



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Programa de Pós-Graduação do INPA

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E
SENSORIAL DE HIDROLISADO BIOLÓGICO EM PEIXES DA
AMAZÔNIA (*Potamorhina latior* e *Liposarcus pardalis*).**

Maria da Glória Almeida Bandeira Ferreira.

Manaus, Amazonas

Agosto, 2009.

Maria da Glória Almeida Bandeira Ferreira.

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E
SENSORIAL DE HIDROLISADO BIOLÓGICO EM PEIXES DA
AMAZÔNIA (*Potamorhina latior* e *Liposarcus pardalis*).**

**Edson Lessi, Dr.
Orientador/INPA**

**Rogério Souza de Jesus, Dr.
Co-Orientador/INPA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

**Manaus, Amazonas
Agosto, 2009.**

Ficha catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INPA

F383c Ferreira, Maria da Glória Almeida Bandeira
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA
E SENSORIAL DE HIDROLISADO BIOLÓGICO EM PEIXES
DA AMAZÔNIA (*Potamorhina latior* e *Liposarcus pardalis*).
Maria da Glória Almeida Bandeira Ferreira.--Manaus: [s.n.], 2009.
xvi, 129 f.: il. (algumas color)

Tese (doutorado)—INPA, 2009.

Orientador: Dr. Edson Lessi

Co-Orientador: Dr. Rogério Souza de Jesus

Área de concentração: Tecnologia de Recursos Pesqueiros

1. Hidrolisado biológico - Peixes - Amazônia 2. Acari-bodó
3. *Liposarcus pardalis* 4. Branquinha 5. *Potamorhina latior*
6. *Lactobacillus plantarum* 7. *Lactococcus lactis* I. Título

CDD 19^a ed. 664.94

Sinopse:

Este trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica do músculo da branquinha (*Potamorhina latior*, Spix & Agassiz, 1829) e do acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau, 1855). Definir qual o melhor pescado para a elaboração de hidrolisado biológico utilizando-se cepas de *Lactobacillus plantarum* (CCT 2568) e de *Lactococcus lactis* (CCT 2739). Realizar a caracterização microbiológica, físico-química e sensorial destes hidrolisados. Os hidrolisados foram obtidos a partir de três tratamentos: tratamento I (pescado, carboidrato e *Lactobacillus plantarum*), tratamento II (pescado, carboidrato e *Lactococcus lactis*) e tratamento III (pescado, carboidrato, *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* juntos). Durante o período de fermentação determinou-se diariamente os valores de pH e acidez dos hidrolisados obtidos, assim como a microbiota deteriorante e patogênica (bactérias mesófilas, bolores e leveduras, coliformes total e termotolerante), além da contagem dos lactobacilos. Após o período de fermentação os hidrolisados foram congelados a -20°C e posteriormente liofilizados.

Palavras-chave:

Acari-bodó, branquinha, hidrolisado biológico, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Liposarcus pardalis*, *Potamorhina latior*.

Dedico

Esse trabalho é dedicado a Deus por todo apoio, por não ter me deixado fraquejar em nenhum momento de minha vida, por me carregar no colo quando precisei, por segurar na minha mão e não ter me abandonado nos momentos difíceis e por me permitir chegar até aqui.

Dedico também aos meus pais Bernardino de Sousa Bandeira (in memorian) e Severina de Almeida Bandeira (in memorian) por todo amor e a valiosa compreensão do que é educação.

Aos meus queridos filhos Waterloo, Lucas e Vinicius por todo amor, compreensão e apoio durante essa jornada.

À minha irmã Graça pelo amor que nos une.

Agradecimentos

Meus agradecimentos àqueles a quem tudo devo: a Deus, a Jesus e ao Espírito Santo.

Meus agradecimentos a minha família: filhos (Waterloo, Lucas e Vinicius), irmãos (Gracinha, Neto, Francisco) por sua confiança e por acreditarem que seria capaz de concluir essa caminhada.

Ao Dr. Edson Lessi, grande amigo e orientador pelo apoio inestimável na realização deste trabalho.

Ao Dr. Rogério Souza de Jesus, também um grande amigo, pela ajuda como co-orientador.

Ao Dr. Nilson Luiz de Aguiar e Carvalho, por disponibilizar as dependências do CPTA/INPA para a realização deste trabalