinados microrganismos patogênicos, como *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Clostridium botulinum* tipo E, e cepas não proteolíticas tipo B (FARBER, 1991), além de *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp, *Vibrio* spp e *Enterococcus* spp (STAHAM, 1984). Este último é importante quando se usam altas concentrações de CO₂ e há ausência de O₂. SPERBER (1982) observou o comportamento de *C. botulinum* em diferentes temperaturas de refrigeração, e verificou que o tempo para esta bactéria produzir toxina estocada em 5,6⁰C, 4,4⁰C, e 3,3⁰C foi de 27, 33, e 129 dias respectivamente. Outros estudos, porém, demonstram haver inibição destes patógenos quando submetidos à ação do CO₂, e SILLIKER; WOLFE (1980), e REDDY et al (1994)

afirmam que os riscos de enfermidade alimentar por este microrganismo é o mesmo, tanto em CO₂ quanto em ar. Dentre estes, merecem destaque os chamados patógenos emergentes, e dentre estes os que possuem a habilidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, como *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, e *Listeria monocytogenes*, que são objeto deste experimento, e cujas características serão detalhadas a seguir.

2.6.5.1 - *Aeromonas hydrophila*

A palavra *Aeromonas* deriva do grego “aer” que quer dizer ar ou gás, e “monas”, que significa unidade (ISONHOOD; DRAKE, 2002). A caracterização taxonômica do gênero *Aeromonas* é bastante complexa, e ainda hoje é motivo de pesquisa e adequações. Anteriormente era inserido na família *Vibrionaceae*, o qual inclui também os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, e *Plesiomonas* (HOLT et al, 1994_b). Contudo, este microrganismo foi estudado quanto a seus caracteres genéticos e moleculares (COLWELL et al, 1986) não sendo confirmada relação próxima com estas bactérias, sendo indicada a sua colocação na nova família *Aeromonadaceae*, fato que acabaria ocorrendo tempos depois (JOSEPH; CARNAHAN, 2000).

O Gênero é dividido em dois grupos distintos. Um deles é composto por uma única espécie, psicrotrófica e imóvel, a *A. salmonicida*, e o outro consiste de três espécies de caráter mesofílico e móveis, quais sejam *A. hydrophila*, *A. caviae*, e *A. sobria*. Subseqüentes estudos com estas espécies indicaram haver diferenças fenotípicas (bioquímicas) e genotípicas (moleculares), e levaram a extensão do número de espécies para um total de 14 (MARTINEZ; MURCIA et al, 1992b; ESTEVE et al, 1995; HUYS et al, 1997; JOSEPH; CARNAHAN, 2000[‡] *apud* GARCIA-LÓPEZ et al, 2004; KIROV[§], 2001 *apud* GARCIA-LÓPEZ et al, 2004; PIDIYAR et al, 2002; EUZEBY, 2003), *A. allosacharophila*, *A. bestiraum*, *A. encheleia*, *A. eucrinophila*, *A. jandaei*, *A. popoffii*, *A. media*, *A. schubertii*, *A. veronii*, e *A. trota*.

[§] KIROV, S. M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2.ed. Washington, ASM press, 301-327.

Na espécie *A. hydrophila* foram caracterizadas cinco subespécies, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *proteolytica* e *A. hydrophila* subsp. *ranae* (HARF-MONTEIL et al, 2004).

São bastonetes Gram negativos retos, anaeróbios facultativos, medindo cerca de 1 a 3,5µm de comprimento e largura de 0,3 a 1µm. Possui flagelo polar geralmente monitríquio de 1,7µm de comprimento, mas em algumas culturas novas podem surgir células com flagelo lateral. São oxidase e catalase positivas, fermentam carboidratos como glicose, frutose, maltose, e trealose com produção de ácidos e gás (Tabela 1) (VARNAN; EVANS, 1991; HOLT et al, 1994; ISONHOOD; DRAKE, 2002). São de caráter mesofílico, crescendo muito bem a 28^oC e ao máximo de 42^oC (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Segundo Varnan; Evans (1991) *Aeromonas* spp possui uma morfologia celular distinta, na qual há considerável variação na forma e tamanho das células, com algumas cepas se apresentando como curtos bastonetes, enquanto outras se mostram longas e filamentosas.

Dependendo da cepa de *Aeromonas hydrophila* a tolerância ao sal pode variar de acordo com a cepa estudada e as outras condições do meio. PALUMBO et al (1985) verificaram o crescimento de *A. hydrophila* cepas BA2 e BA7 com 5% de NaCl em caldo "brain heart infusion" (BHI) quando incubado a 28^oC, temperatura considerada ótima para o microrganismo. Estes autores ainda citam que a maioria das cepas cresce em concentrações em torno de 2% a 4%, sendo que existem algumas poucas cepas com certa dependência, que são incapazes de crescer em meios que contenham menos de 0,3% de sal. Podem tolerar pH entre 5,5 a 9,0 (ISONHOOD; DRAKE, 2002), sendo a tolerância maior obtida em pH neutro ou levemente alcalino (MERINO et al, 1995). *A. hydrophila* revela ser bastante sensível quando submetido a pH abaixo de 6,0, podendo crescer até um pH de 5,8 em maionese ou pescado marinado somente em condições ótimas de 28^oC e 0,5% de NaCl (PALUMBO et al, 2001; MERINO et al, 1995). Parece existir uma forte relação entre a tolerância ao pH e ao NaCl, sendo melhor o crescimento em pH >6,0 e <4% de NaCl (VARNAN; EVANS, 1991; GARCÍA LÓPEZ et al, 2005).

Aeromonas hydrophila pode crescer, minimamente, em temperaturas de cerca de -0,1^oC a +1,2^oC em alimentos, sendo que a 4^oC o desenvolvimento é mais satisfatório, se as demais condições forem adequadas (PALUMBO et al, 1985;

VARNAN e EVANS, 1991). A temperatura ótima de crescimento é de 28⁰C, mas já foi evidenciado desenvolvimento em 45⁰C (GARCÍA LÓPEZ et al, 2005). Quanto à atividade de água (a_w) deste microrganismo, SANTOS et al (1994) afirmaram que *A. hydrophila* pode crescer em reduzidos teores, desde que outras condições a favoreçam. Neste estudo foi evidenciado crescimento em a_w 0,940 - 0,973 a 28⁰C, 0,959 - 0,980 a 10⁰C, e 0,975 - 0,980 a 3,8⁰C.

Em termos gerais *A. hydrophila* parece não resistir aos tratamentos usuais executados no processamento de alimentos. Esses organismos são termo sensíveis, não crescem em pH abaixo de 5, ou em concentração de NaCl acima de 3,5%, sobretudo em combinação com polifosfatos (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

Segundo PALUMBO et al (2001), *Aeromonas hydrophila* pode ser encontrada em muitos nichos ecológicos, sobretudo em águas, seja de rios, lagos, poluídas ou não, onde pode alcançar contagens entre >1 ufc/ml até 10⁴ufc/ml, ou mesmo água salina. Pode sobreviver ainda em águas cloradas, se outros fatores de crescimento como temperatura > 14⁰C e fontes de carbono orgânico e fitoplânctons estiverem presentes (GARCÍA LÓPEZ, et al, 2005). Em águas residuais de tratamentos de esgoto e industriais *Aeromonas* spp pode também ser encontrada, em números que variam entre 10⁷ e 10⁸ ufc/ml (VARNAN; EVANS, 1991; LECLERC, et al, 2002).

Este caráter ubíquo ocasiona a presença de *A. hydrophila* em muitos tipos de alimentos de origem animal, como carne suína, bovina, ovina, aves, leite cru, e pescados (DOHERTY, et al, 1996; TSAI; CHEN, 1996; PALUMBO et al, 2001; ISONHOOD; DRAKE, 2002) além de vegetais como brócolis, espinafre, alface, e salsa (VARNAN; EVANS, 1991). São também encontrados em fezes de homens e animais terrestres e aquáticos (SUGITA et al, 1995), porém são habitantes de caráter transitório, e este “hábitat” não parece ser de importância em saúde pública, estando as contaminações de alimentos mais associadas à água utilizada nas indústrias de beneficiamento (BORSH, et al, 1974).

Em virtude de seu “hábitat”, a contaminação de pescados por *A. hydrophila* torna-se de grande importância sanitária, sendo que esta bactéria pode estar presente em peixes, ostras, mexilhões, carangueijos, e camarões (TSAI; CHEN, 1996; ISONHOOD; DRAKE, 2002), mesmo obtidos de águas supostamente límpidas, carreando ao animal elevado número de *Aeromonas* spp, que são capazes de se multiplicar em temperaturas normalmente utilizadas na estocagem do pescado (GONZÁLEZ, et al, 2001). Existe correlação evidente entre o consumo de moluscos

bivalvos e a ocorrência de surtos envolvendo *A. hydrophila* nos Estados Unidos, em virtude da própria natureza filtradora do molusco que pode albergar grandes quantidades de microrganismos (VARNAN; EVANS, 1991).

Apesar do crescente interesse sobre os fatores de virulência de *A. hydrophila*, associados com casos de gastroenterite humana, muitos ainda permanecem desconhecidos ou ainda não plenamente elucidados (GARCÍA LÓPEZ, et al, 2005). Uma das razões é a falta de um modelo de experimentação animal para identificação da enfermidade por *Aeromonas*, além de estudos inconclusivos com voluntários humanos. Ainda não se pode garantir sobre a existência de grupos específicos capazes de causar transtornos no homem, e aparentemente somente umas poucas cepas podem ser responsáveis por quadros de enfermidade alimentar. Dentre os fatores conhecidos destacam-se as hemolisinas, invasinas, exotoxinas, endotoxinas (lipopolissacarídeos-LPS), fímbrias, sideróforos e uma variedade de enzimas extra celulares (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

Aeromonas produz α e β hemolisinas, e seu efeito combinado pode causar hemólise e citotoxicidade. A α hemolisina também pode causar lise de hemácias (SANTOS et al, 1999).

As invasinas estão associadas a casos de disenteria, o que sugere um mecanismo de invasão tecidual, que ainda necessita de mais estudos (JANDA, 1991).

Foram descritas até o momento duas enterotoxinas em *Aeromonas* spp, as citotônicas e as citotóxicas. As citotônicas provocam o arredondamento das células da adrenal de camundongos, porém sem haver destruição, e são inativadas a 60^oC por 20 minutos. Já a enterotoxina citotóxica causa o engurgitamento da célula e também a morte do tecido celular (FRANCO; LANDGRAF, 1996), podendo ser produzida por *A. hydrophila* em temperaturas de 4^oC (ELEY, et al, 1993).

O antígeno LPS - O de *A. hydrophila* desempenha um importante papel na adesão bacteriana às células da mucosa intestinal. Pesquisas recentes evidenciam que cepas contendo o antígeno LPS – O são mais virulentas quando crescem em baixas temperaturas (ISONHOOD; DRAKE, 2002; GARCÍA LÓPEZ, et al, 2005).

As fímbrias possibilitam a adesão de *Aeromonas* spp a diferentes tipos de células, sendo que dois tipos de fímbrias têm sido identificados. Fímbrias pequenas e rígidas, que ocorrem em um grande número de bactérias, e as fímbrias longas e flexíveis, que ocorrem em um pequeno número de células bacterianas. Os dois tipos

tem sido encontrados de diferentes cepas oriundas de isolamentos clínicos e ambientais (MERINO, et al, 1995).

Enzimas extra celulares como proteases, DNases, elastases, lecitinases, amilases, gelatinases e citinases, apresentam certa importância no mecanismo de patogenicidade de *Aeromonas*. As proteases (metalopeptidases e peptidases séricas) são produzidas em condições ótimas de temperatura, pH e potencial redox (O'REILLY, 1983), produzem danos teciduais e prejudicam o sistema de defesa do hospedeiro, e algumas ainda atuam na ativação de toxinas. Quando em presença de microbiota láctica competidora, como *Lactococcus lactis*, o crescimento e produção de proteases de *A. hydrophila* podem ser inibidos. As lípases também possuem propriedades associadas com virulência, sendo que a glicerofosfolípideo-colesterol-aciltransferase (CGAT) é encontrada em *Aeromonas* spp e *Vibrio* spp, tem propriedade de lise de membrana celular e de eritrócitos (GARCÍA LÓPEZ, et al, 2005).

Existem determinados grupos considerados de risco quanto à infecção por *A. hydrophila*, como crianças, idosos e imunodeprimidos (ISONHOOD; DRAKE, 2002), sendo o microrganismo implicado em casos de septicemia, meningite, peritonite, endocardite, alterações do trato respiratório, infecções oculares, síndrome urêmica hemolítica (GARCÍA LÓPEZ, et al, 2005). A gastroenterite causada por *Aeromonas* spp pode ser caracterizada por diarreia aquosa, que corresponde a 75% dos casos, ou por disenteria (CHAMPSAUR et al, 1982).

A presença de O₂ exerce pouca influência sob o crescimento de *A. hydrophila*, tendo este microrganismo já sido isolado de alimentos embalados à vácuo (INGHAM, 1990; MERINO et al, 1995). Inclusive a redução de O₂ em embalagens chega a favorecer o desenvolvimento de *Aeromonas* spp, em virtude da supressão do crescimento de *Pseudomonas* spp (BUCHANAN; PALUMBO, 1985). GOLDEN (1989) e MANO et al, (2000) ressaltaram o bom desenvolvimento de *Aeromonas* spp em atmosfera de 100% de N₂. O CO₂, ao contrário parece apresentar efeito inibidor sobre a bactéria, sendo o principal gás utilizado na composição inibitória de atmosferas modificadas (VARNAN; EVANS, 1991; GOLDEN, 1989). INGHAM (1990) não evidenciou crescimento de *A. hydrophila* em pescado estocado a +2°C, porém observou pequeno desenvolvimento em +8°C em atmosferas contendo 80% CO₂ / 20% N₂, o que caracteriza a importância do uso de baixas temperaturas com intenção de maximizar o efeito inibidor de atmosferas modificadas.

Vale ressaltar também que o desenvolvimento de *A. hydrophila* está diretamente relacionado à quantidade de CO₂ utilizado nas embalagens, sendo menor à medida que se utilizam maiores teores do referido gás, como comprovam os resultados alcançados por DAVIES; SLADE (1995) que, ao estudarem o comportamento de *A. hydrophila* em bacalhau (*Gadus mohua*) e truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) a +0°C, +5°C, e +12°C, utilizando atmosferas contendo 60% CO₂ / 40% N₂ e 40% CO₂ / 30% N₂ / 30% O₂, verificaram marcada inibição da multiplicação microbiana a +0°C, +5°C, e ainda uma ligeira inibição a +12°C. O pH também exerce influência no crescimento de *A. hydrophila*, em atmosferas modificadas, sendo este microrganismo bastante sensível quando submetido a pH abaixo de 6.0 (DOHERTY, et al, 1996). Estas informações corroboram a constatação de que são necessárias combinações de determinados fatores, como baixas temperaturas, pH, e inibição por microbiota contaminante para se ter um efeito mais incisivo da ação de atmosferas modificadas sobre microrganismos patogênicos (GARCIA DE FERNANDO et al, 1995).

Algumas características de virulência como, a produção de hemolisinas também são inibidas quando *A. hydrophila* encontra-se sob efeito de atmosferas modificadas e de baixas temperaturas, sobretudo quando existem altas concentrações de CO₂, informação que vem a corroborar com a importância sanitária do uso correto do frio aliado a tecnologia de atmosferas modificadas (McMAHON, 2000).

2.6.5.2 - *Yersinia enterocolitica*

O Gênero *Yersinia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, em virtude de possuir antígenos, características bioquímicas e moleculares comuns, são microrganismos oxidase negativos e fermentam a glicose com produção de gás. Atualmente as espécies conhecidas são: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. ruckeri*, e *Y. enterocolitica*. Baseado nas suas propriedades bioquímicas, as cepas de *Y. enterocolitica* são classificadas em diferentes biótipos. Apresentam cerca de 57 antígenos somáticos "O", 19 flagelares "H", além de antígenos capsulares "K" (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

São bastonetes Gram negativos, não esporulados, e anaeróbios facultativos, medem cerca de 0,5 a 0,8 μm de diâmetro e 0,5 a 0,8 μm de comprimento. São imóveis a 37^oC, porém móveis com flagelos peritríquios quando em temperaturas abaixo de 30^oC. As características bioquímicas estão discriminadas na tabela 2 (a 1 é pra *Aeromonas*). As células vegetativas em culturas recentes são tipicamente ovóides ou alongadas, e são móveis em temperaturas abaixo de 30^oC, e imóveis a 37^oC. O teste do indol é positivo na reação com vermelho de metila e negativo na prova de Voges Proskauer. A *Y. enterocolitica* geralmente não utiliza citrato como fonte de carbono (STERN; PIERSON, 1979; VARNAN; EVANS, 1991). Pode crescer em temperaturas compreendidas entre -2^oC e + 45^oC, com um ótimo desenvolvimento a cerca de 30^oC a 37^oC (HOLT, 1994_b). O crescimento em caldo BHI foi estudado em relação a tolerância ao pH e ao NaCl, por HANNAH et al (1979), que obtiveram melhores resultados na faixa compreendida entre pH 7,0 e 8,0 e o crescimento cessou em \leq pH 5,0. Quanto a concentração de NaCl, foi observada a inibição de 4 cepas de *Y. enterocolitica* em caldo BHI com 5 a 7% a 25^oC.

A capacidade de *Y. enterocolitica* de se multiplicar em ambientes onde existe uma microbiota competitiva diminui bastante, sobretudo se for composta por bactérias lácticas (JEPPESEN; HUSS, 1993), outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* (FUKUSHIMA; GOMYODA, 1986), e *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida* (SCHIEMANN; OLSON, 1984). Estes últimos autores atribuem tal fato principalmente ao acúmulo de metabólitos, quando a microbiota competitiva atinge a fase estacionária de crescimento. KLEINLEIN; UNTERMANN (1990) verificaram o comportamento de *Y. enterocolitica* inoculada em carne moída estéril embalada em ar atmosférico, e também carne moída com microbiota contaminante, adicionada de atmosfera de 20% CO₂ e 80% O₂ e verificaram uma sensível inibição do patógeno frente à competição microbiana, e mesmo em carne esterilizada estocada a 1^oC *Y. enterocolitica* só aumentou em 1 log, efeito atribuído à temperatura.

Os sorotipos encontrados no ambiente mais freqüentemente associadas à doenças em humanos nos Estados Unidos são O:3, O:9, O:5, O:27 e O:8, sendo estas estirpes de natureza psicrotrófica (LECLERC et al, 2002).

Bactérias do gênero *Yersinia* tem sido isoladas de várias fontes ambientais, incluindo águas de rios e lagos, e mesmo águas tratadas (SCHIEMANN, 1990 *apud*

LECLERC, 2002) **. Como tem caráter ubíquo, além da água pode ser também isolada de uma série de alimentos, sejam naturais ou mesmo industrializados. Os principais reservatórios de *Y. enterocolitica* são o trato gastrointestinal de animais, incluindo suínos, bovinos, cães, ratos, rãs, pássaros e moscas (KANEKO et al, 1978; FUKUSHIMA, et al, 1979; AULISIO et al, 1983; KATO et al, 1985; WEAGANT; FENG, 2001), porém as maiores fontes são sem dúvida os suínos (DOYLE, et al, 1981). O microrganismo é resistente a condições extremas de estocagem, podendo sobreviver a -16° C, durante alguns meses em carnes, ou a 4° C, por algumas semanas, na parte externa de embalagens contaminadas. Este tipo de resistência propicia a contaminação de equipamentos e utensílios (WEAGANT; FENG, 2001).

Essas características do microrganismo têm levado preocupação a alguns países em relação ao comércio internacional de alimentos, pela possibilidade da introdução de *Y. enterocolitica* veiculada por produtos contaminados importados (FUKUSHIMA et al, 1997).

Em virtude de sua presença abundante em ambiente aquático, *Y. enterocolitica* tem sido isolada de pescados, e pela sua capacidade de crescer em baixas temperaturas, sua presença em pescados é vista com preocupação pela indústria (WARD, 1989; SPENCER GARRETT, 1997).

A rota normal de infecção por *Y. enterocolitica* se inicia no consumo de água ou alimentos contaminados com a bactéria. O organismo deve ter condições favoráveis ao crescimento, e deve estar presente em número suficiente para causar enfermidade. Tem sido sugerida quantidade entre 10^4 e 10^9 UFC/ g ou ml de alimento para o desencadeamento de processo infeccioso em humanos (STERN; PEARSON, 1979). A patogenicidade de cepas virulentas deste microrganismo ocorre primeiramente pela adesão às células do trato intestinal, auxiliada por proteínas da membrana e plasmídios geneticamente codificados (YadA) para a função de virulência. A segunda etapa no processo patológico é a invasão tecidual promovida por cromossomos ligados a patogenicidade, onde *invasinas* (*inv*) e *ail* (*attachment invasion locus*) promovem a penetração no interior das células (VARNAN; EVANS, 1991; BOTTONNE, 1999). Esta invasão segue para as placas de Peyer, onde há forte colonização, atravessa a mucosa e posteriormente penetra nos

** SCHIEMANN, Donald, A. *Yersinia enterocolitica* in drinking water. In. Drinking water microbiology. McFeters, G.A. Ed., pp.322-340, 1990. New York: Springer-Verlag.

lonfonodos mesentéricos onde se multiplicam, provocando intensa dor abdominal (FRANCO; LANDGRAF, 1996; BOTTONE, 1999). Esta dor é muitas vezes confundida por médicos com apendicite, levando à cirurgias para remoção do apêndice em inúmeros pacientes (BOTTONE, 1999).

A proteção do microrganismo contra o processo de fagocitose é um dos efeitos mais importantes de plasmídios e membranas protéicas (Yops). Em um primeiro momento após a invasão as células virulentas são fagocitadas e seu número decresce, porém dentro de algumas horas há um grande crescimento, o qual pode ser atribuído à ação de Yops (VARNAN; EVANS, 1991).

Tanto cepas virulentas, como não virulentas são capazes de produzir toxinas termo estáveis (Yst). Estas se assemelham bastante a produzida por *Escherichia coli*, e são controladas por cromossomos ligados a patogenicidade, sendo sua ação ativada em torno de 26⁰C e inativada a 30⁰C, o que torna seu papel sanitário praticamente nulo (VARNAN; EVANS, 1991; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Um alto nível de atividade lipolítica tem sido atribuído como um fator adicional de virulência de *Y. enterocolitica*, sorovar O:8, atuando sobre as barreiras de lipídeos, facilitando a penetração da bactéria nos tecidos circunvizinhos (VARNAN; EVANS, 1991).

Em meados de 1972, cerca de 188 crianças, um professor e alguns funcionários de uma escola no Japão, sofreram um quadro de enfermidade alimentar causado por *Y. enterocolitica*, que foi encontrada nas fezes dos pacientes acometidos, porém a fonte de infecção nunca foi realmente detectada. A cepa em questão apresentou o antígeno O e o sorotipo 3 (O:3). Este talvez tenha sido o primeiro surto de enfermidade alimentar causada por *Y. enterocolitica* documentada no mundo (AZAKAWA et al, 1973* apud STERN; PEARSON, 1979). Após este episódio alguns outros se seguiram, como o surto ocorrido em uma escola no Estado de New York – USA onde 220 crianças foram acometidas de enfermidade alimentar causada por leite achocolatado. Cerca de 36 crianças foram hospitalizadas e 16 tiveram que ser submetidas a cirurgia para retirada do apêndice. *Y. enterocolitica* foi isolada das fezes das crianças e da bebida achocolatada, e o sorotipo O:8 foi o incriminado (STERN; PEARSON, 1979).

* AZAKAWA, et al. Two community outbreaks of human infection with *Yersinia enterocolitica*. Journal of Hygiene., Camb. 71:715., 1973.

Este patógeno é entérico para humanos, porém com possibilidade de infecção septicêmica se encontrar determinadas condições para evoluir para este quadro, como imunossupressão, alto teor de ferro na corrente sanguínea, ou recém transplantado. Os sintomas gastrintestinais mais evidentes são enterocolite, sobretudo em crianças, pseudoapendicite, linfadenite mesentérica aguda, febre, diarreia e disenteria. No quadro septicêmico observa-se abscessos focais, quadro pneumônico, panoftalmite, meningite, endocardite, osteomielite e artrite, que persiste mesmo após a resolução do quadro (STERN; PEARSON, 1979; VARNAN; EVANS, 1991; BOTTONNE, 1999).

O comportamento de *Y. enterocolitica* quando submetida a concentrações de CO₂, ainda não está totalmente esclarecido, tendo sido verificado crescimento, embora lento, tanto em atmosferas de 100% deste gás (HUDSON et al, 1994), como também constatada inibição em concentrações menores, tais como 44% CO₂ (BARAKAT; HARRIS, 1999), e 20% CO₂ (KLEINLEIN; UNTERMANN, 1990; MANU-TAWIAH, 1993). Em todos estes estudos as amostras de carne bovina ou suína foram submetidas a temperaturas de refrigeração entre +1^oC e +15^oC, e os resultados demonstraram marcada inibição do microrganismo em temperaturas próximas a 0^oC, mesmo em alimentos obtidos em condições de esterilidade, o que demonstra a importância da temperatura de estocagem dos alimentos no controle do crescimento de *Y. enterocolitica* (KLEINLEIN; UNTERMANN, 1990). A inibição frente ao CO₂ se mostra bem mais evidente quando o microrganismo é submetido a temperaturas de estocagem próximas de 0^oC (DAVIES; SLADE, 1995). Em embalagens contendo O₂ o crescimento de *Y. enterocolitica* é retardado ou mesmo inibido, e a utilização de atmosferas contendo misturas de CO₂ e O₂ parece ser bem mais eficiente do que misturas de CO₂ e N₂, porém a causa desta inibição ainda não é totalmente conhecida (KLEINLEIN; UNTERMANN, 1990; MANU-TAWIAH, 1993). A microbiota contaminante do alimento, composta basicamente por bactérias lácticas, *Pseudomonas* spp, *Enterobacteriaceae*, e *Brochotrix thermosphacta* exerce também grande influência no crescimento de *Y. enterocolitica*, ocorrendo inibição do patógeno, sobretudo se houver estocagem em baixas temperaturas, auxiliada por atmosferas compostas por misturas de CO₂ / O₂ (MANU-TAWIAH, 1993). BARAKAT; HARRIS (1999), porém não observaram inibição de *Y. enterocolitica* inoculada em carne de frango embalado em atmosfera contendo 44% CO₂ / 56 N₂. Talvez as

temperaturas de 3,5 6,5, e 10⁰C possam ter permitido o crescimento dos referidos patógenos.

Apesar de alguns resultados contraditórios encontrados em alguns estudos, HUDSON et al (1994) afirmaram que, para se conseguir uma inibição satisfatória de *Y. enterocolitica* em atmosferas isentas de O₂, a concentração de CO₂ deve ser de, no mínimo 75%.

2.6.5.3 - *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes está inserida no grupo 19 do “Bergey’s Manual of Systematic bacteriology” (HOLT, 1994_c). Este grupo agrega gêneros de bactérias bastonetes Gram positivos não formadores de esporos. O gênero *Listeria* inclui também outras 6 espécies diferenciadas por suas características bioquímicas e sorológicas, como *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. murrayi*, e *L. grayi*. Destas espécies, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas, e *L. monocytogenes* é sem dúvida a que tem maior importância sanitária para o homem (RYSER; DONNELLY, 2001).

L. monocytogenes é um bastonete Gram positivo, podendo crescer tanto aeróbica quanto anaerobicamente, porém tem preferência por ambientes microaerófilos, é móvel devido a flagelos peritríquios, e mede cerca de 2,0μ de comprimento por 0,5 μ de largura. Pode apresentar forma cocóide em culturas velhas, e apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase (RYSER; DONNELLY, 2001), sendo as demais características bioquímicas apresentadas na tabela 3.

Como todo microrganismo, a temperatura é um dos fatores mais importantes no crescimento de *L. monocytogenes*, sendo constatado crescimento em temperaturas compreendidas entre +1⁰C e +45⁰C com ótima possibilidade de multiplicação entre +30⁰C e +37⁰C (WILKINS; MARCH, 1972). O comportamento de *L. monocytogenes* em baixas temperaturas não é ainda muito bem definido, porém existe possibilidade de crescimento, embora lento, a +1⁰C ± 0,1⁰C (JUNTILLA et al, 1988; GARCIA de FERNANDO et al, 1995). Outros autores como HUDSON et al, (1994) evidenciaram desenvolvimento de *L. monocytogenes* em carne bovina estocada a -1,5⁰C. O comportamento deste microrganismo quando a temperatura

ambiente se encontra abaixo de +5⁰C caracteriza-se por uma extensa fase lag, alcançando inclusive vários dias de duração, seguido por um lento crescimento.

Outro fator importante no desenvolvimento de *L. monocytogenes* é o pH do meio, e Conner et al, (1986) estudando o comportamento desta bactéria, observaram crescimento mesmo em pH abaixo de 5,0. GEORGE et al, (1988) por sua vez demonstraram haver forte relação entre temperatura e pH, pois encontraram um limite de desenvolvimento em pH 4,42 quando *L. monocytogenes* era submetida a +30⁰C. Este microrganismo também parece ser pouco sensível a variações de pH tendendo à alcalinidade, pois foi verificado crescimento em pH 9,5 (LOVETT; TWEDT, 1988).

Quanto a concentração de NaCl, McLURE et al (1989), observaram alta tolerância ao sal por *L. monocytogenes*, sendo esta tolerância estritamente relacionada a existência de outros fatores de crescimento, como temperatura e pH. Foi verificado no estudo destes autores crescimento do microrganismo em concentração de 10% de NaCl a +35⁰C e pH neutro.

L. monocytogenes tem pouco poder de competição frente a microbiota contaminante, sobretudo psicrotróficos (GRIFFITHS, 1989). Porém esta contaminação tem que ser bem maior do que a do patógeno, pois do contrário haverá pouca ou nenhuma inibição (MARSHAL; SCHMIDT, 1988). Em relação a bactérias lácticas, *L. monocytogenes* já demonstrou fraco poder de competição em relação a espécie *Pediococcus acidilactici*, talvez devido a produção de bacteriocina (pediocina) (BERRY et al, 1988).

A *L. monocytogenes* é largamente distribuída no ambiente, sendo encontrada em uma variedade de fontes, como o solo, lama, água, silagens, vegetação, fezes e até mesmo nos esgotos (WALKINS; SLEATH, 1981; RYSER; DONNELLY, 2001). Em virtude de sua característica ubiquitária, este microrganismo facilmente contamina animais, localizando-se no trato intestinal destes. Pássaros, formigas e moscas podem contaminar água, silagem para animais, e mesmo os próprios animais que serão consumidos pelo homem (VARNAN; EVANS, 1991). Vários tipos de alimentos tem sido apontados como possíveis fontes de contaminação por *L. monocytogenes*, sobretudo o leite e seus derivados, com prevalência de 2 a 4% do volume de leite obtido. Porém, este patógeno tem sido comumente isolado de outros produtos de origem animal, como carne bovina e aves (WARD, 1989; RYSER; DONNELLY, 2001). A contaminação por *L. monocytogens* tem sido verificada

também em peixes e crustáceos, onde se verificou crescimento da bactéria nesses alimentos mesmo em temperaturas de refrigeração (BUCHANAN et al, 1989; FARBER, 1991; ROSVIK; YNDESTAD, 1991; ROSVIK et al, 1991; HEINITZ; JOHNSON, 1998). A *L. monocytogenes* pode contaminar plantas de processamento de alimentos, e as principais vias são a água de lavagem, e restos de alimentos no chão, que são considerados fontes permanentes de multiplicação microbiana, portanto a manutenção de um ambiente higiênico ao longo do processamento, e um eficiente sistema de lavagem e sanificação da indústria auxiliam no controle da contaminação por *L. monocytogenes* (COX et al, 1989).

Segundo RYSER; DONNELLY (2001), o mecanismo pelo qual *L. monocytogenes* causa enfermidade no homem inicia-se pela ingestão do microrganismo, em hospedeiros geralmente imunocomprometidos, gestantes, crianças, seguida por invasão da bactéria na mucosa gastrintestinal, penetração nas células do hospedeiro e passagem para outras células antes da fagocitose por macrófagos. Posteriormente há lise dos macrófagos, com liberação de grande quantidade de células, podendo atingir a corrente sanguínea em direção a sítios considerados alvos, como placenta, e sistema nervoso.

Assim como outros patógenos de caráter enteroinvasivo, *L. monocytogenes* possui uma variedade de fatores de virulência que causam danos aos tecidos do hospedeiro, facilitando sua penetração e causando enfermidade, como a hemolisina listeriolisina O (LLO), mediada pelo gene *hly* que é considerada como o melhor determinante de patogenicidade para *L. monocytogenes*, e têm a função de lisar vacúolos permitindo a multiplicação bacteriana no interior das células. Além do *hly*, outros genes regulam a produção de fatores de virulência, como o *plcA* e *plcB*, que estão envolvidos com as fosfolipases, que hidrolisam os lípidos da membrana celular do hospedeiro, o *mpl* e *actA* que estão ligados à degradação protéica e polimerização de filamentos de actina. Ainda existem os genes *inIA*, *inIB*, *inIC*, e *iap*, relacionados as proteínas internalinas e p60, efetivamente associadas ao mecanismo de invasão microbiana (VARNAN; EVANS, 1991; FRANCO; LANDGRAF, 1996; RYSER; DONNELLY, 2001).

L. monocytogenes emergiu como patógeno alimentar em 1985, quando cerca de 300 pessoas no sul da Califórnia-USA foram acometidas de enfermidade depois de consumirem queijo de origem mexicana, e destas 85 vieram a óbito, sendo os principais afetados pela listeriose mulheres gestantes e adultos

imunocomprometidos (LINNAN et al, 1988). Em julho de 1994, Dalton et al (1997) indentificaram um surto de listeriose em 60 pessoas no Estado de Illinois-USA após o consumo de leite achocolatado pasteurizado, com 5 hospitalizações e nenhum óbito. As investigações apontaram alta contaminação por *L. monocytogenes* em tanques de estocagem de achocolatado pasteurizado, indicando a causa como pasteurização insuficiente ou contaminação pós tratamento térmico.

A ingestão de *L. monocytogenes* e subsequente invasão tecidual pode desencadear sintomas semelhantes a uma forte gripe, com mal estar, indisposição, seguida de diarreia e febre, náuseas e vômitos. Pode haver bacteremia, sendo o sintoma mais comum a febre e fadiga. O índice de letalidade em pacientes imunocomprometidos é da ordem de 30%. No caso de comprometimento do sistema nervoso central, a manifestação se dá pelo surgimento de meningite, encefalite e abscessos, e nesta fase a letalidade pode chegar a 70%. O período de incubação varia entre 1 dia até várias semanas e a dose infectante é desconhecida (VARNAN; EVANS, 1991; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

O crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos embalados tanto em atmosferas modificadas como vácuo tem sido estudado nos últimos anos, porém os resultados são bastante distintos, e muitas vezes controversos (GARCIA DE FERNANDO et al, 1995). Estudando o comportamento de *L. monocytogenes* em carne de frango, WIMPFHEIMER et al (1990) não observaram crescimento deste patógeno em atmosferas de 75% CO₂ / 25% N₂, utilizando temperaturas de 4, 7, e até 27°C. Porém os mesmo autores, ao embalar carne de frango em atmosfera de 72,5% CO₂ / 22,5% N₂, e 5% O₂ verificaram a intensa multiplicação do microrganismo. Estes autores identificaram a presença de O₂ como o fator condicionante para o rápido desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Em outro experimento utilizando carne suína, e trabalhando com atmosferas de 20% CO₂ / 0% O₂ / 80% CO₂, 40% N₂ / 0% O₂ / 60% N₂, e 40% CO₂ / 10% O₂ / 50% CO₂, além de ar e vácuo, MANU-TAWIAH et al (1993) observaram o lento crescimento de *L. monocytogenes* em todas as combinações testadas, sendo o vácuo mais inibitório do que o CO₂. Este resultado discorda do trabalho anteriormente citado, pois não houve influência do O₂ no desenvolvimento bacteriano. HUDSON et al (1994) trabalhando com carne bovina embalada em atmosfera saturada de CO₂ e vácuo, também verificaram lenta multiplicação em CO₂, porém seus resultados em vácuo

discordam do estudo de MANU-TAWIAH et al (1993), pois foi observado maior desenvolvimento de *L. monocytogenes* em relação ao CO₂.

Outros fatores são de extrema importância no comportamento de patógenos em atmosferas modificadas. A microbiota contaminante pode influenciar o crescimento deste patógeno, em virtude da produção de compostos antimicrobianos, ou mesmo pela competição por nutrientes, porém a carga microbiana deve ser maior para que esta inibição seja efetiva (DEVLIEGHERE et al, 2001). Para haver a inibição é necessário que a carga microbiana contaminante seja bem mais significativa do que a de *L. monocytogenes*, do contrário poderá ser verificado crescimento semelhante ou até superação da bactéria patogênica (WIMPFHEIMER et al (1990). O pH e temperaturas próximas de 0^oC parecem ser também de grande importância na inibição de *L. monocytogenes*, pois a ação do CO₂ nessas condições é intensificada (BARAKAT; HARRIS, 1999).

Tabela 1. Comportamento bioquímico de *Aeromonas hydrophila*.

	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Ornitina descarboxilase	-
Hidrólise de esculina	+
Produção de gás a partir da glicose	+
Voges Proskauer	+
H ₂ S	+
Resistência à penicilina	+
Lisina	+
Manitol	+
Indol	+
Cefalotina	+
Arabinose	±
Salicina	+
Histidina	+

Fonte: VARNAN ; EVANS (1991); PALUMBO et al (2001).

Tabela 2. Comportamento bioquímico de *Yersinia enterocolitica*

	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Ornitina	+ ^a
Arginina	-
Lisina	-
Voges Proskauer	+/-(+) ^b
Motilidade	+
Uréia	+
Fenilalanina	-
Manitol	+
Sorbitol	+
Celobiose	+
Adonitol	-
Inositol	+/-(+) ^b
Sacarose	+ ^a
Rhamnose	-
Citrato de Simmons	-
Indol	+/-
Esculina	+/-
Lípase	+/-
Pirazinamidase	+

^a = Alguns biótipos são negativos

(+)^b = positivo após sete dias

Fonte: WEAGANT; FENG (2001).

Tabela 3. Comportamento bioquímico de *Listeria monocytogenes*

	<i>Listeria monocytogenes</i>
β hemólise	+
Manitol	-
Rhamnose	+

Xylose	-
Voges Proskauer	+
Hdrólise de hipurato	+
Redução de nitrato	-
Catalase	+
Motilidade	- ^a
Ácido a partir da glicose	+

^a = móvel a 20⁰C - 25⁰C, mas praticamente imóvel a 37⁰C

Fonte: VARNAM; EVANS (1991); HOLT et al (1994_c).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Colheita e transporte de amostras

Este trabalho utilizou como unidades de amostra quatro exemplares de atum (*Thunnus albacares*) de 20 kg em média, e um metro de comprimento (Figura 01), que foram submetidos à inspeção visual, onde foram observados detalhes inerentes à qualidade, como aspecto da superfície corpórea, olhos transparentes ocupando toda a órbita, odor característico, coloração das guelras vermelhas e brilhantes, e musculatura firme sem deixar a impressão digital, e de acordo com o artigo 442 do Regulamento Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (RIISPOA) (BRASIL, 1997), foi constatado

excelente estado de frescor. Além destes exames, também foram efetuadas as medições da temperatura das amostras, em termômetro digital marca Minipa, onde a média foi de +1^oC (Figura 02). Os peixes foram capturados na bacia de Campos, litoral do Estado do Rio de Janeiro (Figura 03). Estes exemplares foram imediatamente acondicionados em caixa de materiais isotérmicos contendo gelo (Figuras 04 e 05) e transportados ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense – UFF, na cidade de Niterói, para a execução de todos os procedimentos referentes ao envase em atmosfera modificada e análises bacterianas (Figura 06). Três exemplares foram inoculados com uma espécie de microrganismo patogênico cada, além de análise de bactérias residentes, e o quarto não foi inoculado, representando a amostra controle, sendo feitas nesse exemplar apenas às análises de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas.

3.2 - Microrganismos patogênicos utilizados

Cada exemplar foi inoculado com uma cepa de um dos seguintes patógenos:

Aeromonas hydrophila pertencente à coleção do Instituto Oswaldo Cruz, e origem IOC/DFA 110-36.

Yersinia enterocolitica pertencente à coleção do Instituto Jorge Weissmann, e origem ATCC 9610.

Listeria monocytogenes pertencente à coleção do Instituto Oswaldo Cruz, e origem ATCC 15313.

3.3 - Preparo do inóculo

As cepas foram recebidas na forma liofilizada e devidamente identificadas, sendo então hidratadas com 2 ml de caldo “tripticase soy broth” (TSB) esterilizado, de acordo com as instruções constantes no rótulo da embalagem e dentro de todas as medidas de esterilidade. Posteriormente a cepa já diluída foi vertida em 8 ml do mesmo caldo, em tubo de ensaio, e incubada a 28^oC por 24 hs em estufa “Thermolyne digital modelo 42000 Incubator”. Após este período era realizada a coloração pelo método de Gram para a confirmação da pureza desta. Em todas as

ocasiões foi confirmada a uniformidade da cultura. Foram realizados cerca de 3 repiques com auxílio de alça de níquel cromo em caldo TSB com incubação de 24 hs a 28⁰C. No tubo mais recente com crescimento de 24 hs, era efetuada a diluição em solução salina peptonada 0,1% até a diluição 10⁻⁷, e posteriormente era feito o plaqueamento em ágar específico para o crescimento do patógeno, com seguida incubação por 24 hs a 28⁰C. Após este período era efetuada a contagem, em contador de colônias “Leica Darkfield” modelo 3327, para o cálculo do número de unidades formadoras de colônias por ml de meio em 24 hs. Este resultado permitia ter a noção da quantidade de ml da suspensão bacteriana a ser introduzida em 1000 ml de solução salina peptonada onde iam ser contaminadas as porções do lombo (*Longissimus dorsi*) do atum.

3.4 - Preparo da amostra

Em cabine previamente fechada, colocava-se placa de Petri contendo 20 ml de formaldeído durante uma hora anterior às operações, para promover a desinfecção do local de procedimento e manipulação das amostras. Além deste procedimento, colocava-se sobre a bancada papel alumínio marca “MasterPack Reyco” Embalagens LTDA e em seguida procedia-se a antissepsia com álcool 70% INPM, com o objetivo de promover a descontaminação da superfície. O preparo da amostra consistia na prévia higienização da pele do peixe com álcool 70% INPM, seguida de sua retirada, sendo então removidas as porções correspondentes aos lombos (*Longissimus dorsi*) do animal (Figuras 7 e 8) com o auxílio de duas facas esterilizadas, onde uma era utilizada na retirada dos lombos direito e esquerdo, e a outra na secção destes em porções de aproximadamente 50 g (Figura 9), que eram posteriormente contaminadas com 10⁵ UFC/ml do microrganismo em estudo naquele exemplar, por meio de imersão destas porções em 1000ml de solução salina peptonada 0,1% durante cerca de 20 segundos, sendo após isso envasadas nas atmosferas modificadas em aparelho “Tec Mac” seladora a vácuo modelo AP 450, e estocadas a 0⁰C ± 1⁰C. Foram utilizadas 5 atmosferas, a saber: 100% CO₂, 80%/20% CO₂/ N₂, 40%/ 60% CO₂/ N₂, ar e vácuo. Os gases utilizados neste estudo se encontravam contidos em cilindros “White Martins Praxair Inc”. Para cada atmosfera foram embaladas 12 bolsas plásticas contendo cerca de 50g de lombo cada.

3.5 - Preparação das diluições

A água destilada utilizada na preparação de meios de cultura e nas diluições era obtida de aparelho destilador Biomatic com capacidade de 4 litros por hora. As diluições eram obtidas a partir da colocação de 10 g das porções de carne de atum (*Thunnus albacares*) em 90 ml de solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada, preparando a diluição 10^{-1} que, posteriormente, era introduzida em “stomacher” Seward Medical modelo BA7020 por 1 minuto, em média velocidade para a homogeneização em bolsa Plastistéril marca Descartável Embalagens LTDA. Após essa etapa, era colocado 1ml da diluição em tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina em igual concentração (0,85%). Depois de agitado o tubo em agitador “Certomat MW” modelo 541-19000-271, era tomado novamente 1ml deste, e inoculada em outro contendo 9 ml da mesma solução e assim sucessivamente, até conseguir a diluição desejada (SILVA *et al*, 1997).

3.6 - Material de envase

Para embalagem das porções de lombo (*Longissimus dorsi*) de atum foram empregadas bolsas plásticas “Cryovac BBL4” com estrutura multicamada de baixa permeabilidade ao CO₂, O₂ e vapor d’água, na embalagem das porções de lombo de atum (Figura 10). Essas bolsas foram submetidas a testes de esterilidade com utilização de caldo nutriente, os quais consistiam na colocação de 25 ml do referido caldo esterilizado no interior de uma bolsa plástica, seguida da vedação desta por meio de solda em aparelho “Tec Mac” seladora a vácuo modelo AP 450 e posterior incubação a 35⁰C por 24 hs, em estufa “Thermolyne digital modelo 42000 Incubator”. Em nenhum caso se observou crescimento microbiano.

3.7 - Plaqueamento

De acordo com o número de microrganismos viáveis esperados, era tomada 1ml das diluições desejadas utilizando pipeta automática Genex Beta com graduação de 100µl a 1000µl, e depositada em placa de Petri descartável estéril. Em seguida era vertido 20ml do ágar desejado fundido em temperatura de aproximadamente 45⁰ C, para cobrir o fundo da placa, e depois realizada a

homogeneização por meio de movimentos suaves e circulares. Este procedimento era efetuado para a contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, bactérias lácticas, e também *Enterobacteriaceae*. Nos 2 últimos casos, após a solidificação da camada do ágar, era adicionada uma nova camada, com o objetivo de se criar uma atmosfera de microaerofilia, o que favorecia o crescimento dos microrganismos (SILVA *et al*, 1997). Estes meios aguardavam plaqueamento fundidos em Banho Maria digital “Polyscience” modelo 8201.

3.8 - Análises bacteriológicas

3.8.1 - Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos.

Foi utilizado o agar padrão para contagem (APC) marca Oxoid, com plaqueamento “pour plate” e incubação a 35⁰ C por 24 a 48hs. Este meio de cultura possui peptona de caseína, que fornece os aminoácidos e minerais necessários ao crescimento bacteriano. O extrato de levedura é a fonte de vitaminas do complexo B, e a dextrose provém à energia. Após incubação verificava-se o surgimento das unidades formadoras de colônias de coloração branco amareladas, em um meio de fundo transparente (PLATE COUNT ÁGAR, 2005).

3.8.2 - Contagem de *Enterobacteriaceae*.

Utilizou-se o agar “violet red bile glucose” (VRBG) marca Oxoid, com plaqueamento “pour plate” e incubação a 35⁰ C por 24 a 48hs. Neste meio de cultura o cristal violeta e os sais biliares como o desoxicolato de sódio e o tauracolato de sódio atuam como inibidores da microbiota Gram positiva. A degradação da glicose pelas *Enterobacteriaceae* é acompanhada pela produção de ácidos, os quais são indicados pelo surgimento de coloração vermelha e por zonas de precipitação de

sais biliares ao redor das colônias. A peptona de carne é responsável pelo suprimento de aminoácidos, compostos nitrogenados e minerais, e o extrato de levedura fornece vitaminas do complexo B (VIOLET RED VILE GLUCOSE - VRGB, 2005).

3.8.3 - Contagem de bactérias lácticas.

Para esta análise o agar polisorbato tiamina (APT) mostrou-se bastante eficiente, sendo efetuado o plaqueamento “pour plate” e incubação a 35⁰ C por 24 a 48hs. A peptona de caseína supre as necessidades de aminoácidos, minerais e compostos nitrogenados, e a dextrose e extrato de leveduras atuam como fontes de energia e vitaminas do complexo B respectivamente. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico, e os sais metálicos fornecem os íons essenciais para a replicação bacteriana. O polysorbato 80, o qual é uma mistura de ésteres oléicos, é a fonte de ácidos graxos requeridos por *Lactobacillus* spp (APT ÁGAR BASE, 2005).

3.8.4 - Contagem de *Yersinia enterocolitica*.

Foi indicado neste estudo o agar base seletivo para *Yersinia*, marca Oxoid, com plaqueamento “spread plate” e incubação a 28⁰ C por 24 a 48hs. Previamente ao plaqueamento era adicionado o suplemento seletivo *Yersinia*, composto por cefsulodina, igarsan e novobiocina com o objetivo de inibir o crescimento da microbiota competitiva. A fermentação do manitol na presença de vermelho neutro é o diferencial deste meio de cultura. Os organismos os quais fermentam manitol produzem uma queda de pH ao redor da colônia, seguido de absorção do vermelho neutro e modificação na coloração desta, que se torna vermelha no centro e com uma pequena zona translúcida ao redor. A peptona de carne é responsável pelo suprimento de aminoácidos, compostos nitrogenados e minerais, e o extrato de levedura fornece vitaminas do complexo B (YERSINIA SELECTIVE ÁGAR (CIN), 2005).

3.8.5 - Contagem de *Aeromonas hydrophila*.

Foi utilizado o Agar “glutamate starch phenol agar base” (GSP) seletivo para *Aeromonas* e *Pseudomonas*, marca Merck, com plaqueamento “spread plate” e incubação a 28⁰ C por 24 a 48hs. Era adicionado ao meio o suplemento contendo penicilina G sodica, com o objetivo de inibir o crescimento da microbiota competitiva. O glutamato e o amido são os únicos nutrientes do meio, e muitos microrganismos contaminantes não podem metabolizar esses componentes. O amido é degradado por *Aeromonas* spp com produção de ácido, modificando a coloração pela presença do indicador vermelho de fenol, passando a colônia a adquirir coloração amarela (GSP AGAR, 2005).

3.8.6 - Contagem de *Listeria monocytogenes*.

As análises foram realizadas com o agar base seletivo para *Listeria*, marca Oxoid, com plaqueamento “spread plate” e incubação a 28⁰ C por 24 a 48hs. Previamente ao plaqueamento era adicionado o suplemento seletivo *Listeria*, composto por ácido nalidíxico e acriflavina com o objetivo de inibir o crescimento da microbiota competitiva. *L. monocytogenes* hidrolisa esculina em esculina e forma complexos negros com íons ferro, produzindo colônias marrons esverdeadas com halo negro (LISTERIA SELECTIVE AGAR, 2005).

As placas foram incubadas invertidas nas temperaturas mencionadas acima, e sempre em duplicata.

Sempre antes de contaminar e envasar as porções de lombo nas bolsas e enchê-las com a atmosfera desejada, se colhiam amostras para se verificar a sua carga microbiana. Também se verificava se essas amostras estavam contaminadas naturalmente com o patógeno a ser inoculado. Em nenhum caso foi observada contaminação pelos referidos microrganismos.

3.9 – Análise dos resultados microbianos

Os resultados referentes às análises, uma vez organizados em uma base de dados, foram analisados mediante um programa de informática idealizado pelo Dr. József Baranyi, do Instituto de pesquisa de alimentos de Londres (Reading Laboratories, UK).

Este programa se baseia na equação de Gompertz, modificada por GIBSON et al (1987), para descrever o crescimento de uma dada população bacteriana.

A equação de Gompertz está definida por quatro parâmetros, a saber:

$Y(t) = a+c.\exp[-\exp(-b.(t-m))]$ ou, mais simplificada:

$$Y(t) = a+c.e^{[-e^{-b(t-m)}]}$$

Onde:

a = assíntota inferior

b = máxima velocidade relativa de crescimento

c = diferença entre as assíntotas superior e inferior

m = tempo no qual a velocidade de crescimento é máxima

Sendo as variáveis:

t = tempo em horas ou dias

y = \log_{10} das contagens

A partir destes dados se calcula:

- 1) Máxima velocidade específica de crescimento: $\mu_{max} = b.c.\ln(10)/e$
- 2) Fase de latência: $lag = m-1/b$
- 3) \log_{10} de número máximo de microrganismos: $ppd = a+c$
- 4) Tempo de duplicação: $td = \ln(2)/\mu_{max}$

4 - RESULTADOS

Como são muitos dados referentes às análises e para que não se torne confusa a leitura deste capítulo, o sistema escolhido para a apresentação dos resultados foi o estudo em separado de cada patógeno inoculado, e dos microrganismos que fazem parte de microbiota residente, como heterotróficos aeróbios mesófilos que se desenvolveram em ágar PCA, *Enterobacteriaceae* (ágar VRBG), e bactérias lácticas (ágar APT), verificados na amostra em questão, nas atmosferas utilizadas: ar, vácuo, 40%/60% CO₂/N₂, 80%/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂. Serão denominadas “inoculadas” as contagens decorrentes de amostras contaminadas em laboratório, com um dos patógenos em estudo, e “controle” as contagens em amostras não inoculadas.

4.1 Amostra controle

Foram utilizados foram os lombos (*longissimus dorsi*) de um único animal (*Thunnus albacares*), segmentados em porções, contaminados ou não (controle), postos em bolsas plásticas e incubados em refrigeração (0°C ± 1°C).

Os resultados encontrados nas análises controle (não inoculadas) podem ser verificados nos gráficos 4.1, 4.2, e 4.3 e tabelas 4.5, 4.6 e 4.7.

Neste módulo serão descritos os resultados encontrados nas análises de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, e bactérias lácticas.

4.1.1. Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos (agar PCA).

Na amostra controle as contagens do dia zero mostraram resultados compreendidos entre 3,0 log₁₀ufc/g (40%/60% CO₂/N₂ e 80%/20% CO₂/N₂) e 3,6 log₁₀ufc/g (ar e 100% CO₂) (Gráfico 4.1). Ao longo da estocagem, o comportamento de heterotróficos aeróbios mesófilos se mostrou semelhante nas atmosferas estudadas, porém a atmosfera vácuo, se mostrou a menos eficiente, com taxa máxima final de 10 log₁₀ufc, enquanto a atmosfera 80%/20% CO₂/N₂ foi a que apresentou menor taxa máxima final, de 6,94 log₁₀ufc (Gráfico 4.13). A fase lag mais curta foi evidenciada na atmosfera ar, com 0,8 dias de duração, enquanto a maior fase lag pertenceu à atmosfera 100% CO₂, com 11,9 dias de duração. Quanto ao tempo de duplicação, pôde-se observar o menor TD (0,4 dias) na atmosfera 100% CO₂, enquanto o maior TD foi de 1,1 na atmosfera 40%/60% CO₂/N₂ (Tabela 4.4)

4.1.2. Contagem de *Enterobacteriaceae* (agar VRBG).

Na amostra controle a contaminação inicial verificada no dia zero variou de 1,0 log₁₀ufc/g em 40%/60% CO₂/N₂ e 80%/20% CO₂/N₂ a 2,0 log₁₀ufc/g em vácuo e 100% CO₂. Durante a estocagem refrigerada (0°C ± 1°C) pôde-se observar claramente a dificuldade no desenvolvimento de enterobactérias, se comparada com os outros microrganismos contaminantes. A atmosfera ar foi a que permitiu maior taxa final de crescimento com valor de 5,7 log₁₀ufc no 20º dia de estocagem (Gráfico 4.2), enquanto que às atmosferas, vácuo e 40%/60% CO₂/N₂, com valores finais de 3,5 log₁₀ufc/g e 3,43 log₁₀ufc/g foram as mais eficientes na inibição deste grupo bacteriano.

A maior fase lag foi verificada na atmosfera 80%/20% CO₂/N₂ com 7,7 dias, enquanto que nas atmosferas ar, vácuo e 40%/60% CO₂/N₂ não foi observado fase lag (0,0 dias) (Tabela 4.4). Os tempos de duplicação variaram entre valores de 0,8 dias na atmosfera 40%/60% CO₂/N₂ e 2,0 dias em vácuo (Tabela 4.4).

4.1.3. Contagem de bactérias lácticas (agar APT).

Na amostra controle a contaminação no dia zero demonstrou ser também baixa, sendo as atmosferas ar e vácuo as que revelaram maior carga bacteriana, com 3,6 log₁₀ufc/g cada (Gráfico 4.3). A evolução dos valores das contagens mostrou-se semelhante durante a fase de estocagem a frio (0°C ± 1°C), sendo a atmosfera vácuo, a que apresentou a maior taxa máxima final, com 10 log₁₀ufc/g (Gráfico 4.3). A mais efetiva atmosfera no controle do desenvolvimento de bactérias lácticas foi a de 40%/60% CO₂/N₂, pois sua contagem atingiu 6,9 log₁₀ufc/g no 20º dia de estocagem (Gráfico 4.3).

A fase lag na amostra controle atingiu valores bastante distintos, variando entre 0,0 dias na atmosfera 40%/60% CO₂/N₂ e 9,9 dias em vácuo. Os tempos de duplicação foram curtos, com o máximo observado em ar (1,0 dias) (Tabela 4.4).

4.2 *Aeromonas hydrophila*

Todos os resultados obtidos nas análises de *A. hydrophila*, e da microbiota contaminante estão contidos nos gráficos 4.4, 4.5, 4.6, e 4.7. Nestes, pode-se observar a evolução da microbiota (*A. hydrophila*, heterotróficos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas) ao longo da estocagem refrigerada (0°C ± 1°C) nas atmosferas modificadas testadas (ar, vácuo, 40%/60% CO₂/N₂, 80%/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂).

4.2.1. Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos (agar PCA).

A contagem inicial de heterotróficos mesófilos na amostra inoculada com *A. hydrophila* situou-se entre 3,2 log₁₀ufc/g na atmosfera de 100% CO₂ e 3,9 log₁₀ufc/g na atmosfera ar (Gráfico 4.4). Como pode ser observado no gráfico 4.4, a evolução das contagens de heterotróficos mesófilos foi similar em todas as atmosferas. Nesta amostra a similaridade foi verificada até o 26º dia, com ligeiro predomínio posterior das atmosferas ar e 80%/20% CO₂/N₂, as quais verificaram taxa máxima de crescimento de 9,2 log₁₀ufc/g e 9,25 log₁₀ufc/g, respectivamente, no 38º dia de estocagem. As atmosferas mais eficientes foram as de 40%/60% CO₂/N₂ e vácuo cujos resultados finais foram de 7,4 log₁₀ufc/g e 7,9 log₁₀ufc/g no último dia de estocagem, respectivamente.

Os tempos de fases lag ficaram entre 9,0 dias na atmosfera vácuo e 13,5 dias em 100% CO₂, e nos TD foram observados entre valores de 1,2 dias em 80%/20% CO₂/N₂, e 1,9 dias em vácuo (Tabela 4.1). Vale ressaltar que a vida de prateleira, representada pelo tempo na qual as contagens atingem 7,0 log₁₀ufc, considerada como limite para que comecem a ser detectadas alterações sensoriais e que delimitam a vida útil de produtos cárneos (AYRES, 1960), foi menor em ar, com cerca de 26 dias (Gráfico 4.4).

4.2.2. Contagem de *Enterobacteriaceae* (agar VRBG).

A contagem inicial de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* foi bastante diminuta, alcançando na amostra inoculada, o máximo de 1,6 log₁₀ufc/g na atmosfera ar, todas as contagens efetuadas no dia zero. Na amostra inoculada as atmosferas ar e vácuo foram as que registraram as maiores evoluções nas contagens, alcançando taxas máximas finais de 6,6 log₁₀ufc/g e 6,26 log₁₀ufc/g no 38° dia de estocagem (Gráfico 4.5). As atmosferas mais eficientes foram justamente aquelas onde houve participação do gás CO₂, já que os menores valores foram observados em 40%/60% CO₂/N₂, (4,0 log₁₀ufc/g), 80%/20% CO₂/N₂, (4,93 log₁₀ufc/g) e 100% CO₂ (3,78 log₁₀ufc/g) no 38° dia de estocagem. As fases lag em geral foram longas, sendo a mais extensa observada na atmosfera 80%/20% CO₂/N₂, com 20,2 dias enquanto a mais curta foi registrada na atmosfera ar com 4,5 dias. Já os tempos de duplicação foram semelhantes em todas as atmosferas, com intervalos variando entre 1,4 dias em 80%/20% CO₂/N₂ e 2,8 dias em 100% CO₂ (Tabela 4.1).

4.2.3. Contagem de bactérias lácticas (agar APT).

A carga microbiana inicial na amostra inoculada foi relativamente baixa, com valores compreendidos entre 1,3 log₁₀ufc/g em 100% CO₂ e em vácuo 3,0 log₁₀ufc/g (Gráfico 4.3). A evolução das contagens foi semelhante para todas as atmosferas estudadas, sendo as maiores taxas finais encontradas em vácuo (8,6 log₁₀ufc/g) e 80%/20% CO₂/N₂ (9,2 log₁₀ufc/g) (Gráfico 4.6). Nas atmosferas ar e 40%/60% CO₂/N₂ foram verificadas as menores contagens ao final do período de

estocagem, com valores de 7,3 log₁₀ufc e 8,0 log₁₀ufc respectivamente (Gráfico 4.6).

Os períodos de fase lag em geral foram longos, sendo que em três atmosferas esta etapa se estendeu além de 10 dias, sendo 10,8 dias em ar, 11,4 dias em vácuo e 17,5 dias em 80%/20% CO₂/N₂ (Tabela 4.1). Esta mesma atmosfera, que apresentou fase lag bastante longa, evidenciou os menores tempos de duplicação (0,8 dias). As atmosferas ar, vácuo e 40%/60% CO₂/N₂ e apresentaram TD de 1,6 dias (Tabela 4.1).

4.2.4. Contagem de *Aeromonas hydrophila* (agar GSP).

No gráfico 4.7 e na tabela 4.1 se encontram os resultados alcançados nas contagens de *A. hydrophila* na amostra inoculada com este patógeno.

A carga inicial da amostra inoculada com *A. hydrophila* situou-se entre 5,0 log₁₀ufc/g na atmosfera 40%/60% CO₂/N₂ e 5,9 log₁₀ufc/g em ar. Ao longo do período de estocagem sob refrigeração, porém, esta bactéria apresentou um escasso desenvolvimento em todas as atmosferas estudadas, inclusive em ar. Esta diminuição nos valores finais foi mais evidente na atmosfera 100% CO₂, que registrou valor final de 1,0 log₁₀ufc/g, e registrando comportamento semelhante nas demais atmosferas, cujos valores finais foram de 2,2 log₁₀ufc em vácuo e 40%/60% CO₂/N₂ e 2,1 log₁₀ufc/g em 20%/80% CO₂/N₂.

Não houve a ocorrência de fase lag em nenhuma atmosfera estudada, e os valores dos tempos de duplicação foram negativos, isto é, houve inibição gradativa e/ou morte celular verificada ao longo da estocagem.

4.3 *Listeria monocytogenes*

Os resultados obtidos nas análises de *L. monocytogenes*, e da microbiota presente podem ser observados nos gráficos 4.8, 4.9, 4.10, e 4.11, e tabela 4.2. Nestes, pode-se observar a evolução da microbiota (*L. monocytogenes*, heterotróficos aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas) ao longo da estocagem nas atmosferas modificadas testadas.

4.3.1. Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos (agar PCA).

A carga de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos inicial verificada foi baixa, com contagens em torno de $3,6 \log_{10}\text{ufc/g}$. Ao longo da estocagem foi verificado o desenvolvimento maior deste grupo microbiano nas atmosferas ar e vácuo, sendo atingida a faixa de $7,0 \log_{10}\text{ufc/g}$ no 16º dia de manutenção a frio ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e taxa máxima final de $10 \log_{10}\text{ufc/g}$ no 37º dia de conservação. Este valor logarítmico, que determina o prazo de vida de prateleira só foi alcançado nas atmosferas contendo CO_2 no 23º dia (Gráfico 4.8). A atmosfera mais eficiente na inibição bacteriana foi a de 80%/20% CO_2/N_2 , a qual registrou taxa máxima final de $8,6 \log_{10}\text{ufc/g}$ no 37º dia de refrigeração (Gráfico 4.8).

Os períodos de fase de latência foram distintos, variando entre 0,6 e 0,7 dias em ar e vácuo respectivamente, até 10,8 dias em 40%/60% CO_2/N_2 . Já os tempos de duplicação foram bastante semelhantes, com intervalos estreitos, entre 1,0 dias em 40%/60% CO_2/N_2 , a 1,4 dias em vácuo e 100% CO_2 .

4.3.2. Contagem de *Enterobacteriaceae* (agar VRBG).

Nos resultados verificados no dia zero para este grupo bacteriano, verificou-se a existência de valores bastante reduzidos de contaminação, com o máximo de $2,0 \log_{10}\text{ufc/g}$ encontrado nas atmosferas 40%/60% CO_2/N_2 , e 80%/20% CO_2/N_2 . Durante a estocagem o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* foi mais pronunciado na atmosfera vácuo, atingindo valores finais de $6,3 \log_{10}\text{ufc/g}$ no 34º dia de conservação. A atmosfera mais efetiva no controle do crescimento de enterobactérias neste estudo foi a 80%/20% CO_2/N_2 , sendo observados valores de $3,5 \log_{10}\text{ufc/g}$ no final da estocagem (Gráfico 4.9).

A fase lag bacteriana mais longa foi verificada na atmosfera 100% CO_2 , com 20,4 dias de duração enquanto que nas atmosferas 40%/60% CO_2/N_2 , e 80%/20% CO_2/N_2 não foi observada a ocorrência deste período de adaptação bacteriana (Tabela 4.2).

A atmosfera 80%/20% CO_2/N_2 foi a que apresentou o maior tempo de duplicação, com 6,9 dias de intervalo, e a de 100% CO_2 , a qual tinha mostrado

uma longa fase lag, teve os menores resultados em relação ao TD, com apenas 1,0 dia de intervalo (Tabela 4.2).

4.3.3. Contagem de bactérias lácticas (agar APT).

No gráfico 4.10 observou-se que, em relação a bactérias lácticas, a contagem inicial verificada no dia zero foi também baixa, com os valores variando entre 2,6 log₁₀ufc/g em 40%/60% CO₂/N₂, e 3,6 log₁₀ufc/g em vácuo. Estes valores foram crescendo de maneira semelhante ao longo do período de estocagem até o 27º dia, com predomínio posterior da atmosfera ar cujos resultados atingiram a faixa de 7,7 log₁₀ufc/g no 34º dia de estudo. As atmosferas que se apresentaram mais eficientes na inibição de bactérias lácticas foram as de 40%/60% CO₂/N₂, e 100% CO₂, pois ao final da estocagem seus resultados alcançaram 5,3 log₁₀ufc/g e 4,0 log₁₀ufc/g respectivamente.

Uma vez mais os valores em relação aos períodos de fase lag variaram bastante, entre zero dias em 100% CO₂, e 8,1 dias em ar (Tabela 4.2). Os tempos de duplicação também foram distintos, alcançando 1,6 dias de intervalo em 20%/80% CO₂/N₂, e 6,4 dias em 100% CO₂. As outras atmosferas variaram entre 2,0 e 2,5 dias (Tabela 4.2).

4.3.4. *Listeria monocytogenes* (Agar seletivo base *Listeria*)

O inóculo inicial de *L. monocytogenes* foi de 5,7 log₁₀ufc/g a 6,0 log₁₀ufc/g no dia zero, sendo que, durante a estocagem das porções de lombo de atum nas respectivas bolsas plásticas contendo as distintas atmosferas, foi verificado um decréscimo nas contagens deste patógeno em todas as combinações testadas, inclusive em ar. A atmosfera que se mostrou mais efetiva na inibição de *L. monocytogenes* no presente estudo foi a de 40%/60% CO₂/N₂, já que nesta foi atingido o menor valor dentre todas, de 1,3 log₁₀ufc/g no 34º dia de estocagem, como pode ser observado no gráfico 4.11.

Nas atmosferas de ar, vácuo e 80%/20% CO₂/N₂, não foi constatada a presença de fase lag, sendo a duração desta de 2,6 dias em 100% CO₂ e 6,8 dias em 40%/60% CO₂/N₂ (Tabela 4.2).

Como, ao longo da permanência da cultura inoculada em carne de atum estocada sob refrigeração ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), houve diminuição nas contagens em todas as atmosferas, indicando acentuada inibição e/ou morte celular, os tempos de duplicação apresentaram resultados negativos, como pode ser verificado na tabela 4.2.

4.4 *Yersinia enterocolitica*

Os gráficos 4.12 a 4.15 e tabela 4.3 apresentam os resultados de observações de crescimento de *Y. enterocolitica* e da microbiota presente ao longo da estocagem nas atmosferas modificadas estudadas.

4.4.1. Contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos (agar PCA).

As contagens iniciais de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos nesta amostra inoculada foram as maiores observadas neste estudo, tendo atingido já no dia zero, valores compreendidos entre $5,0 \log_{10}\text{ufc/g}$ e $5,6 \log_{10}\text{ufc/g}$ nas atmosferas, vácuo, e ar respectivamente, com valores intermediários nas outras combinações gasosas (Gráfico 4.12). Em todas as atmosferas estudadas o crescimento deste grupo bacteriano se mostrou semelhante, apresentando valores bastante aproximados ao final da estocagem, com resultados entre $6,6 \log_{10}\text{ufc/g}$ a $7,8 \log_{10}\text{ufc/g}$ em 80%/20% CO_2/N_2 , e vácuo respectivamente. Esta atmosfera (80%/20% CO_2/N_2), juntamente com 40%/60% CO_2/N_2 , foram as que evidenciaram os melhores resultados na inibição bacteriana (Gráfico 4.12).

Os períodos de duração da fase lag bacteriana foram extremamente distintos. A atmosfera 100% CO_2 apresentou o menor resultado, com 1,2 dias enquanto que a atmosfera 40%/60% CO_2/N_2 foi a que revelou o maior tempo desta fase, com 17,7 dias (Tabela 4.3).

Os intervalos de tempos de duplicação, porém, demonstraram resultados mais próximos, variando entre 1,5 dias em 40%/60% CO_2/N_2 , à 3,8 dias em 80%/20% CO_2/N_2 (Tabela 4.3).

4.4.2. Contagem de *Enterobacteriaceae* (agar VRBG).

Os valores obtidos nas análises de crescimento inicial de enterobactérias foram semelhantes, com intervalos bastante estreitos, entre 3,4 \log_{10} ufc/g em ar e vácuo, até 3,7 \log_{10} ufc/g em 100% CO_2 (Gráfico 4.13). O crescimento destas bactérias durante a fase de estocagem a frio ($0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) não foi substancial, obtendo o acréscimo de somente 1 \log_{10} ufc/g na atmosfera ar (4,34 \log_{10} ufc/g) durante os 27 dias de permanência nesta temperatura (Gráfico 4.13). Nas atmosferas contendo CO_2 , inclusive houve diminuição nos valores encontrados. Estes foram muito aproximados ao final da estocagem, com resultados de 2,48 \log_{10} ufc (40%/60% CO_2/N_2), 2,6 \log_{10} ufc/g (80%/20% CO_2/N_2), 2,3 \log_{10} ufc/g (100% CO_2) (Gráfico 4.13).

A fases lag bacterianas apresentaram valores entre zero dias para 80%/20% CO_2/N_2 e 100% CO_2 e 11 dias em 40%/60% CO_2/N_2 (Tabela 4.3).

Como o comportamento de *Enterobacteriaceae* nas atmosferas estudadas foi diferente ao longo da estocagem, com ligeiro aumento nas contagens em algumas e diminuição em outras, os tempos de duplicação acompanharam estes perfis, e apresentaram valores diversos, entre 8,0 dias de intervalo em vácuo, até decréscimo a cada 6,1 dias em 80%/20% CO_2/N_2 (Tabela 4.3).

4.4.3. Contagem de bactérias lácticas (agar APT).

A contaminação verificada no dia zero situou-se na faixa compreendida entre 3,6 \log_{10} ufc/g na atmosfera vácuo, e 4,1 \log_{10} ufc/g em 100% CO_2 (Gráfico 4.11). Durante os 27 dias de estocagem refrigerada ($0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), pôde-se observar um comportamento semelhante de bactérias lácticas em todas as atmosferas, porém ao final do período de estocagem as que se mostraram mais efetivas na inibição deste grupo bacteriano foram 40%/60% CO_2/N_2 com taxa máxima final de 6,7 \log_{10} ufc/g, 80%/20% CO_2/N_2 com taxa máxima final de 6,33 \log_{10} ufc/g, e 100% CO_2 que apresentou valor de 6,0 \log_{10} ufc/g (Gráfico 4.14).

Com exceção da atmosfera ar, que apresentou fase lag de 5,0 dias de duração, não se detectou este período nas outras atmosferas estudadas (Tabela 4.3).

Os tempos de duplicação foram em geral curtos, com exceção da atmosfera 100% CO₂ que evidenciou 4,1 dias de intervalo de multiplicação bacteriana (Tabela 4.3).

4.4.4 *Yersinia enterocolitica*

No dia zero a inoculação de *Y. enterocolitica* resultou em contagens em torno de 5,0 log₁₀ufc/g. Porém, com o passar dos dias esses valores foram diminuindo em todas as atmosferas estudadas, inclusive ar. Ao final da estocagem verificou-se que as atmosferas 40%/60% CO₂/N₂ e 100% CO₂ foram as mais eficientes na inibição deste microrganismo patogênico, com resultados de 1,96 log₁₀ufc/g e 2,0 log₁₀ufc/g respectivamente no 27º dia de exposição a baixas temperaturas (0° C ± 1° C), a competição bacteriana e ao CO₂ (Gráfico 4.15).

A atmosfera vácuo foi a única a apresentar fase lag, mesmo sendo bastante reduzida (0,1 dia) (Tabela 4.3).

A grande inibição e/ou morte celular verificada neste estudo teve como consequência o surgimento de tempos de duplicação negativos, como mostra a Tabela 4.3.

5. DISCUSSÃO

Neste capítulo optou-se por não seguir a mesma seqüência explicativa anterior, pois constatou-se oportuno ir apresentando as considerações a respeito de cada microrganismo ou grupo bacteriano separadamente, comparando o comportamento destes, verificados nas atmosferas modificadas. Desta maneira, a seqüência de discussão dos resultados envolverá primeiramente microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, *Enterobacteraceae*, e bactérias lácticas, sendo finalmente discutidas as observações feitas sobre os patógenos inoculados (*Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, e *Yersinia enterocolitica*).

5.1 Microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos

5.1.1 Contaminações iniciais

A carga bacteriana inicial se mostrou baixa na amostra controle, e nas inoculadas com *A. hydrophila* e *L. monocytogenes*, com valores em torno de 3,0 \log_{10} ufc/g a 4,0 \log_{10} ufc/g (Gráficos 4.1, 4.4, 4.8 e 4.12). Já na amostra inoculada com *Y. enterocolitica* verificou-se contagens iniciais pouco mais elevadas, da ordem de 5,0 \log_{10} ufc/g a 5,6 \log_{10} ufc/g. Os exemplares apresentavam no momento da aquisição, condições ótimas de frescor quando submetidos à inspeção de caracteres sensoriais. Este fator pode explicar as baixas contagens no dia zero. A amostra com maior carga bacteriana, posteriormente inoculada com *Y. enterocolitica*, apesar de refletir boas condições sensoriais, e aprovada para aquisição durante a inspeção, apresentou este resultado possivelmente em

virtude do maior tempo em que permaneceu sem refrigeração quando de sua aquisição, sendo retirada do caminhão, manipulada e conduzida por funcionário até a pesagem sem qualquer tipo de proteção quanto à contaminação ambiental. Vale ressaltar que a temperatura média da cidade de Niterói na época em que foi adquirida era de 30°C (CLIMATEMPO, 2005). Resultados semelhantes foram observados por REDDY et al (1994), e LÓPEZ-GALVEZ et al (1995), que ao estudarem o efeito do CO₂ sobre a microbiota de filés de tilápia (*Oreochromis nilótica*), e atum (*Thunnus alalunga*), constataram cargas microbianas iniciais de heterotróficos aeróbios mesófilos de cerca de 3,0 log₁₀ufc, e 4,3 log₁₀ufc, respectivamente. REDDY et al (1995), em outro estudo envolvendo comportamento de microbiota de tilápia (*Oreochromis nilótica*) em atmosfera modificada verificaram desta vez uma carga microbiana inicial mais elevada, de 5,1 log₁₀ufc, enquanto SIVERTSVIK et al (2003) trabalhando com salmão (*Salmo salar*), obtiveram excelente nível de higiene, com contagem inicial de 1,5 log₁₀ufc. Pôde-se constatar que a qualidade inicial de amostras é fundamental para o sucesso de um experimento em microbiologia de pescado, e, tanto neste quanto em outros estudos, os melhores índices de qualidade foram sempre obtidos quando a amostra foi processada sob condições extremas de higiene laboratorial, sempre superior àquela existente na indústria e/ou comércio varejista.

5.1.2 Fases de latência (lag)

Este período indica o tempo em que tarda a microbiota a se multiplicar ativamente (fase log), e cuja duração está relacionada a uma série de fatores de adaptação desta as condições existentes no meio. Nesta fase parece não haver crescimento em relação ao número de células, embora estas sejam metabolicamente ativas, havendo sim o reparo a danos estruturais e síntese de enzimas (PELCZAR et al, 2004). Neste estudo as fases de latência foram calculadas por meio da equação de Baranyi.

Segundo MANO (2000), apesar de ter importância prática, já que quanto mais prolongada, teoricamente maior será o “shelf life” do alimento, infelizmente a fase de latência não é uma fase constante, nem mesmo em sistemas modelo, pois não só depende do gênero, e espécie bacteriana, mas também do seu “histórico”, cujo conhecimento é necessário para que se consiga padronizar a fase de latência

em um cultivo puro. Na prática laboratorial, porém, é praticamente impossível conhecer a procedência dos microrganismos, a qual temperatura se encontravam antes de alcançarem o alimento, à quanto tempo ocorreu esta contaminação, etc. Portanto, ainda que seja simples a sua determinação, o conhecimento deste dado é de importância relativa, já que não se tem conhecimento das condições prévias as quais se encontravam os microrganismos contaminantes do alimento.

Alguns fatores físicos têm relação estreita com a fase lag, como a temperatura, sendo que quanto menor o valor desta, maior será o período de fase de latência (PELCZAR, 2004). É esperado também que a fase lag de uma microbiota submetida a altas concentrações de CO₂ seja bem mais prolongada que outra envolvida apenas por ar atmosférico, à mesma temperatura. Porém estes fatores teóricos nem sempre se concretizam na prática microbiológica. Neste estudo as fases de latência de microrganismos heterotróficos mesófilos apresentaram resultados que confirmam esta afirmação. Na amostra inoculada com *Y. enterocolitica*, o período de fase lag mais curto (1,2 dias) foi evidenciado justamente na atmosfera mais seletiva (100%CO₂), enquanto que em ar a fase lag foi de 9,6 dias (Tabela 4.3). Vácuo apresentou também fase lag curta (1,5 dias) enquanto que as demais atmosferas contendo CO₂ voltaram a normalidade, com prolongados períodos de latência bacteriana (17,7 dias para 40%/60% CO₂/N₂ e 80%/20% CO₂/N₂ , respectivamente).

Ao longo do experimento pôde-se observar nas tabelas 4.1 a 4.4 que, nas demais amostras os maiores períodos de latência foram verificados nas atmosferas contendo CO₂, o que vêm a confirmar o caráter inibidor deste gás sobre a microbiota contaminante e também sobre patógenos inoculados no pescado. Estes resultados estão de acordo com os dados apresentados por REDDY et al (1994), os quais também constataram inibição bacteriana em filés de tilápia (*Oerochromis nilótica*) e conseqüentemente aumento de extensão de fase lag em atmosferas contendo níveis elevados de CO₂.

5.1.3 – Tempos de duplicação (TD)

Ao contrário da fase de latência, este parâmetro de crescimento de um microrganismo é constante, desde que as condições sejam idênticas, ou seja, mesma cepa, substrato, temperatura, atmosfera, etc (MANO, 2000).

Como a temperatura foi praticamente idêntica em todas as amostras ($0^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$), a diferenciação esperada era em relação à composição da atmosfera, sendo que, quanto mais seletiva fosse esta, a microbiota tenderia a ter sua multiplicação mais retardada. A este respeito convém assinalar que o efeito inibidor deste gás é mais pronunciado em baixas temperaturas em virtude de sua maior absorção, portanto era de se esperar que houvesse maior inibição em atmosferas contendo CO_2 em relação ao ar.

Este fato realmente ocorreu, sobretudo na amostra inoculada com *Y. enterocolitica*, onde os maiores valores de TD foram de 3,8 dias em 80%/20% CO_2/N_2 , e 3,0 dias de intervalo em 100% CO_2 (Tabela 4.3). Nas outras amostras os resultados foram semelhantes entre si, com alguma superioridade observada em atmosferas contendo CO_2 . Na amostra controle foram verificados os menores intervalos de tempos TD (Tabela 4.4). Possivelmente este resultado foi devido a menor carga bacteriana existente na amostra controle, já que nesta não foi inoculada nenhuma cultura, ou seja, havia menos competição e conseqüentemente mais facilidade de desenvolvimento. Dentro desta situação de pouca competição na amostra estudada, a inibição esteve relacionada com a temperatura e do teor de CO_2 na atmosfera, e pôde-se verificar o maior TD em 40%/60% CO_2/N_2 , com 1,1 dias de intervalo.

Outro fator que deve ser destacado (Tabelas 4.1 a 4.4) é o comportamento da microbiota inicial ao longo da estocagem, em atmosferas contendo ar, e as demais, sobretudo aquelas com teores diversos de CO_2 . Durante o período de estocagem observou-se que as atmosferas contendo as maiores porcentagens de CO_2 foram as que revelaram também os maiores intervalos de flutuação em relação aos TD. Em 80%/20% CO_2/N_2 estes valores oscilaram entre 1,0 e 3,8 dias (2,8 dias de flutuação), enquanto que em 100% CO_2 , variaram entre 0,4 e 3,0 dias (2,6 dias de flutuação). A atmosfera vácuo também obteve valor elevado de flutuação (2,4 dias). Este fato denota o impacto do CO_2 na multiplicação

bacteriana, ou no caso do vácuo, da ausência de O₂ no retardamento da multiplicação da microbiota aeróbia.

Na literatura, não são muitos os estudos envolvendo tempos de duplicação de microbiota heterotrófica aeróbia mesófila em pescados. MANU-TAWIAH et al (1993) ao estudarem comportamento deste grupo microbiano em carne suína estocada sob refrigeração (4⁰C), encontraram TD de 0,8 dias em ar, e 6 dias em atmosferas modificadas. Este resultado é algo semelhante ao encontrado neste estudo. Porém, como se trata de outro produto de origem animal, outra temperatura de estocagem, e certamente outras diferenças como método de obtenção, carga microbiana etc. deve-se ter cautela na comparação pura e simples destes dados.

5.1.4 – Vida útil do pescado

Os gráficos 4.1 a 4.15 e as tabelas 4.5 a 4.19 revelam, dentre outras informações, o “shelf life” das amostras, que estão diretamente relacionados à carga bacteriana desenvolvida nesta ao longo da estocagem. Este tempo de vida de prateleira é o período necessário para esta microbiota alcançar cerca de 7,0 log₁₀ufc/g, quando o produto já não oferece condições higiênico-sanitárias de ser consumido (AYRES, 1960; REDDY et al, 1994).

Vale ressaltar que em diversas atmosferas modificadas não foi possível aferir este parâmetro, pelo simples fato da microbiota não ter alcançado este valor, ao longo do período de conservação sob refrigeração.

A atmosfera ar foi a que revelou os mais intensos índices de crescimento bacteriano, que tiveram como consequência o alcance de 7,0 log₁₀ufc/g rapidamente, em praticamente todas as amostras estudadas. Os prazos de “shelf life” verificados foram de: 13 dias na amostra controle (Tabela 4.5), 26 dias na amostra contaminada com *A. hydrophila* (Tabela 4.8), 16 dias na amostra inoculada com *L. monocytogenes*, (Tabela 4.12) e 25 dias na amostra contendo cepa de *Y. enterocolitica* (Tabela 4.19). Por outro lado, as atmosferas mais eficazes na inibição bacteriana foram justamente aquelas em que houve a ação do CO₂, sendo os resultados apresentados a seguir: 17 dias na amostra controle na atmosfera 80%/20% CO₂/N₂ (Tabela 4.5), 35 dias na amostra inoculada com *A. hydrophila* na atmosfera 100%CO₂ (Tabela 4.8), 23 dias na amostra inoculada

com *L. monocytogenes* nas atmosferas 40%/60% CO₂/N₂, 80%/20% CO₂/N₂ e 100%CO₂ (Tabela 4.12), e 27 dias na amostra contendo cepa de *Y. enterocolitica* nas atmosferas 80%/20% CO₂/N₂ e 80%/20% CO₂/N₂ (Tabela 4.16). Estes resultados confirmam que a modificação da atmosfera prolongou a vida comercial da carne de pescado em função do efeito inibidor do CO₂, em ação conjunta com a utilização de baixas temperaturas, competição microbiana, e a diminuição ou ausência de O₂, como mencionado nos trabalhos de STAMMEN et al, (1990), REDDY et al (1995), e SIVERTISVIK et al, (2002). Estas mesmas combinações de fatores provavelmente foram as responsáveis pelas baixas contagens verificadas em algumas atmosferas, e o conseqüente não alcance da faixa de 7,0 log₁₀ufc/g.

Os resultados apresentados neste estudo estão em conformidade com alguns outros experimentos envolvendo “shelf life” de pescado em EAM, como os de REDDY e al (1995) que, ao observarem o “shelf life” de filés de tilápia (*Oreochromis nilotica*) estocada em ar e 75%/25% CO₂/N₂, a 4^oC, relataram tempos de 13 dias e 25 dias respectivamente. Outro estudo conduzido por HONG et al (1996), avaliou a eficiência de EAM em cavala (*Scomber scombrus*) estocada a -2^oC em 90% CO₂, e obteve um prazo de vida de prateleira, de até 21 dias.

5.2 – *Enterobacteriaceae*

5.2.1 – Considerações gerais

Nas contagens de *Enterobacteriaceae* foi empregado o Agar VRGB (Oxoid), largamente utilizado em todo mundo por microbiologistas para este fim, portanto nos resultados encontrados foi considerado como enterobactérias todas as colônias visíveis neste meio de cultura, ainda que não se possa garantir que todas as bactérias desenvolvidas neste meio o sejam.

5.2.2 – Contaminações iniciais

A carga bacteriana inicial de enterobactérias foi sempre inferior as demais, em todas as amostras (Gráficos 4.1, 4.2, 4.5, 4.9 e 4.13 e Tabelas 4.5, 4.6, 4.9, 4.13, e 4.17). Este fato era esperado, em virtude da própria característica das amostras, constituídas por peixes capturados em alto mar, onde a presença deste

grupo bacteriano é altamente escassa (OGAWA, 1999_C), aliado as boas condições higiênicas em que se encontravam as amostras no momento da aquisição.

5.2.3 – Comportamento sob EAM

No decorrer do experimento, pôde-se observar a forte inibição deste grupo frente às condições de estocagem sob refrigeração, competição bacteriana e as modificações na atmosfera.

As amostras enriquecidas com CO₂ inibiram o desenvolvimento das enterobactérias, o que pode ser constatado quando se observam as fases de latência encontradas, sendo que em todas as amostras, as maiores fases lag foram justamente as que continham este gás.

A atmosfera 80%/20% CO₂/N₂ apresentou as fases de latência maiores nas amostras controle, e também na amostra inoculada com *A. hydrophila* (7,7 dias e 20,2 dias, respectivamente), enquanto que na amostra contendo *Y. enterocolitica* verificou-se um período de 11,0 dias. Na amostra inoculada com *L. monocytogenes* a fase lag observada foi de 20,4 dias (Tabela 4.2). Estas modificações na atmosfera provavelmente colaboraram também para os menores valores verificados ao final da estocagem em todas as amostras. Na amostra controle a maior inibição encontrada foi na atmosfera 40%/60% CO₂/N₂, (3,43 log₁₀ufc/g) (Tabela 4.6 e Gráfico 4.2), enquanto na amostra inoculada com *A. hydrophila* observou-se contagem final novamente em 40%/60% CO₂/N₂ (4,0 log₁₀ufc/g), e de 3,78 em 100% CO₂ (Tabela 4.9 e Gráfico 4.5). A atmosfera 80%/20% CO₂/N₂ foi a mais eficiente no controle do desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*, com valor de 3,5 log₁₀ufc/g ao término do experimento, na amostra contendo cepa de *L. monocytogenes* (Tabela 4.13 e Gráfico 4.9).

Na amostra inoculada com *Y. enterocolitica*, os resultados demonstram claramente a eficiência da EAM no controle de enterobactérias, pois os menores valores foram encontrados nas atmosferas modificadas com CO₂, compreendendo contagens de 2,48 log₁₀ufc/g, 2,3 log₁₀ufc/g, e 2,6 log₁₀ufc/g nas atmosferas 40%/60% CO₂/N₂, 80%/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂ respectivamente (Tabela 4.17 e Gráfico 4.13).

Os dados existentes nas tabelas 4.20 a 4.24 e nos gráficos 4.16 a 4.20 mostram que na amostra inoculada com *Y. enterocolitica*, pelo fato desta ser uma enterobactéria, pôde-se observar comportamento semelhante entre as contagens verificadas em Agar VRGB e em Agar seletivo Yersinia (Oxoid), principalmente em atmosferas contendo CO₂.

Em todas as atmosferas estudadas, a carga de *Enterobacteriaceae* se encontrava em torno de 1% do total de *Y. enterocolitica* logo após a inoculação, sendo que, ao longo do período de estocagem as contagens de enterobactérias sofreram poucas modificações, com ligeiro aumento observado em ar e vácuo e diminuição nas demais atmosferas (Gráficos 4.16 a 4.20). Estes resultados são condizentes com as observações de CHURCH (1994), o qual afirmou haver forte inibição de *Enterobacteriaceae* quando submetida à ação do CO₂. LÓPEZ-GÁLVEZ et al (1995), porém verificaram comportamento bastante distinto deste grupo bacteriano em seu estudo, pois ocorreu grande desenvolvimento destes microrganismos em carne de atum (*Thunnus alalunga*), chegando a 7,0 log₁₀ufc/g já no nono dia de estocagem a 2⁰C. A explicação desta diferença nos dados encontrados não é muito fácil, e pode estar na própria diversidade das enterobactérias.

A família *Enterobacteriaceae* é extensa, compreendendo muitos gêneros, cepas, etc. Dentro desta ótica, pode-se supor a contaminação aleatória de diversos agentes bacterianos, com maior ou menor sensibilidade à competição bacteriana e ao CO₂. Nesta família bacteriana existem também algumas cepas de *Enterobacter* spp, *Hafnia* e *Serratia* com características psicrótróficas, podendo, portanto crescer em temperaturas em torno de 0⁰C ou até ligeiramente inferior (HOLT et al, 1984; KORNACKI; JOHNSON, 2001).

5.3 – Bactérias lácticas

5.3.1 – Considerações gerais

Grupo importante em microbiologia de alimentos, pela capacidade de fermentar carboidratos dando origem a ácidos orgânicos, as bactérias lácticas foram analisadas durante o período de estocagem de atum em atmosferas modificadas, com a utilização do agar APT, anteriormente descrito (Seção III.9).

5.3.2 – Contaminações iniciais

Nas amostras controle e inoculada com *L. monocytogenes* as contagens observadas no dia zero foram semelhantes entre bactérias lácticas e em agar PCA, situando-se em torno de $3,0 \log_{10} \text{ufc/g}$ (Tabelas 4.5 e 4.7 e Gráficos 4.1 e 4.3). Exceção feita apenas nas atmosferas 40%/60% CO_2/N_2 ($1,0 \log_{10} \text{ufc/g}$), e 80%/20% CO_2/N_2 ($2,3 \log_{10} \text{ufc/g}$) nas contagens de bactérias lácticas (Tabela 4.7 e Gráfico 4.3). Estas baixas contagens se devem as boas condições higiênicas das amostras no momento da aquisição. LÓPEZ-GÁLVEZ et al (1995) encontraram números semelhantes em carne de atum (*Thunnus alalunga*), mesmo tendo focado seu estudo apenas em *Lactobacillus* spp e utilizado agar Man Rogosa e Sharpe (MRS).

Na amostra inoculada com *A. hydrophila* as proporções de bactérias lácticas em relação às heterotróficas aeróbias mesófilas variaram entre 1% e 10% da carga inicial (Tabelas 4.8 e 4.10 e Gráficos 4.4 e 4.6), enquanto na amostra contendo *Y. enterocolitica* esta proporção foi de cerca de 10% (Tabelas 4.16 e 4.18 e Gráficos 4.12 e 4.14).

As características de ubiquidade de ambos os grupos bacterianos podem ter sido responsáveis pelas semelhanças verificadas nos resultados, pois as fontes de contaminação geralmente são as mesmas (SIVERTSVIK et al, 2002).

5.3.3 – Comportamento bacteriano

Os resultados contidos nos gráficos 4.3, 4.6, 4.10 e 4.14 revelam que, durante o período em que foi submetida à ação de atmosferas modificadas, o desenvolvimento da microbiota láctica não foi significativamente afetado pela ausência de O_2 em vácuo ou à própria ação do CO_2 . Os tempos de duplicação, assim como as fases de latência não indicam diferença entre as atmosferas mais seletivas em relação a ar e vácuo (Tabelas 4.1 a 4.4). As porcentagens iniciais descritas anteriormente sofreram provavelmente sensíveis modificações ao longo da estocagem refrigerada, pois as contagens finais de bactérias lácticas (APT) e de heterotróficas aeróbias mesófilas (PCA) foram semelhantes, o que indica uma evolução no crescimento das primeiras, passando a prevaler ao final do

experimento (Tabelas 4.1 a 4.4 e Gráficos 4.1, 4.3, 4.4, 4.6, 4.8, 4.10, 4.12 e 4.14). Este fato vem a corroborar com os trabalhos de SILLIKER; WOLFE (1980), STAMMEN et al (1990), FARBER (1991), STENSTRÖM, 1995, e SIVERTSVIK et al (2002), os quais afirmam haver realmente maior resistência de bactérias lácticas ao CO₂ e predomínio destas em pescados ao final da vida útil. Em estudo realizado com filé de peixe pedra (*Sebastes* spp), estocado em 80%/20% CO₂/Ar a 4° C, MOKHELE et al (1983) também verificaram o predomínio de *Lactobacillus* spp após 21 dias de estocagem.

Além da própria resistência à ação inibitória do CO₂, outro fator que pode explicar esta prevalência final é o pH da carne de atum, que situa-se entre 5,6 a 5,8 (OGAWA, 1999_b). Estes valores podem inibir outras bactérias importantes em deterioração do pescado, como *Shewanella putrefasciens* (SIVERTSVIK et al, 2002), e colaborar, para a microbiota láctica tornar-se dominante no alimento.

A atmosfera que evidenciou os menores resultados finais foi a 40%/60% CO₂/N₂ na amostra controle, e esteve sempre entre os menores valores nas amostras inoculadas.

5.3.4 – Vida útil do pescado

Os gráficos 4.3, 4.6, 4.10, e 4.14 e as tabelas 4.7, 4.11, 4.15, e 4.19 apresentam as contagens bacterianas, indicado que o “shelf life” das amostras está diretamente relacionado com estes valores observados ao longo da estocagem.

Na amostra controle a vida útil variou entre 15 dias nas atmosferas, vácuo e 80%/20% CO₂/N₂, e 17 dias em ar e 100% CO₂. Na atmosfera 40%/60% CO₂/N₂ não foi atingida a contagem limite de 7,0 log₁₀ufc/g. Nas amostras inoculadas com *A. Hydrophila* e *L. monocytogenes*, os resultados foram semelhantes em ar, com 35 e 34 dias, respectivamente, sendo que, para *A. hydrophila*, os menores “shelf life” foram justamente observados nas atmosferas mais seletivas (30 dias em 80%/20% CO₂/N₂ e 100% CO₂). Em *L. monocytogenes* não houve ultrapassagem deste limite (7,0 log₁₀ufc/g) nas demais atmosferas, enquanto em *Y. enterocolitica* somente vácuo registrou 7,0 log₁₀ufc/g aos 25 dias de permanência em refrigeração (0° C ± 1° C).

Estas diferenças, verificadas entre a amostra controle e as inoculadas provavelmente podem ser devido às variações na composição da microbiota entre estas, já que o grupo de bactérias lácticas é vasto (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; HALL et al, 2001). BARNETT et al (1982) e MOKHELE et al (1983) observaram “shelf life” de 21 dias, ao estudarem o comportamento de microbiota em peixe pedra (*Sebastes* spp) e salmão (*Salmo salar*), resultado semelhante ao observado nas amostras controle e inoculada com *Y. enterocolitica*, e ligeiramente inferior as demais amostras de atum.

5.4 – *Aeromonas hydrophila*

5.4.1 – Contaminação inicial

As contagens iniciais após inoculação situaram-se entre 5,0 log₁₀ufc/g e 5,9 log₁₀ufc/g no dia zero, após inoculação (Tabela 4.11 e Gráfico 4.7), sendo que esta microbiota era majoritária no alimento naquele momento, representando cerca de 99%. Este nível de carga bacteriana é bastante difícil de encontrar na prática comercial, pois, apesar da ubiquidade desta bactéria, não se observam grandes quantidades em pescado. Porém, a literatura registra grande frequência de isolamentos de *Aeromonas* spp em pescados, o que torna este alimento em particular uma significativa fonte deste patógeno, representando, portanto risco sanitário ao homem (YAUN; LIN, 1993; DOHERTY et al, 1996; TSAI; CHEN, 1996; PALUMBO et al, 2001; ISONHOOD; DRAKE, 2002).

5.4.2 – Comportamento durante a estocagem

Os resultados contidos na tabela 4.11 e no gráfico 4.7 demonstram o poder inibidor de atmosferas modificadas sobre *A. hydrophila* ao longo do período de estocagem refrigerada. Durante o experimento, os valores nas contagens de *A. hydrophila* foram diminuindo progressivamente em todas as atmosferas estudadas, inclusive em ar e vácuo, até atingirem contagens em torno de 2,0 log₁₀ufc/g ao final da estocagem. Não foi observada fase de latência em nenhuma combinação de atmosferas e os tempos de duplicação apresentaram valores negativos (Tabela 4.1). A atmosfera mais seletiva (100% CO₂) foi a que registrou a menor contagem final (1,0 log₁₀ufc/g), sendo os demais resultados compreendidos

entre $2,0 \log_{10}\text{ufc/g}$ e $2,2 \log_{10}\text{ufc/g}$. Porém, esta inibição provavelmente não se deu somente em função da ação do CO_2 , pois as atmosferas ar e vácuo também revelaram valores igualmente decrescentes durante o experimento. Outros fatores também podem ter influenciado negativamente no desenvolvimento de *A. hydrophila*, como a própria temperatura de estocagem ($0^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$). Apesar de se multiplicar em temperaturas normalmente utilizadas na refrigeração de alimentos (5°C), no presente estudo a temperatura de 0°C foi decisiva para a inibição de *A. hydrophila*, por estar bastante distante do valor ótimo para seu crescimento, que é de 28°C , o que vem a confirmar os dados de DAVIES; SLADE (1995), que também não obtiveram desenvolvimento de *A. hydrophila* em bacalhau (*Gadus mohua*) e truta arco íris (*Oncorhynchus mkiss*) em ar, $60\%/40\% \text{CO}_2/\text{N}_2$ e $40\%/30\%/30\% \text{CO}_2/\text{N}_2/\text{O}_2$, a 0°C . Porém, neste mesmo experimento foi observado desenvolvimento em truta quando *A. hydrophila* foi estocada em ar. Outro fator limitante pode ter sido a existência de microbiota altamente competitiva, como as bactérias heterotróficas mesófilas e as lácticas, cujo desenvolvimento foi bem mais pronunciado durante a estocagem. Em relação as bactérias lácticas, estas normalmente tornam-se dominantes em pescado refrigerado, e produzem determinados ácidos, bacteriocinas e também peróxido de hidrogênio que inibem o desenvolvimento de microbiota competitiva (BARAKAT; HARRIS, 1999; SIVERTSVIK et al, 2002). Estudando a atividade inibitória de bactérias lácticas sobre *A. hydrophila*, SANTOS et al (1996) propuseram que, além destes fatores, a depleção de nutrientes causada por este grupo bacteriano, em particular *Lactococcus lactis*, também possui influência na inibição destas bactérias patogênicas.

A ação do CO_2 foi um dos fatores que mais contribuíram para a inibição deste microrganismo ao longo da estocagem. Diversos autores (GOLDEN, 1989; INGHAM, 1990; VARNAN; EVANS, 1991) tem afirmado que este gás tem efeito inibidor no crescimento de *A. hydrophila*, sendo este muito mais pronunciado em baixas temperaturas, o que foi observado neste estudo, onde o desenvolvimento de *A. hydrophila* foi completamente inibido, sobretudo nas atmosferas mais seletivas ($80\%/20\% \text{CO}_2/\text{N}_2$ e $100\% \text{CO}_2$), como pode ser constatado na tabela 4.11 e gráfico 4.7. Estes mesmos autores, porém, afirmam que atmosferas enriquecidas com N_2 , ou com baixa tensão de O_2 como vácuo, propiciam maiores

condições de desenvolvimento de *A. hydrophila*, o que não foi verificado neste trabalho.

5.4.3 – Risco sanitário

De acordo com os resultados aqui apresentados, permite-se afirmar que o comportamento de *A. hydrophila* em carne de atum (*Thunnus albacares*) estocada a $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ nas atmosferas ar, vácuo, 40%/60% CO_2/N_2 , 80%/20% CO_2/N_2 e 100% CO_2 não ofereceu riscos à saúde humana, uma vez que, mesmo sendo inoculada em quantidades superiores as normalmente encontradas em pescados, e sendo a microbiota dominante no início da estocagem, esta cultura foi inibida, ao ponto de chegar ao final do estudo em quantidades bastante diminutas.

5.5 – *Listeria monocytogenes*

5.5.1 – Contaminação inicial

A carga bacteriana de *L. monocytogenes* inoculada no dia zero alcançou valores compreendidos entre 5,7 $\log_{10}\text{ufc/g}$ e 6,0 $\log_{10}\text{ufc/g}$, respresentado a microbiota dominante (99%) no pescado analisado.

Este patógeno possui caráter ubíquo (WALKINS; SLEATH, 1981; RYSER; DONNELLY, 2001) e conseqüentemente sua presença em alimentos é frequente, porém em níveis bastante inferiores a estas contagens (GARCIA DE FERNANDO et al, 1995). Este baixo nível de *L. monocytogenes* contaminante foi confirmado neste estudo, pois não houve detecção desta bactéria em carne de atum (*Thunnus albacares*) antes da inoculação da cultura ATCC 15313. A carga bacteriana empregada neste estudo não corresponde, portanto, à realidade da contaminação de pescados ao longo da cadeia produtiva. Desta maneira, a competição bacteriana sofrida pela cultura neste experimento deveria ser bem menor do que a verificada em condições normais, sendo que, nos parágrafos seguintes, quando houver afirmação de inibição de *L. monocytogenes* nestas condições forçadas, a mesma inibição deverá acontecer na prática comercial.

5.5.2 – Comportamento durante a estocagem

A *L. monocytogenes* foi inibida ao longo da estocagem refrigerada (Tabela 4.15 e Gráfico 4.11), como se pode constatar nos tempos de duplicação negativos (Tabela 4.2), demonstrando sensibilidade à ação do CO₂, e também as demais condições desfavoráveis, como temperatura, competição microbiana e pH. Este aspecto de inibição de *L. monocytogenes* em EAM é controverso, pois existem afirmações confirmando e discordando desta inibição. MARSCHALL (1988) afirmou que o CO₂ não possui grande poder inibitório, e que *L. monocytogenes* pode predominar em carnes refrigeradas, baseando-se no fato desta bactéria teoricamente poder se multiplicar mais do que outras contaminantes. GILL; REICHEL (1989) e HUDSON et al (1994), porém, afirmam haver grande inibição frente ao CO₂.

A atmosfera vácuo também é motivo de certa polêmica, em virtude de resultados confrontantes entre pesquisadores, como MANU-TAWIAH et al (1993), os quais observaram haver maior inibição de *L. monocytogenes* em vácuo do que em atmosferas contendo CO₂, enquanto HUDSON et al (1994) descreveram exatamente o contrário. Os resultados aqui apresentados concordam em parte com as afirmações destes últimos autores, uma vez que a maior inibição foi verificada em embalagem seletiva com este gás (40%/60% CO₂/N₂), porém a maior contagem observada foi também em embalagem seletiva contendo CO₂ (80%/20% CO₂/N₂).

O fato de ser anaeróbia facultativa talvez tenha feito com que não houvesse diferença entre as contagens obtidas em atmosferas isentas ou com pouco teor de O₂ em relação à observada em ar. Este aspecto contradiz autores como WIMPHHEIMER et al (1990), que condicionaram flagrante desenvolvimento deste patógeno inoculado em carne de frango ao conteúdo das embalagens em O₂. Estes autores também afirmaram que a microbiota contaminante deve ser bem mais significativa do que *L. monocytogenes* para haver inibição desta, pois do contrário poderá ser verificado crescimento semelhante ou até superior deste patógeno, também não foram observadas neste estudo, já que mesmo sendo algo em torno de 1% do dia zero, a carga bacteriana deteriorante evoluiu para cerca de 99,9% ao final da estocagem. Este fato também foi descrito por JEPPESEN; HUSS (1993), que confrontaram cepas de *Leuconostoc* spp e *Lactobacillus*

plantarum com *L. monocytogenes* em extrato de camarão previamente esterilizado, e constataram forte inibição deste patógeno frente a microbiota láctica.

Apesar de terem apresentado perfis de inibição semelhantes durante o estudo, algumas atmosferas mostraram-se mais eficientes do que outras na contenção do crescimento de *L. monocytogenes*, como a combinação 40%/60% CO₂/N₂, que registrou a menor contagem final (1,3 log₁₀ufc/g). As atmosferas ar, vácuo e 100% CO₂ apresentaram valores intermediários entre 2,0 log₁₀ufc/g e 2,2 log₁₀ufc/g, enquanto 80%/20% CO₂/N₂ apresentou a maior contagem (2,9 log₁₀ufc/g). Vale ressaltar que mesmo este valor ainda demonstra ter havido sensível inibição durante a estocagem, pois representa uma diminuição de 99% em relação à carga inicial.

O pH levemente ácido, em torno de 5,6 a 5,8 (OGAWA, 1999_b), encontrado em peixes de carne vermelha, como o atum, e temperaturas próximas a 0° C parecem ser extremamente importantes na diminuição do desenvolvimento de *L. monocytogenes*, já que a ação do CO₂ é intensificada nessas condições de frio (BARAKAT; HARRIS, 1999). Esta maximização do efeito do CO₂, exercida pelas baixas temperaturas são confirmadas em diversos trabalhos, como os de GILL; REICHEL (1989) os quais não obtiveram desenvolvimento de *L. monocytogenes* em carne de frango em embalagens contendo 100% CO₂ estocadas a 5° C, porém observaram multiplicação em carne bovina estocada a 10° C.

5.5.3 – Risco sanitário

Os dados registrados neste experimento, contidos na tabela IV.15 e gráfico IV.11 demonstram que o desenvolvimento de *L. monocytogenes* inoculada na amostra foi suprimido ao longo da estocagem em todas as atmosferas estudadas. Como mencionado anteriormente, esta inibição não foi causada somente pela ação do CO₂, visto que as atmosferas ar e vácuo também evidenciaram redução nas contagens da cultura inoculada, chegando a valores em torno de 2,0 log₁₀ufc/g, o que permite afirmar que amostra testada quanto ao desenvolvimento de *L. monocytogenes* não ofereceria riscos sanitários ao homem, o que demonstra a eficiência desta tecnologia na conservação de pescado.

5.6 – *Yersinia enterocolitica*

5.6.1 – Contaminação inicial

A inoculação efetuada no dia zero resultou em contagens entre de 5,0 \log_{10} ufc/g a 5,6 \log_{10} ufc/g, como se pode constatar na tabela 4.19 e gráfico 4.15. Como *Y. enterocolitica* pertence à família *Enterobacteriaceae*, fato curioso foi monitorar o comportamento deste patógeno, em comparação com as análises efetuadas em agar VRBG utilizado na contagem de enterobactérias. Ao dia zero os valores foram distintos nas contagens em agar seletivo Yersinia base e VRBG, e *Y. enterocolitica* representava 99% da microbiota do pescado (Gráficos 4.16 a 4.20). Isto pode ter acontecido devido à própria constituição do meio de cultura, sendo o agar seletivo Yersinia base (Oxoid), mais específico para este patógeno, inclusive com adição de antibióticos que inibem o crescimento da microbiota acompanhante, enquanto que em agar VRBG há a possibilidade de multiplicação de uma gama de gêneros da família *Enterobacteriaceae*, e até alguns outros mais, o que poderia impedir o desenvolvimento de *Y. enterocolitica* aos mesmos níveis de outros gêneros de enterobactérias. Desta forma, todos os resultados posteriores se basearão nas contagens de agar seletivo Yersinia base (Oxoid), pois no ágar VRBG não se diferenciou *Y. enterocolitica* das demais enterobactérias contaminantes.

5.6.2 – Comportamento durante a estocagem

Assim como os outros patógenos estudados neste experimento, ao longo do período de estocagem refrigerada ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), o desenvolvimento de *Y. enterocolitica* foi inibido também em todas as atmosferas testadas, com decréscimo de cerca de dois a três ciclos logarítmicos. Tomando-se os dados da tabela 4.19 e gráfico 4.15, nota-se que as atmosferas mais seletivas, ou seja, as que continham CO_2 foram as mais eficientes contra o crescimento de *Y. enterocolitica*, e registraram as menores contagens finais, sendo que em 40%/60% CO_2/N_2 e 100% CO_2 foram observados os menores valores. Estes resultados estão em conformidade com os achados de HUDSON et al (1994), KLEINLEIN; UNTERMANN (1990), e MANU-TAWIAH (1993), os quais também verificaram inibição de *Y. enterocolitica* em diversas concentrações de CO_2 em

carne bovina e suína. Estudando o efeito a EAM em duas espécies de peixes, bacalhau (*Gadus mohua*) e truta (*Oncorhynchus mykiss*), DAVIES; SLADE (1995) também constataram que as atmosferas seletivas (60%/40% CO₂/N₂ e 40%/30%/30% CO₂/N₂/O₂) inibiram e até mesmo reduziram o crescimento de *Y. enterocolitica* a 0° C e até em temperaturas superiores como 5° C, e 12° C. Nota-se que mesmo trabalhando com atmosferas diferentes e em temperaturas mais elevadas, os autores ainda conseguiram detectar inibição no desenvolvimento deste patógeno. Estes mesmos autores em seus resultados verificaram as maiores contagens na atmosfera ar, o que também concorda com os resultados apresentados no presente estudo (Tabela 4.19 e Gráfico 4.15). BARAKAT; HARRIS (1999), porém, não observaram inibição de *Y. enterocolitica* inoculada em carne de frango embalado em atmosfera contendo 44%/56% CO₂/N₂.

Durante o experimento, procurou-se acompanhar o comportamento paralelo de *Y. enterocolitica* e de *Enterobacteriaceae*. Esta proximidade fenotípica ficou evidente, se analisarmos os dados registrados nas tabelas 4.20 a 4.24 e nos gráficos 4.16 a 4.20, pois o desenvolvimento de *Y. enterocolitica* e de *Enterobacteriaceae* foi semelhante durante os 27 dias de duração deste módulo do experimento, sobretudo nas atmosferas com diferentes porcentagens de CO₂. Nas atmosferas ar, vácuo, 40%/60% CO₂/N₂, e 100% CO₂, as contagens de *Enterobacteriaceae* foram ligeiramente superiores as de *Y. enterocolitica*, o que sugere a ocorrência e adaptação às condições de estocagem, dos demais gêneros bacterianos pertencentes a esta família. Já na atmosfera 80%/20% CO₂/N₂ ocorreu o inverso. MANO et al (2000), fazendo o mesmo tipo de comparação e trabalhando com amostras de carne suína (*Sus domesticus*) e de peru (*Melleagris gallopavo*) também observaram semelhanças no comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae*.

Quando presente diante de microbiota competidora, a capacidade de *Y. enterocolitica* de se multiplicar diminui bastante, sobretudo de for composta por bactérias lácticas (JEPPENSEN; HUSS, 1993), outras da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida* (FUKUSHIMA; GOMYODA, 1986). Estes últimos autores atribuem a tal fato principalmente o acúmulo de metabólitos, quando a microbiota competitiva atinge a fase estacionária de crescimento. Esta inibição frente à competição bacteriana provavelmente ocorreu também no presente experimento, visto que o

desenvolvimento de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e bactérias lácticas foi sensivelmente superior ao de *Y. enterocolitica*.

5.6.3 – Risco sanitário

Dos resultados apresentados neste estudo, pode-se deduzir que, nas condições em que foi estocada, a carne de atum (*Thunnus albacares*) não ofereceria risco sanitário ao homem, pois o desenvolvimento de *Y. enterocolitica* foi extremamente prejudicado ao longo da estocagem, com diminuição de dois a três ciclos logarítmicos, e demonstrando fraco poder competidor frente às condições desfavoráveis. À mesma conclusão chegou MANO et al (2000) ao estudar o comportamento de *Y. enterocolitica* em carnes suína e de peru. MANU-TAWIAH et al (1993), porém, afirmaram que a atmosfera modificada reduz, mas não impede o crescimento de *Y. enterocolitica*, o que não elimina o risco sanitário desta tecnologia de conservação em relação ao crescimento deste patógeno.

6 – CONCLUSÕES

- 1) As contaminações iniciais e desenvolvimento de bactérias lácticas e heterotróficas aeróbias mesófilas foram semelhantes nas amostras testadas, não sendo drasticamente inibidas pela ação do CO₂ presente nas atmosferas mais seletivas.
- 2) O desempenho de *Enterobacteriaceae* foi discreto em todas as atmosferas estudadas, demonstrando inibição frente às condições do meio, como temperatura baixa (0° C) competição microbiana e ação do CO₂.
- 3) Todos os patógenos estudados apresentaram marcada inibição durante o experimento, com redução de dois a quatro ciclos logarítmicos ao longo da estocagem, não representando, portanto risco sanitário ao homem, nestas condições de estocagem.
- 4) Esta inibição provavelmente foi causada por uma combinação de fatores, como a própria ação do CO₂, a baixa temperatura (0° C), e a competição bacteriana intensa promovida, sobretudo por bactérias lácticas.
- 5) A atmosfera ar foi a que revelou os mais intensos índices de crescimento bacteriano (heterotróficos aeróbios mesófilos e bactérias lácticas), que tiveram como consequência o alcance de 7,0 log₁₀ufc/g rapidamente, em praticamente todas as atmosferas estudadas.
- 6) A atmosfera mais eficiente no controle da microbiota patogênica inoculada foi à combinação 40%/60%CO₂/O₂.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A ÁGUA NA TERRA. Disponível em: <http://www.cogerh.com.br>. Acesso em: 19 maio de 2004.

ASHIE, I.N.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v. 36, n. 1-2, p. 87-121, 1996.

AGUIAR, J. A. Piscicultores unidos para beneficiar peixe. Disponível em: <http://www.mercadodapesca.com.br/noticias>. Acesso em: 27 setembro de 2005.

APT ÁGAR BASE. Disponível em: <http://www.remel.com>. Acesso em 15 outubro 2005.

ALUISIO, C, C. G., et al. Yersiniosis associated with the tofu consumption: serological, biochemical and pathogenecity studies os *Yersinia enterocolitica* isolates. *Journal of Food protection*. v. 46, n. 3, p. 226-230, 1983.

AYRES, J. C. Temperature relationship and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef. *Food Research*. v. 25, p. 1-18, 1960.

BARAKAT, R. K., HARRIS, L. J. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified atmosphere packaged poultry in the presence and absence of naturally occurring microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n.1, p. 342-345, 1999.

BARNETT, H. J. et al. A study in the use of a high concentration of CO₂ in a modified atmosphere to preserve fresh salmon. *Marine Fisheries Reviews*. v. 44, n.3, p.7-11, 1982.

BERRY, E. D., et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin – producing *Pediococcus* during the manufacture of semidry sausage. *Journal of Food Protection*. v. 53, p. 194-197, 1988.

BORSH, E., NESBAKKEN, T., CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. v. 30, p. 9-25, 1974.

BOTTONE, E. J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection*, v. 1, p. 323-333, 1999.

BRASIL. Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993. Dispõe sobre aprovação e oficialização de métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – métodos microbiológicos. Brasília, DF, 165p, ago. 1993. Parte 4.

BRASIL. *Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal* – RIISPOA – aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 20 de março de 1952, que regulamentou a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, alterado pelo Decreto nº 2.244, de 04 de junho de 1997.

BREMER, P. J.; FLETCHER, G., C.; JERRETT, A., R.; HOFMAN, K., CHADDERTON, T.C. Enhancing the quality and shelf life of chilled seafood products. *FoodInfo Online Features* 11 December 2002. Disponível em : <http://www.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/11590> Acesso em: 20 janeiro 2005.

BRESSAN, M. C.; PEREZ, J. R. O. Pescado: um produto de fácil deterioração. In:_____. Tecnologia de carnes e pescado. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 240p. cap.8, p. 145-154.

BUCHANAN, R. L., PALUMBO, S. A. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas Sobria* as potential food poisoning species: a review. *Journal of Food Safety*. v. 7, p. 15-29, 1985.

BUCHANAN, R. L., STAHL, H. G., WHITING, R. C. Effects of interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. v. 52, p. 844-851, 1989.

CHAMPSAUR, h., ET AL. Cholera like illness due to *Aeromonas sobria*. *Journal of Infectious Disease*. V.145, n. 2, p. 248-254, 1982.

CHURCH, N.. Developments in modified atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science & Technology*. v. 5, n. 11, p. 345-352, 1994.

CIÊNCIA. Disponível em: <http://www.mercadodapesca.com.br/novidades>. Acesso em: 24 outubro 2005

CLIMATEMPO. Disponível em: www.climatempo.com.br. Acesso 28 novembro 2005.

COMPOSIÇÃO DO AR ATMOSFÉRICO. Disponível Em: http://www.smg.gov.mo/dm/learnmet/p_atmosp.htm. Acesso em 20 outubro 2005.

CONNER, D. E., BRACKETT, R. E., BEUCHAT, L. R. Effect of temperature, NaCl and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 52, p. 59-63, 1986.

COWELL, R. R. MACDONELL, M. T.; O'BRIEN, M.; DE LEY, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 43, n. 3, p. 473-477, 1986.

COYNE, F. P. The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. Part I. *Journal of the Society of Chemical Industry*. v. 52, p. 119-121, 1932.

COX, L. J., KLEISS, T., CORDIER, J. L. *Listeria* spp. In food processing, non food and domestic environments. *Food Microbiology*. v. 6, p. 49-61, 1989.

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 73, p. 103S-114S, 1996.

DALGAARD, P. Qualitative and quantitative characterization os spoilage bactéria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*. v. 26, p.319-333, 1995.

DALTON, C. B. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine*. v. 336, p. 100-104, 1997.

DANIELS, J., A., KRISHNAMURTHI, R., RIZVI, S., S. H. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food protection*. v. 48, n. 6, p. 532-537, 1985.

DAVIES, A. R., SLADE, A. Fate of *Aeromonas* and *Yersinia* on modified atmosphere package (MAP) cod and trout. *Letters in Applied Microbiology*. v. 21, p. 354-358, 1995.

DEVLIEGHERE, F., et al. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology*. v. 18, p. 53-66, 2001.

DIXON, N., M., KELL, D., B. The inhibition by CO₂ of the growth and the metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 67, p. 109-136, 1989.

DOHERTY, A., et al. Survival and growth of *Aeromonas hydrophila* on modified atmosphere packaged normal and high pH lamb. *International Journal of Food Microbiology*. v. 28, p. 379-392, 1996.

DOYLE, P. Michael., et al. Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 42, n. 4, p. 661-666, 1981.

ELEY, A., GEARY, I., WILCOX, M. H. Growth of *Aeromonas* spp at 4⁰C and related toxin production. *Letters in Applied Microbiology*. v. 16, p. 36-39, 1993.

ELIAS, A. *Notícias*. Disponível em : <<http://www.presidencia.gov.br/seap>>. Acesso em: 12 fevereiro 2004.

ESTEVE, C.; GUTIÉRREZ, M. C.; VENTOSA, A. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from european eels. *International Journal of Systematic bacteriology*. v. 45, n. 3, p. 462-466, 1995.

EUZEBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature-genus *Aeromonas*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/a/aeromonas.html>. Acesso em 08 julho 2005.

FAO. *Post mortem changes and fish quality assurance methods*. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w0495e/w0495E02.htm> Acesso em: 06 março 2005.

FARBER, J. M. *Listeria monocytogenes* in fish products. *Journal of Food Protection*. v. 54, n. 12, p. 922-924, 934, 1991.

FARBER, J. M. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology – a review. *Journal of Food Protecion*. v. 54, n.1, p. 58-70, 1991.

FRANCO, B. G. de M.; LANDGRAF, M.. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1820. cap. 3, 1996.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. Contaminación, conservación y alteración del pescado y otros alimentos marinos. In:_____. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia, 1993. 681p. cap.15, p.325-340.

FUKUSHIMA, H., et al. Role of the fly in the transport of *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 38, n. 5, p. 109-1010, 1979.

FUKUSHIMA, H., GOMYODA, Manabu. Inibition of *Yersinia enterocolitica* serotype O3 by natural microflora of pork. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 51, n. 5, p. 990-994, 1986.

FUKUSHIMA H., et al. Introduction into Japan of pathogenic *Yersinia* through imported pork, beef and fowl. *International Journal of Food Microbiology*. v. 35, p. 205-212, 1997.

HANNAH, M. O., et al. Effect of heating, freezing, and pH of *Yersinia enterocolitica* – like organisms from meat. *Journal of Food Protection*. v. 40, p. 689, 1979.

HARF-MONTEIL, C. e tal. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 54, n. 2, p.481-485, 2004.

HEINITZ, M., I., JOHNSON, J., M. The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *Journal of Food Protection*. v. 61, n. 3, p. 318-323, 1998.

HINTLIAN, C. B., HOTCHKISS, Joseph, H. The safety of modified atmosphere packaging: a review. *Food Technology*. v.7, p. 70-76, 1986.

HOLT, J., G., et al. Facultately anaerobic Gram negative rods. In: _____. *Bergey's Manual of Detemrinative Bacteriology*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1994_a.787 p. group 5, subgroup 1, p. 175-289.

HOLT, J., G., et al. Facultately anaerobic Gram negative rods. In: _____. *Bergey's Manual of Detemrinative Bacteriology*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1994_b.787 p. group 5, subgroup 2, p. 175-289.

HOLT, J., G., et al. Regular, nonsporing Gram positive rods. In: _____. *Bergey's Manual of Detemrinative Bacteriology*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1994_c.787 p. group 19, p. 565-570.

HONG, L. C. et al. Quality of atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) fillets during modified atmosphere storage. *Journal of Food Science*. v. 61, n. 3, p. 646-651, 1996.

HUDSON, J. A., MOTT, S. J., PENNEY, N.. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere packaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection*. v. 57, p. 204-208, 1994.

HUSS, H.H. Garantia de qualidade dos produtos da pesca. Roma, FAO. 1997_a. 176p, n° 334, p.87-90.

HUSS_b, H.H. Garantia de qualidade dos produtos da pesca. Roma, FAO. 1997. 176p, n° 334, p.34-36.

HUYS, G.; et al. *Aeromonas popofii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 47, n. 3, p.1165-1171, 1997.

INGHAM, S., C. Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* on cooked crayfish tails during cold storage under air, vacuum, and a modified atmosphere. *Journal of Food Protection*. v. 53, n. 8, p. 665-667, 1990.

ISONHOOD, J., H.; DRAKE, M.. *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*. v. 65, n. 3, p. 575-582, 2002.

JANDA, J. M. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiological Reviews*, v. 4, n. 4, p.397-410, 1991.

JEPPESEN, V. H., HUSS, H. H. Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*. v. 19, n. 3, p. 179-186, 1993.

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. M. Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News*. v. 66, p. 218-233, 2000.

JUNTILLA, J. R., NIEMEDA, S.I., HIRN, J. Maximum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 65, p. 321-327, 1988.

KANEKO, K., et al. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in house rats. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 36, n. 2, p. 314-318, 1978.

KATO, Y., et al. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in wild-living birds and Japanese serows. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 49, n. 1, p. 198-200, 1985.

KIETZMANN, U.; PRIEBE, K.; RAKOW, D.; REICHSTEIN, K.. Inspección de peces, crustaceos y moluscos. In:_____. *Inspección veterinaria de pescados*. Zaragoza, España: Acribia, 1974. 326 p. cap. 5, p. 147-240.

KILLEFER, D. H. Carbon dioxide preservation of meat and fish. *Industrial and Engineering Chemistry*. v. 22, p. 140143, 1930.

KLEINLEIN, N., UNTERMANN, F. Growth of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in minced meat with and without protective gas with consideration of the competitive background flora. *International Journal of Food Microbiology*. v. 10, n.1, p. 65-71, 1990.

KOLBE, H. Antiseptische eigenschaften der kohlen-saure. *Journal Für Praktische Chemie*. v. 26, p. 249-255, 1882.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, Frances Pouch; ITO Keith. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. 4. ed. Washington, D.C.: 2001, 676 p. cap 08, p. 69– 82.

LANNELONGUE, M., et al. Microbial and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂ enriched atmospheres. *Journal of Food Protection*. v. 45, p. 1197-1199, 1982.

LANNELONGUE, M., FINNE, G. Effect of carbon dioxide on growth of selected microorganisms isolated from black drum (*Pogonias cromis*). *Journal of Food Protection*. v. 49, p. 806-809, 1986.

LECLERC, H., SCHWARTZBROD, L., DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiology*. v. 28, n. 4, p.371-409, 2002.

LINNAN, M. J. et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican style cheese. *New England Journal of Medicine*. v. 319, p. 823-827, 1988.

LIOUTAS, T. S. Challenges of controlled and modified atmosphere packaging: a food company's perspective. *Food Technology*. v. 42, n.9, p. (FALTA COMPLETAR), 1988.

LISTERIA SELECTIVE AGAR. Dsiponível em:
http://www.emdchemicals.com/analutics/micro_manual/tedisdata/prods/1_0700_4

LÓPEZ-GÁLVEZ, D., de la HOZ, LORENZO., ORDÓÑEZ, J., A. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbial and chemical changes in refrigerated tuna (*Thunnus alalunga*) steaks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 43, p. 483-490, 1995.

LOVETT, J., TWEDT, R. M. *Listeria*. *Food Technology*. v. 42, n. 4, p. 188-191, 1988.

MANO, S. B., ORDOÑEZ, GARCIA DE FERNANDO, G. D. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food Microbiology*. v. 17, p. 657-669, 2000.

MANU-TAWIAH, W., et al. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *Journal of Food Science*. v. 58, n. 3, p. 475-479, 1993.

MARSHALL, D. L., SCHMIDT, R. H. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10⁰C in milk preincubated with selected pseudomonads. *Journal of Food Protection*. v. 51, p. 777-782, 1988.

MARTINEZ-MURCIA, A. J.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic bacteriology*. v. 42, n. 3, p. 412-421, 1992_b.

McMAHON, M. A. S. The expression of proteinases and haemolysins by *Aeromonas hydrophila* under modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. v. 89, p. 415-422, 2000.

McLURE, P. J., ROBERTS, T. A., OTTO OGURU, P. Comparison effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradients plates in liquid medium. *Letters in Applied Microbiology*. v. 9, p. 95-99, 1989.

MOKHELE, K. et al. Microbiological analysis of rock cod (*Sebastes spp*) stored under elevated carbon dioxide atmospheres. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 45, p. 878-881, 1983.

MORTON, D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO K.. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. 4. ed. Washington, D.C.: 2001, 676 p. cap 07, p. 63– 67.

MOTTA, N.; GUERREIRO, G. *Produção mundial de pescados*. Disponível em: <http://www.radiobras.com.br>. Acesso em: 15 março 2004.

MATIAS, J. *Notícias*. Disponível em: <http://www.fundacentro.sc.gov.br>. Acesso em: 26 fevereiro 2004.

MEDEIROS, S. D.. *Higiene e tecnologia de pescado. Deterioração*. p. 1-12, 2002.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas spp*. *International Journal of Food Microbiology*. v. 28, p. 157-168, 1995.

NÉCTON: GRANDES PEIXES PELÁGICOS. *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha*. Disponível em: <http://www.bdt.org.br/workshop/costa/pelagicos/diagnostico> . Acesso em: 31 janeiro 2005.

OETTERER, M.. *Tecnologias emergentes para processamento do pescado. Curso de graduação*. Piracicaba-SP, 2004. 21p.

OGAWA, M.. O pescado como alimento. In: OGAWA, Masayoshi, Lima Maia, Everardo. *Manual da pesca*. São Paulo: Varela, 1999. 430 p. cap. 1, p. 3-5.

_____. Características específicas do pescado. In: OGAWA, Masayoshi, Lima Maia, Everardo. *Manual da pesca*. São Paulo: Varela, 1999_b. 430 p. cap. 2, p. 9-15.

_____. Microrganismos do pescado. In: OGAWA, Masayoshi, Lima Maia, Everardo. *Manual da pesca*. São Paulo: Varela, 1999_c. 430 p. cap. 9, p. 141-156.

OGAWA, M.; LIMA MAIA, E. Química do pescado. In: _____. *Manual da pesca*. São Paulo: Varela, 1999. 430 p. cap. 4, p. 29-71.

OGAWA, M.; OGAWA, Norma B. Perdigão. Alterações do pescado *post mortem*. In:_____. *Manual da pesca*. São Paulo: Varela, 1999. 430 p. cap. 8, p. 113-137.

O'REILLY, T. Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Applied and environmental Microbiology*. v. 45, n. 3, p. 1132-1135, 1983.

PALUMBO, S, et al. *Aeromonas*, *Arcobacter*, and *Plesiomonas*. In: DOWNES, Frances Pouch; ITO Keith. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. 4. ed. Washington, D.C.: 2001, 676 p. cap 30, p.283– 290.

PARKIN, K. L., WELLS, M. J., BROWN, W. D. Modified atmosphere storage of rockfish fillets. *Journal of Food Science*. v. 47, p. 181-184, 1981.

PELCZAR, M., J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel, R. Cultivo e crescimento de microrganismos. In:_____. *Microbiologia, conceitos e aplicações* vol. 1. São Paulo: Markon books, 2004. 524p. cap. 6, p.166-187.

PHILLIPS, C., A. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 31, p. 463-479, 1996.

PIDIYAR, V. et al. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of culex quinquefasciatus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.52, n. 5, p.1723-1728, 2002.

PLATE COUNT ÁGAR. Standart methods agar (TGY). Disponível em: <http://www.remel.com>. Acesso em 15 outubro 2005.

PRATA, L. F., FUKUDA, Rubens, Toshio. Fundamentos de inspeção de carnes. Jaboticabal-SP: Funep, 2001, 326p. cap. 15, p. 157-176.

REDDY, N. R., et al. Shelf life of fresh tilapia fillets packaged in high barrier film with modified atmospheres. *Journal of Food Science*. v. 59, n.2, p. 260-264, 1994.

REDDY, N. R., VILLANUEVA, M., KAUTTER, D. A. Shelf life of modified atmosphere packaged fresh tilapia fillets stored under refrigeration and temperature abuse conditions. *Journal of Food Protection*. v. 58, n. 8, p. 908-914, 1995.

RIGOR MORTIS. *Pescados*. Disponível em: http://www.setor1.com.br/pescados/rigor_mortis.htm Acesso em: 06 março 2005.

ROSVIK, L. M., YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *International Journal of Food Microbiology*. v. 13, p. 97-104, 1991.

ROSVIK, L. M., YNESTAD, M., SKJERVE, E. Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum packed, smoked salmon, during storage at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*. v. 14, p.111-118, 1991.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, Frances Pouch; ITO Keith. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. 4. ed. Washington, D.C.: 2001____ p. cap 36, p. 343 – 356.

SABATER, E. I. L.; JEREZ, J. J. R.; HERRERO, M. H.; ROIG-SAGUÉS, A., X.; MORA-VENTURA, Maria T. Sensorial quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Food Protection*. v. 59, n.2, p.167-174, 1995.

SANTOS, J. A., GONZÁLEZ, C. J., GARCÍA-LÓPEZ, M. L. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n. 12, p. 5612-5614, 1999.

SCHIEMANN, D. A., OLSON, S. A. Antagonism by Gram negative bacteria to growth of *Yersinia enterocolitica* in mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 48, n. 3, p. 539-544, 1984.

SECRETARIA EXECUTIVA. Departamento de pesca e aquicultura. *Histórico da pesca de atuns e afins no Brasil*. Disponível em: http://www.mercadodapesca.com.br/cadeias_atuns.php?pag=historia . Acesso em: 31 janeiro 2005.

SHEWAN, J. M. The microbiology of fish and fishery products – a progress report. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 34, p. 299-315, 1971.

SILLIKER, J. H., WOLFE, S. K. Microbiological safety considerations in controlled atmosphere storage of meats. *Food Technology*, v.5, p. 59-63, 1980.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V., SILVEIRA, N. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997. 295p. cap. 3, p. 21-29.

SIVERTSVIK, M., JEKSRUD, W., K., ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fisheries products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 37, p. 1-7-127, 2002.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; KLEIBERG, G. H. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensorial quality of atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*. v. 68, n. 4, p. 1467-1472, 2003.

SORHEIM, O., NISSEN, H. Current technology for modified atmosphere packaging of meat. Disponível em: <http://www.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/3800>. Acesso em: 20 janeiro 2005.

SPENCER GARRET, E., JAHNCKE, M., L., TENNYSON, J., M. Microbiological hazards and emerging food safety issues associated with seafoods. *Journal of Food Protection*. v. 60, n. 11, p. 1409-1415, 1997.

SPERBER, W.H. Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. *Food Technology*. v. 36, p. 89-94, 1982.

STAHAM, J. A. Modified atmosphere storage of fisheries products: the state of art. *Food Technology in Australia*. v. 36, p. 233-239, 1984.

STAMMEN, K.; GERDES, D.; CAPORASO, F. Modified atmosphere packaging of seafood. *Critical Reviews in Food and Science Nutrition*. v. 29, n. 5, p. 301-331, 1990.

STANSBY, M. E., GRIFFITHS, F. P. Carbon dioxide in handling fresh fish – haddock. *Industrial and Engineering Chemistry*. v. 27, p. 1452-1458, 1935.

STAUB NETO, J.. *Estatística de pesca de atuns e afins (2003)*. Disponível em: <http://www.presidencia.gov.br/seap>. Acesso em: 09 fevereiro 2005.

STENSTRÖN, I. J. Microbial flora of cod fillets (*Gadus mohua*) stored in 2⁰C in different mixtures of carbon dioxide and nitrogen/oxygen. *Journal of Food Protection*. v. 48, p. 585-589, 1995.

STERN, N. J., PIERSON, M. D. *Yersinia enterocolitica*: a review of the psychrotrophic water and foodborne pathogen. *Journal of Food Science*. v. 44, p. 1736-1742, 1979.

SUGITA, H., et al. Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 61, n.11, p. 4128-4130, 1995.

TSAI, G. J.; CHEN, T. H.. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *International Journal of Food Microbiology*. v. 31, p. 121-131, 1996.

UMA ANÁLISE DOS DADOS RECENTES SOBRE A SITUAÇÃO MUNDIAL DOS ESTOQUES PESQUEIROS. Disponível em: www.usinfo.state.gov/journals/ites/0103/jep/trends.htm. Acesso em 08 janeiro 2006.

VALLEY, G. The effect of carbon dioxide on bacteria. *Quarterly Review of Biology*. v. 3, p. 209-224, 1928.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. *Aeromonas*. In: _____. *Foodborn Pathogens*. London: Wolfe Publishing, 1991. 557p. cap.9, p. 185-200.

VELD, H. I.; JOS, H. D. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*. v. 33, p. 1-18, 1996.

VERANTH, M. F., ROBE, K. CO₂ enriched atmosphere keeps fish fresh more than twice as long. *Food Processing*. v. 40, n. 4, p. 76-79, 1979.

VIOLET RED BILE GLUCOSE – VRBG. Disponível em: <http://www.remel.com>. Acesso em 15 outubro 2005.

WALKINS, J., SLEATH, K. P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge, and river water. *Journal of Applied Bacteriology*. v. 50, p. 1-9, 1981.

WARD, J., R. Microbial of aquaculture products. *Food Technology*. v.6, p. 82-86, 1989.

WARD, D., R.; BAJ, N., J. Factors affecting microbiological quality of seafoods. *Food Technolgy*. v.7, p 87-90, 1989.

WEAGANT, S., D., FENG, P.. Yersinia. In: DOWNES, Frances Pouch; ITO Keith. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association. 4. ed. Washington, D.C.: 2001, 676 p. cap 41, p.421– 428.

WEEKS, J.. How safe are seafoods?. *International Food Information Service*. Disponível em: http://www.ifis.org/forum/june_2001/raspberries.htm Acesso em: 07 outubro 2003.

WILKINS, A. E., MARCH, E. H. Psychrotrophic properties of *Listeria monocytogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 18, p. 543-549, 1972.

WIMPFHEIMER, J., ALTMAN, N. S., HOTCHKISS, J. H. Growth of *Listeria monocytogenes* and competitive spoilage organisms in raw chicken packaged under modified atmospheres and in air. *International Journal of Food Microbiology*. v. 11, p. 205-214, 1990.

WOLFE, S. K. Use of CO and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish, and produce. *Food Technology*. v.4, p. 55-58, 1980.

YAUN, S.S; LIN, L. P. Isolation and characterization of *Aeromonas* from seafoods in Taipei. *Zhongua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. v. 26, n.2, p. 78-85, 1993.

YERSINIA SELECTIVE ÁGAR (CIN). Disponível em: <http://www.remel.com>. Acesso em 15 outubro 2005.

Tabela 4.1. Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) (dias) e taxa máxima (Tx Máxima) de *A. hydrophila* e da microbiota contaminante.

	Atmosfera	Fase lag (dias)	TD (Dias)	<i>Tx Maxima</i>
<i>Aeromonas</i>	Ar	0,0	-0,8	2,2
	Vácuo	0,0	-2,2	2,4
	40/60CO ₂ /N ₂	0,0	-4,4	2,2
	80/20CO ₂ /N ₂	0,0	-2,4	2,5
	100% CO ₂	0,0	-3,5	1,0
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ar	4,5	1,6	6,7
	Vácuo	11,7	1,5	6,3
	40/60CO ₂ /N ₂	11,0	2,0	4,0
	80/20CO ₂ /N ₂	20,2	1,4	4,9
	100% CO ₂	13,5	2,8	3,8
Bactérias lácticas	Ar	10,8	1,6	7,3
	Vácuo	11,4	1,6	8,2
	40/60CO ₂ /N ₂	7,1	1,6	8,0
	80/20CO ₂ /N ₂	17,5	0,8	9,2
	100% CO ₂	7,9	1,1	8,4
Mesófilos	Ar	9,6	1,5	9,2
	Vácuo	9,0	1,9	7,5
	40/60CO ₂ /N ₂	9,7	1,7	7,4
	80/20CO ₂ /N ₂	13,0	1,2	9,3
	100% CO ₂	13,5	1,4	7,0

Tx = Taxa Máxima

TD = Tempo de Duplicação

Tabela 4.2. Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) (dias) e taxa máxima (Tx Máxima) de *L.monocytogenes* e da microbiota contaminante.

	Atmosfera	Fase lag (dias)	TD (Dias)	<i>Tx Maxima</i>
<i>Listeria</i>	Ar	0,0	-2,4	2,0
	Vácuo	0,0	-2,4	2,2
	40/60CO ₂ /N ₂	6,8	-1,2	1,3
	80/20CO ₂ /N ₂	0,0	-3,2	2,9
	100% CO ₂	2,6	-1,2	2,1
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ar	1,2	1,2	4,2
	Vácuo	0,3	1,4	6,3
	40/60CO ₂ /N ₂	0,0	3,1	4,2
	80/20CO ₂ /N ₂	0,0	6,9	3,5
	100% CO ₂	20,4	1,0	4,7
Bactérias láticas	Ar	8,1	2,0	7,7
	Vácuo	7,1	2,5	6,1
	40/60CO ₂ /N ₂	5,9	2,0	5,1
	80/20CO ₂ /N ₂	7,8	1,6	6,0
	100% CO ₂	0,0	6,4	4,1
Mesófilos	Ar	0,6	1,3	9,9
	Vácuo	0,7	1,4	10,3
	40/60CO ₂ /N ₂	10,8	1,0	9,1
	80/20CO ₂ /N ₂	10,2	1,1	8,6
	100% CO ₂	8,3	1,4	9,4

Tx = Taxa Máxima

TD = Tempo de Duplicação

Tabela 4.3. Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) (dias) e taxa máxima (Tx Máxima) de *Y. enterocolitica* e da microbiota contaminante.

	Atmosfera	Fase lag (dias)	TD (Dias)	<i>Tx Maxima</i>
<i>Yersinia</i>	Ar	0,0	-2,4	3,6
	Vácuo	0,1	-0,9	3,2
	40/60CO ₂ /N ₂	0,0	-2,4	2,4
	80/20CO ₂ /N ₂	0,0	-0,9	3,0
	100% CO ₂	0,0	-1,9	2,3
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ar	9,7	5,2	4,4
	Vácuo	6,1	8,0	4,1
	40/60CO ₂ /N ₂	11,0	-6,2	2,5
	80/20CO ₂ /N ₂	0,0	-6,1	2,6
	100% CO ₂	0,0	-6,3	2,3
Bactérias lácticas	Ar	5,0	1,8	7,1
	Vácuo	0,0	1,6	7,0
	40/60CO ₂ /N ₂	0,0	1,7	6,8
	80/20CO ₂ /N ₂	0,0	1,8	6,3
	100% CO ₂	0,	4,1	6,0
Mesófilos	Ar	9,6	2,4	7,5
	Vácuo	1,5	2,9	7,8
	40/60CO ₂ /N ₂	17,7	1,5	6,9
	80/20CO ₂ /N ₂	10,1	3,8	6,6
	100% CO ₂	1,2	3,0	7,6

Tx = Taxa Máxima

TD = Tempo de Duplicação

Tabela 4.4. Apresentação de fatores de crescimento como fase lag (dias), tempos de duplicação (TD) (dias) e taxa máxima (Tx Máxima) de *Enterobacteriaceae*, bactérias lácticas, e heterotróficos aeróbios mesófilos que fazem parte da microbiota contaminante do pescado.

	Atmosfera	Fase lag (dias)	TD (Dias)	<i>Tx Maxima</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ar	0,0	1,2	5,7
	Vácuo	0,0	2,0	3,4
	40/60CO ₂ /N ₂	0,0	0,8	3,3
	80/20CO ₂ /N ₂	7,7	0,9	5,2
	100% CO ₂	1,2	1,9	4,2
Bactérias lácticas	Ar	5,7	1,0	8,2
	Vácuo	9,9	0,4	10,0
	40/60CO ₂ /N ₂	0,0	0,8	6,7
	80/20CO ₂ /N ₂	4,7	0,7	9,4
	100% CO ₂	9,0	0,6	9,2
Mesófilos	Ar	0,8	1,0	8,6
	Vácuo	8,3	0,5	10,4
	40/60CO ₂ /N ₂	2,1	1,1	7,7
	80/20CO ₂ /N ₂	5,4	1,0	7,0
	100% CO ₂	11,9	0,4	9,2

Tx = Taxa Máxima

TD = Tempo de Duplicação

Tabela 4.5. Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra controle (0°C ± 1°C), em log₁₀ufc/g.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO₂/N₂	80/20CO₂/N₂	100%CO₂
0	3,6	3,4	3,0	3,0	3,6
1	3,8	3,7	3,1	3,3	4,1
3	4,4	4,0	3,4	3,3	4,2
5	4,7	4,2	3,8	3,5	4,2
7	5,1	4,8	4,4	3,7	4,6
10	6,2	5,4	5,2	4,7	4,6
13	7,1	6,1	5,8	5,4	5,5
15	7,7	7,4	6,3	6,1	6,3
17	8,4	9,5	7,5	6,6	8,5
20	8,6	10,0	7,6	6,9	9,2

Tabela 4.6. Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* efetuadas na amostra controle ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	1,3	2,0	1,0	1,0	2,0
1	1,7	2,5	1,6	1,1	2,0
3	2,5	2,8	2,3	1,3	2,2
5	3,1	3,0	2,9	1,6	2,6
7	3,5	3,1	3,0	1,8	2,9
10	4,1	3,2	3,2	2,3	3,4
13	4,7	3,3	3,2	2,8	3,7
15	5,1	3,4	3,3	3,2	3,9
17	5,5	3,4	3,4	4,8	4,1
20	5,7	3,5	3,4	5,2	4,2

Tabela 4.7. Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra controle ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	3,6	3,6	1,0	2,3	3,0
1	3,8	3,7	1,7	2,8	3,1
3	3,9	3,9	2,6	3,3	3,3
5	4,2	4,1	3,7	3,6	3,6
7	4,6	4,5	4,1	4,1	4,1
10	5,1	5,0	5,0	5,1	4,6
13	6,0	6,1	6,0	6,1	5,3
15	6,3	7,6	6,3	7,0	6,0
17	7,6	9,5	6,6	8,4	8,4
20	8,2	10,0	6,9	9,4	9,2

Tabela 4.8. Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra inoculada com cepa de *A. hydrophila*, ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	3,9	3,6	3,3	3,3	3,2
2	3,9	3,7	3,5	3,3	3,1
4	4,0	3,9	3,5	3,4	3,3
7	4,3	4,1	3,6	3,7	3,3
13	5,0	4,4	4,0	4,1	3,4
15	5,2	4,8	4,6	4,5	3,8
24	6,5	5,9	5,8	5,7	5,4
26	7,1	6,4	6,3	6,7	6,0
30	8,2	7,0	7,0	8,1	6,6
35	9,0	7,4	7,3	9,1	7,0
38	9,2	7,4	7,3	9,2	6,95

Tabela 4.9. Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* na amostra inoculada com cepa de *A. hydrophila* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	1,6	1,0	1,0	1,0	1,0
2	1,8	1,1	1,0	1,2	1,0
4	2,0	1,3	1,2	1,4	1,1
7	2,4	1,4	1,2	1,4	1,2
13	3,3	2,0	1,3	1,7	1,5
15	3,6	2,2	1,8	1,8	1,7
24	5,3	3,4	3,0	2,4	2,4
26	5,6	4,1	3,3	2,6	2,9
30	6,2	5,2	3,6	3,3	3,4
35	6,6	6,1	4,0	4,7	3,7
38	6,6	6,2	4,0	4,9	3,7

Tabela 4.10. Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra inoculada com cepa de *A. hydrophila* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	2,0	3,0	2,0	1,8	1,3
2	2,0	3,0	2,2	1,8	1,3
4	2,2	3,2	2,2	2,0	1,6
7	2,6	3,4	2,6	2,2	1,9
13	3,3	3,8	3,3	2,5	2,9
15	3,4	4,1	3,6	2,8	3,4
24	4,3	5,4	5,7	4,5	5,2
26	4,7	5,8	5,8	5,3	6,3
30	5,6	6,6	6,0	7,2	7,3
35	7,0	7,8	7,7	8,8	8,0
38	7,3	8,1	8,0	9,2	8,2

Tabela 4.11. Resultados das análises da amostra inoculada com cepa de *A. hydrophila* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	5,9	5,4	5,0	5,6	5,1
2	5,1	4,7	4,3	3,6	3,9
4	4,4	4,0	4,0	3,6	3,5
7	3,2	3,8	3,9	3,4	3,3
13	2,6	3,3	3,6	3,1	2,8
15	2,4	3,1	3,3	2,8	2,6
24	2,4	2,8	3,1	2,8	2,2
26	2,2	2,6	2,8	2,6	2,0
30	2,1	2,3	2,4	2,6	1,8
35	2,0	2,2	2,2	2,3	1,2
38	2,0	2,2	2,2	2,1	1,0

Tabela 4.12. Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	3,6	3,8	3,8	3,6	3,6
2	3,8	4,1	3,8	3,7	3,9
7	5,0	5,1	4,2	3,7	4,5
12	6,4	6,2	4,7	4,3	5,0
14	6,9	6,6	5,0	4,7	5,3
16	7,3	7,0	5,5	5,3	5,6
20	8,1	7,8	6,7	6,1	6,1
23	8,6	8,4	7,8	7,1	6,9
27	9,2	9,2	8,6	7,9	7,9
30	9,7	9,7	9,1	8,4	8,8
34	9,8	10,0	9,1	8,5	9,3
37	9,8	-	9,0	8,6	9,4

Tabela 4.13. Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* efetuadas na amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	1,0	1,0	2,0	2,0	1,0
2	1,0	1,2	2,3	2,3	1,1
7	2,7	2,5	2,7	2,6	1,1
12	3,6	3,5	3,2	2,8	1,0
14	3,8	3,9	3,4	2,8	1,0
16	3,9	4,3	3,6	2,9	1,0
20	4,0	5,0	3,9	3,0	1,4
23	4,1	5,5	4,1	3,1	2,0
27	4,2	6,0	4,2	3,3	2,8
30	4,3	6,2	4,2	3,4	4,2
34	4,3	6,3	4,3	3,5	4,6
37	4,3	-	-	3,5	4,7

Tabela 4.14. Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	3,3	3,6	2,6	3,0	3,0
2	3,3	3,8	2,4	3,1	3,3
7	3,7	4,0	2,6	3,0	3,4
12	4,3	4,4	3,0	3,6	3,5
14	4,5	4,5	4,1	4,0	3,8
16	4,7	4,7	4,3	5,0	3,8
20	5,0	5,5	4,5	5,3	4,0
23	5,3	5,6	4,7	5,5	4,1
27	6,1	5,9	5,0	5,8	4,0
30	6,6	6,0	5,1	6,0	4,0
34	7,4	6,1	5,2	6,1	4,1
37	7,7	-	5,3	6,1	4,2

Tabela 4.15. Resultados das análises efetuadas na amostra inoculada com cepa de *L. monocytogenes* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	5,8	5,7	5,7	5,8	6,0
2	5,1	5,2	5,4	5,0	5,6
7	4,9	5,0	5,1	4,6	4,5
12	4,0	4,4	4,3	4,0	4,0
14	4,0	4,0	4,1	4,0	3,0
16	3,3	3,0	2,7	3,9	2,3
20	3,1	3,1	2,1	3,8	2,1
23	3,0	3,0	2,0	3,3	2,0
27	2,2	2,5	1,4	3,1	2,0
30	2,3	2,6	1,2	3,0	2,2
34	2,0	2,3	1,3	3,0	2,2
37	2,0	2,0		2,8	2,2

Tabela 4.16. Resultados das análises de heterotróficos aeróbios mesófilos efetuadas na amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	5,6	5,0	5,4	5,4	5,0
4	5,4	5,3	5,3	5,3	5,3
6	5,5	5,5	5,4	5,3	5,3
11	5,6	5,8	5,6	5,4	5,8
13	5,8	5,9	5,5	5,6	6,0
15	6,2	6,3	5,6	5,6	6,3
20	6,6	6,6	5,9	6,0	6,6
22	6,8	6,8	6,0	6,3	6,8
25	7,4	7,5	6,8	6,4	7,4
27	7,5	7,8	6,9	6,6	7,5

Tabela 4.17. Resultados das análises de *Enterobacteriaceae* efetuadas na amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	3,4	3,4	3,6	3,6	3,7
4	3,4	3,3	3,4	3,4	3,3
6	3,5	3,3	3,4	3,3	3,4
11	3,6	3,5	3,4	3,0	3,3
13	3,6	3,6	3,3	3,0	3,3
15	3,7	3,6	3,3	2,9	3,1
20	3,9	3,8	3,2	2,7	2,7
22	4,0	3,9	3,0	2,6	2,6
25	4,4	4,0	3,0	2,6	2,6
27	4,3	4,1	2,5	2,6	2,3

Tabela 4.18. Resultados das análises de bactérias lácticas efetuadas na amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	4,0	3,6	3,7	3,7	4,1
4	4,2	4,4	4,4	4,4	4,3
6	4,4	4,6	4,6	4,8	4,7
11	4,9	5,5	5,4	5,5	4,9
13	5,2	6,0	5,9	5,8	5,0
15	5,6	6,3	6,3	5,9	5,1
20	6,4	6,8	6,6	6,2	5,5
22	6,6	6,9	6,8	6,3	5,6
25	7,1	7,0	6,8	6,3	6,0
27	7,0	7,1	6,7	6,3	6,0

Tabela 4.19. Resultados das análises efetuadas na amostra inoculada com cepa de *Y. enterocolitica* ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	Ar	Vácuo	40/60CO ₂ /N ₂	80/20CO ₂ /N ₂	100%CO ₂
0	5,5	5,3	5,0	5,0	5,6
4	4,8	4,3	3,7	3,7	4,0
6	4,3	3,6	3,5	3,5	3,9
11	4,0	3,5	3,1	3,3	3,5
13	3,9	3,4	3,0	3,1	3,3
15	3,9	3,3	3,0	3,0	2,8
20	3,7	3,2	2,8	3,0	2,6
22	3,6	3,1	2,6	3,0	2,3
25	3,5	3,0	2,3	2,9	2,1
27	3,4	3,0	1,9	2,9	2,0

Tabela 4. 20. Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera **ar** ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	<i>Yersinia</i>	<i>Enterobactérias</i>
0	5,5	3,4
4	4,8	3,4
6	4,3	3,5
11	4,0	3,6
13	3,9	3,6
15	3,9	3,7
20	3,7	3,9
22	3,6	4,0
25	3,5	4,4
27	3,4	4,3

Tabela 4. 21. Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera **vácuo** ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	<i>Yersinia</i>	<i>Enterobactérias</i>
0	5,3	3,4
4	4,3	3,3
6	3,6	3,3
11	3,5	3,5
13	3,4	3,6
15	3,3	3,6
20	3,2	3,8
22	3,1	3,9
25	3,0	4,0
27	3,0	4,0

Tabela 4. 22. Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera **40/60CO₂/N₂** ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	<i>Yersinia</i>	<i>Enterobactérias</i>
0	5,0	3,6
4	3,7	3,4
6	3,5	3,4
11	3,1	3,4
13	3,0	3,3
15	3,0	3,3
20	2,8	3,2
22	2,6	3,0
25	2,3	3,0
27	2,0	2,5

Tabela 4. 23. Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera **80/20CO₂/N₂** ($0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em $\log_{10}\text{ufc/g}$.

Dias	<i>Yersinia</i>	<i>Enterobactérias</i>
0	5,0	3,6
4	3,7	3,4
6	3,5	3,3
11	3,3	3,0
13	3,1	3,0
15	3,0	2,9
20	3,0	2,7
22	3,0	2,6
25	2,9	2,6
27	2,9	2,6

Tabela 4. 24. Comparativo entre crescimento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* na atmosfera **100%CO₂** (0°C ± 1°C), em log₁₀ufc/g.

Dias	<i>Yersinia</i>	<i>Enterobactérias</i>
0	5,6	3,7
4	4,0	3,3
6	3,9	3,4
11	3,5	3,3
13	3,3	3,3
15	2,8	3,1
20	2,6	2,7
22	2,3	2,6
25	2,1	2,6
27	2,0	2,3

Gráfico 4.1. Desenvolvimento de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum – amostra controle

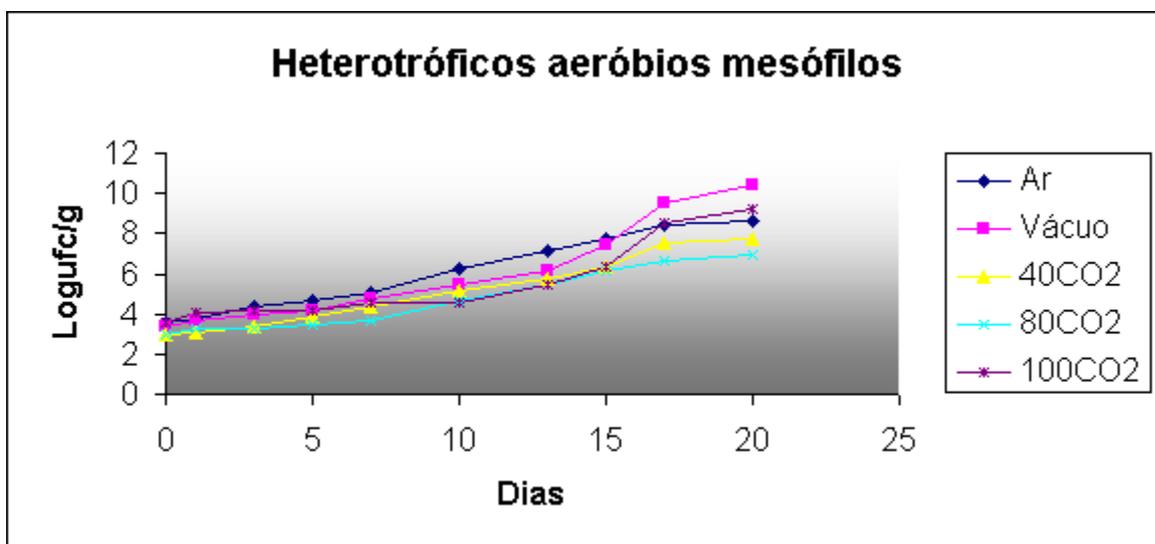


Gráfico 4.2. Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum – amostra controle

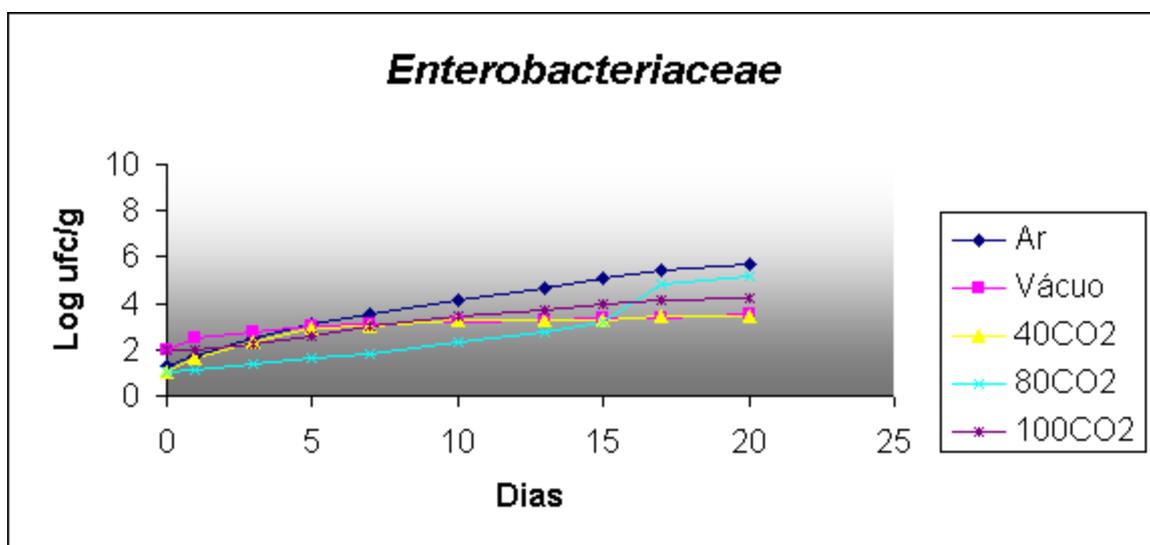


Gráfico 4.3. Desenvolvimento de bactérias lácticas em carne de atum – amostra controle

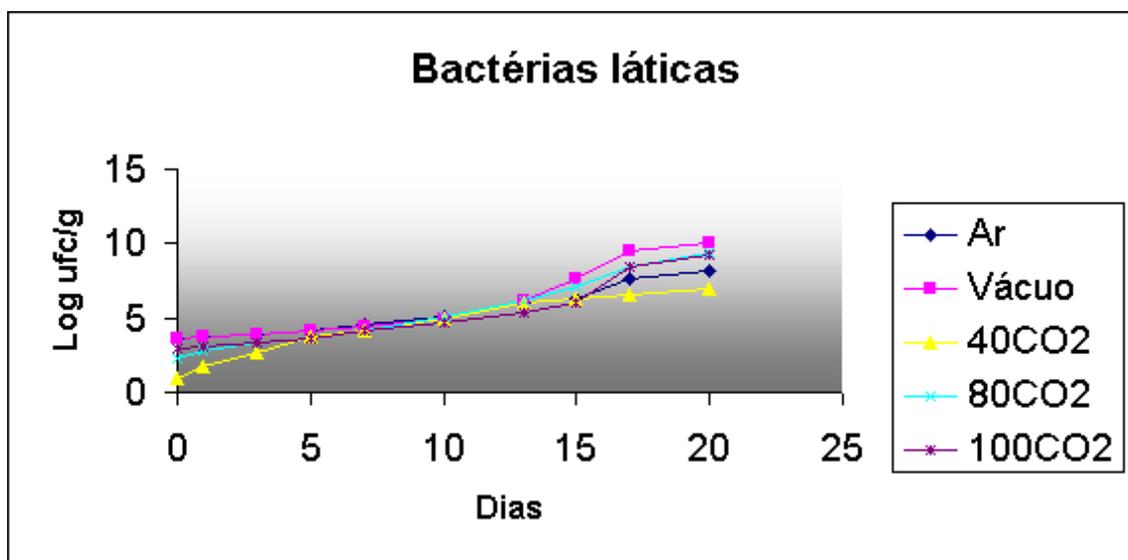


Gráfico 4.4 Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum - amostra inoculada com *A. hydrophila*.

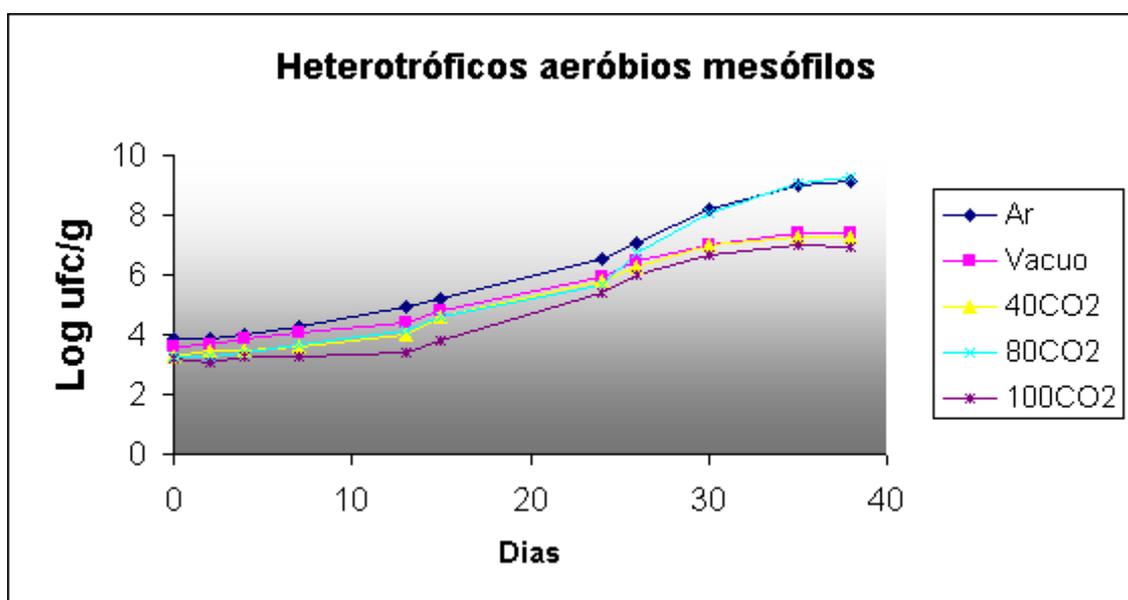


Gráfico 4.5. Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum - amostra inoculada com *A. hydrophila*

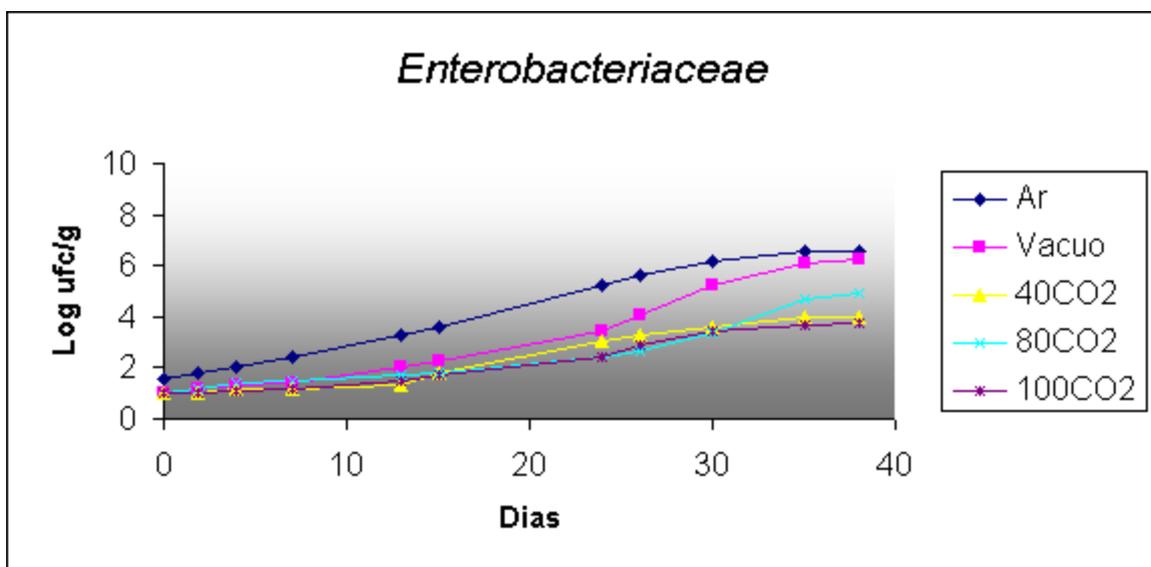


Gráfico 4.6. Desenvolvimento de Bactérias lácticas em carne de atum - amostra inoculada com *A. hydrophila*

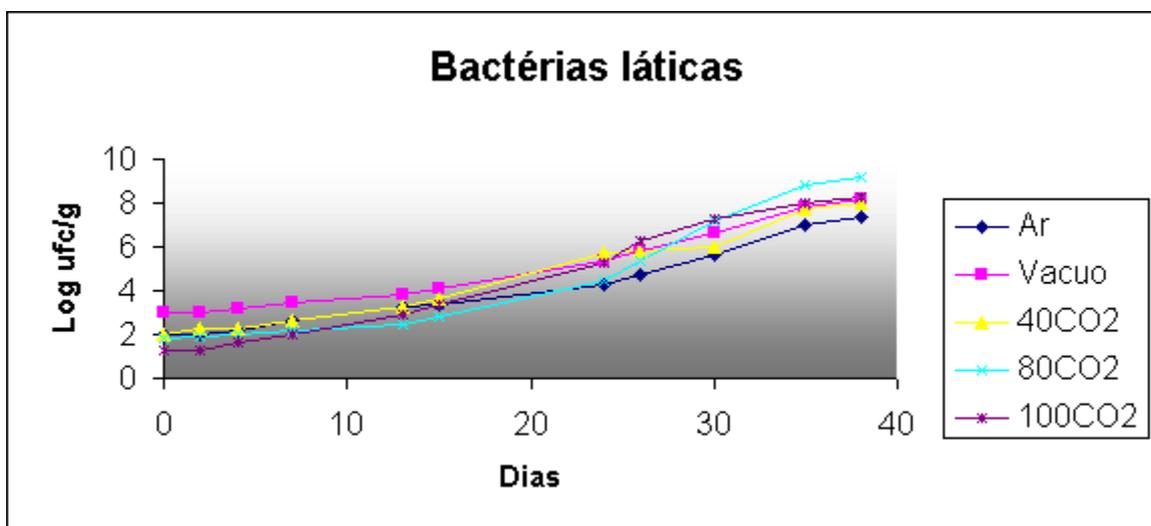


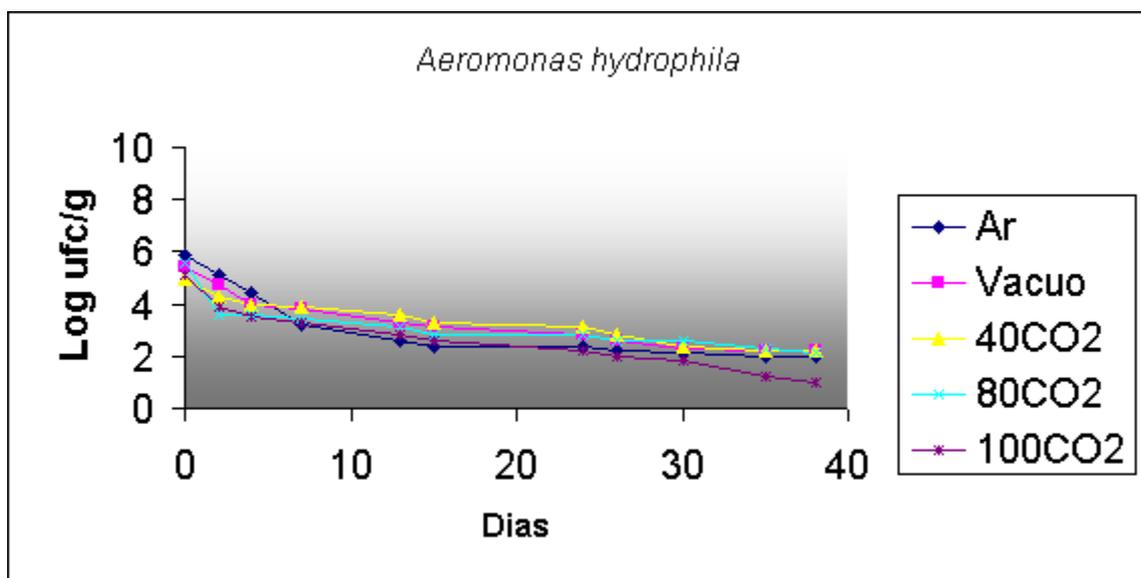
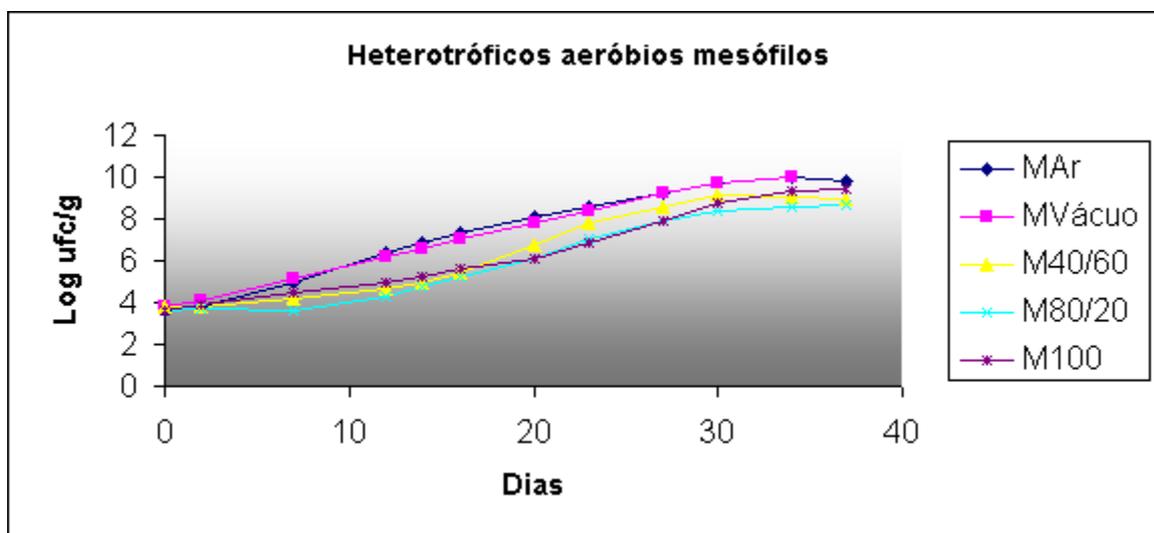
Gráfico 4.7. Desenvolvimento de *A. hydrophila* inoculada em carne de atumGráfico 4.8. 4 Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum - amostra inoculada com *L. monocytogenes*.

Gráfico 4.9. Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum - amostra inoculada com *L. monocytogenes*.

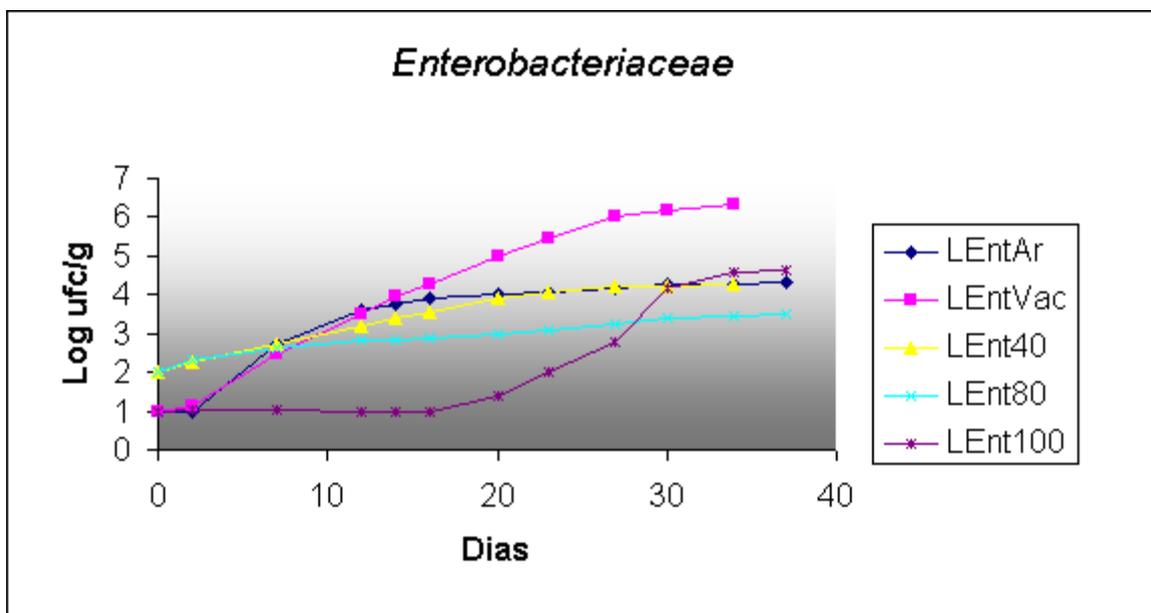


Gráfico 4.10. Desenvolvimento de Bactérias lácticas em carne de atum - amostra inoculada com *L. monocytogenes*.

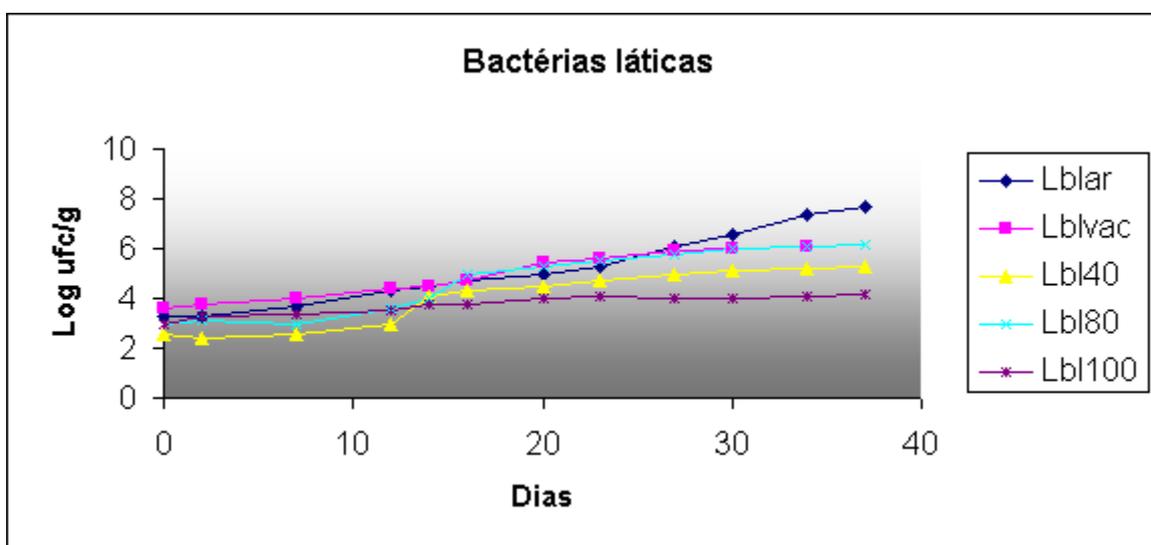


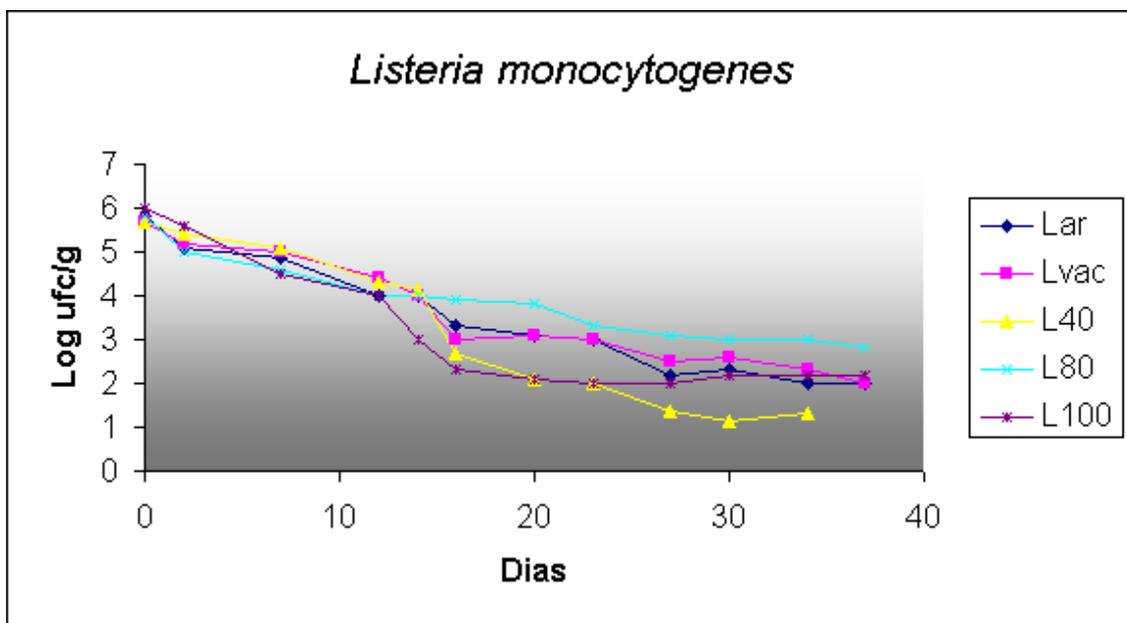
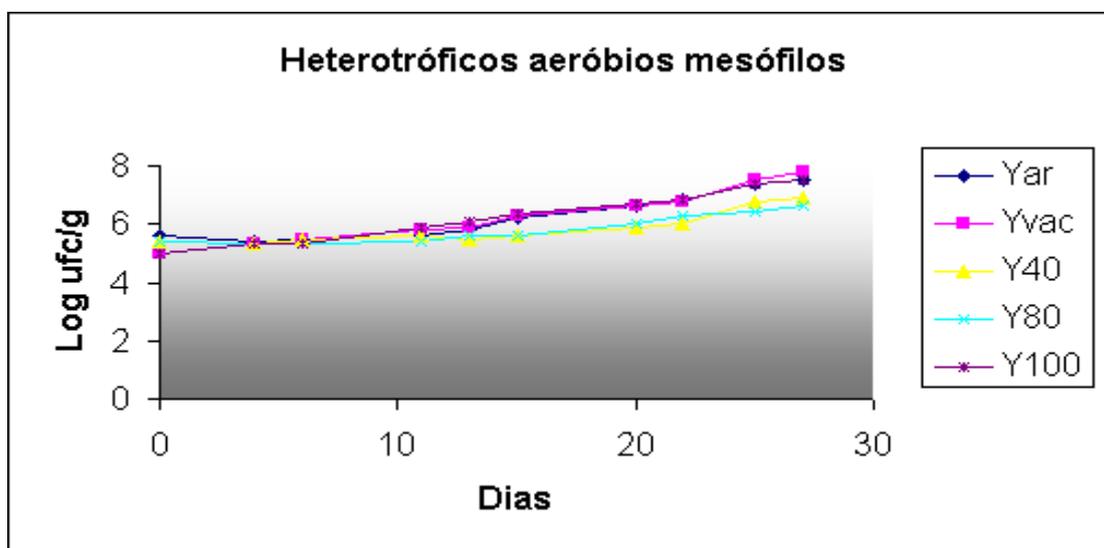
Gráfico 4.11. Desenvolvimento de *L. monocytogenes* em carne de atumGráfico 4.12. Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas em carne de atum - amostra inoculada com *Y. enterocolitica*..

Gráfico 4.13. Desenvolvimento de *Enterobacteriaceae* em carne de atum - amostra inoculada com *Y. enterocolitica*.

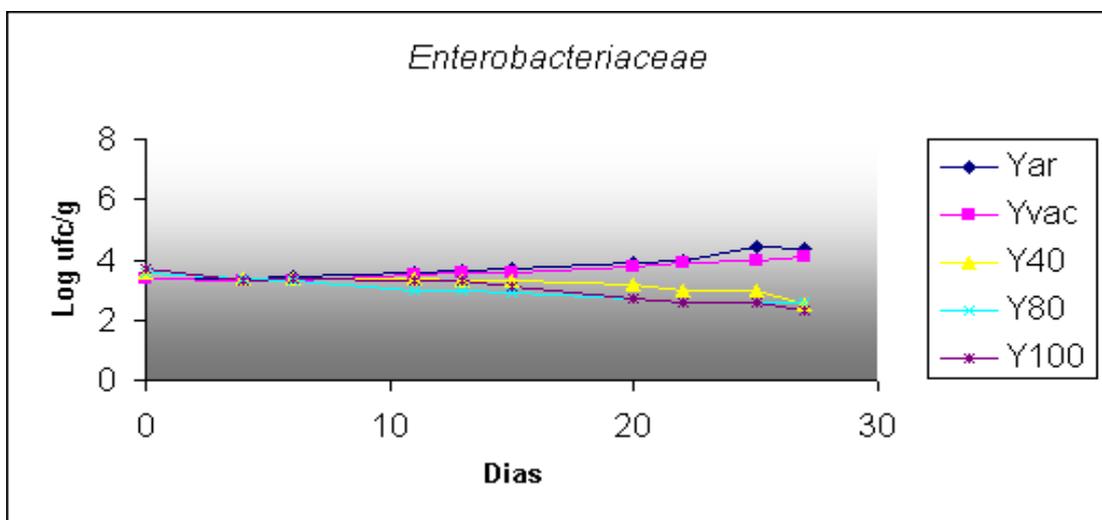


Gráfico 4.14. Desenvolvimento de Bactérias lácticas em carne de atum - amostra inoculada com *Y. enterocolitica*.

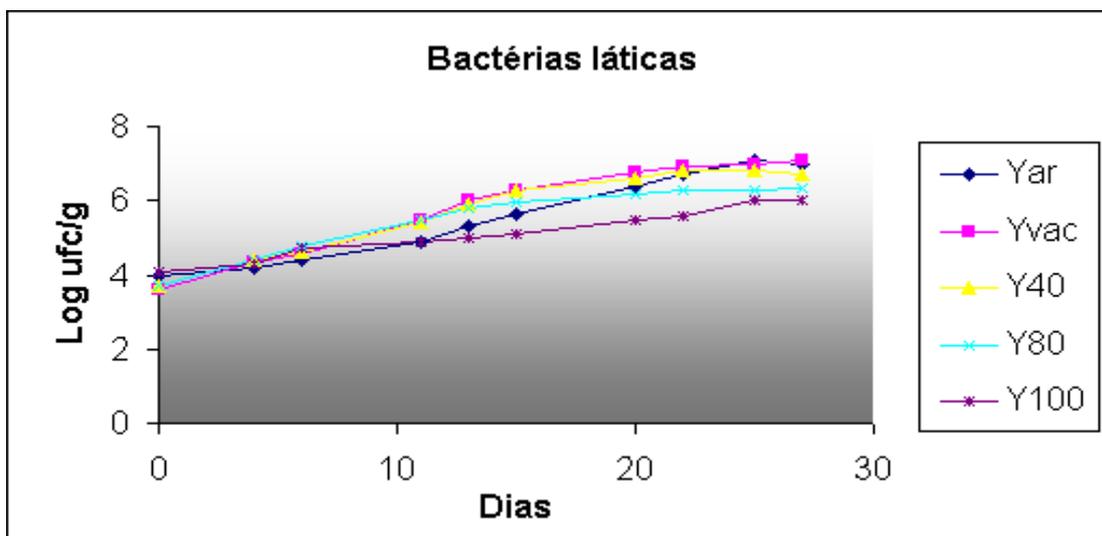


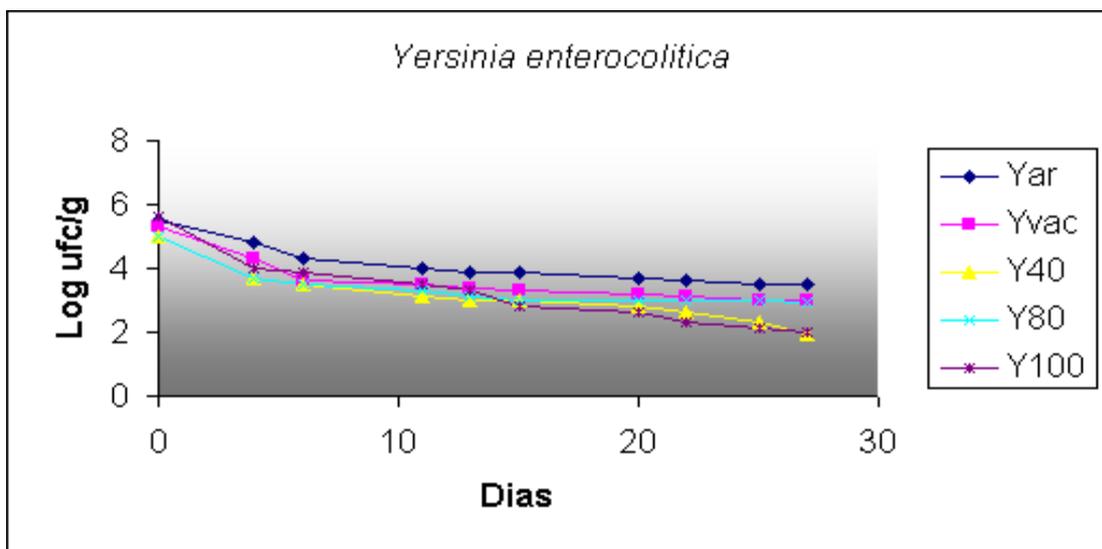
Gráfico 4.15. Desenvolvimento de *Y. enterocolitica* em carne de atum

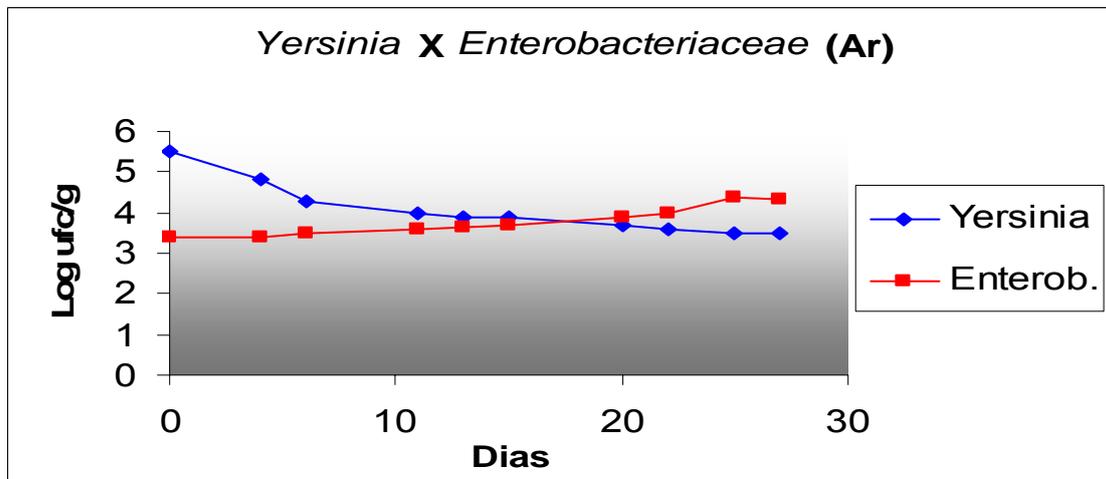
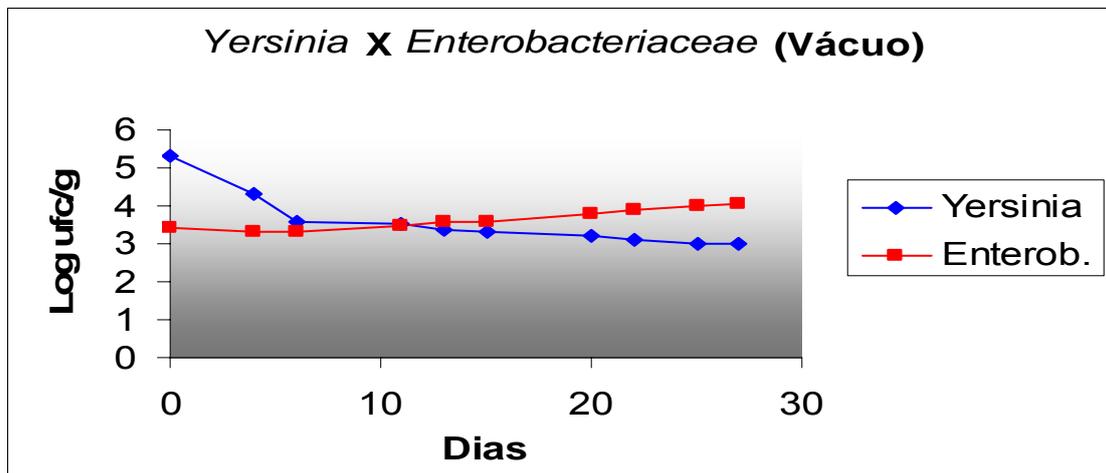
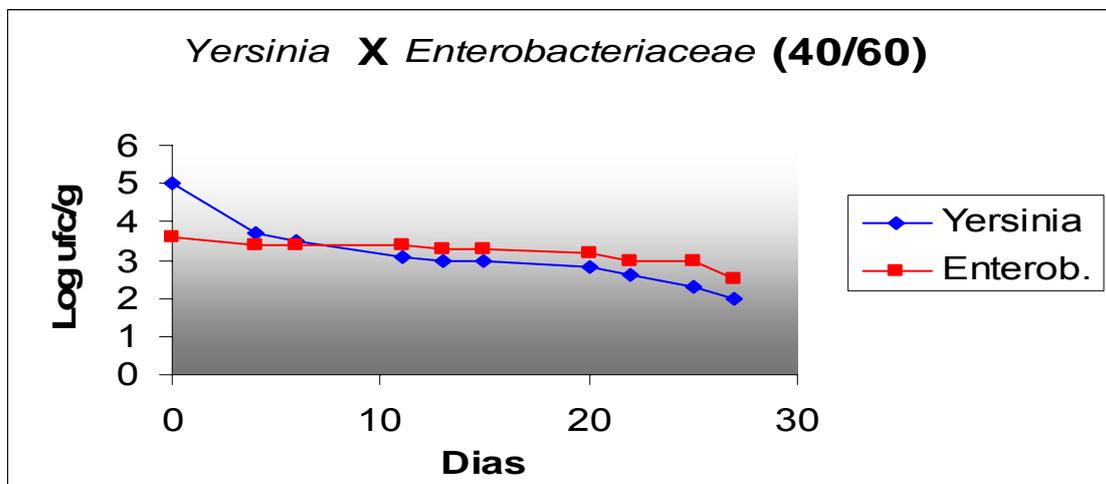
Gráfico 4.16. Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em ar.Gráfico 4.17. Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em vácuoGráfico 4.18. Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em 40/60CO₂/N₂

Gráfico 4.19. Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em 80/20CO₂/N₂

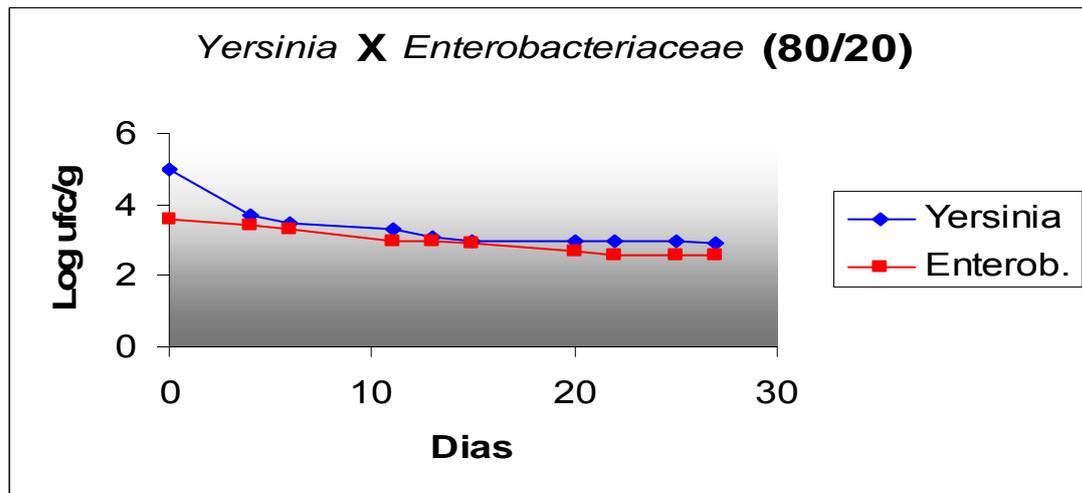


Gráfico 4.20. Comportamento de *Y. enterocolitica* e *Enterobacteriaceae* em 100%CO₂

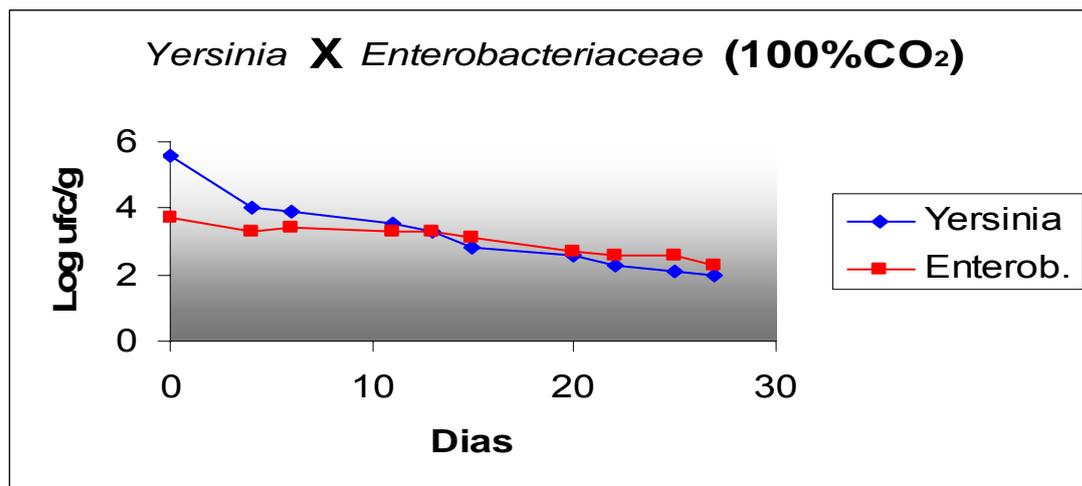


Figura 01. Amostra de atum (*Thunnus albacares*) proveniente da região da bacia de campos, litoral do Estado do Rio de Janeiro, em excelente estado de frescor.



Figura 02. Aferição intramuscular da temperatura da amostra.



Figura 03. Local de pesca das amostras, na baía de Campos, litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.



Figura 04. Acondicionamento da amostras em caixa de polímeros expandidos isotérmico contendo gelo.



Figura 05. Retirada da amostra da caixa de material isotérmico no laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Veterinária da UFF.



Figura 06. Preparo da amostra para a segmentação do lombo (*Longissimus dorsi*)



Figura 07. Amostra com lombo retirado para posterior segmentação dos lombo (*Longissimus dorsi*).



Figura 08. Lombo (*longissimus dorsi*) retirado higienicamente aguardando segmentação.



Figura 09. Segmentação do lombo (*longissimus dorsi*) em porções de aproximadamente 50g.



Figura 10. Porção de lombo de atum em bolsa plástica contendo ar.

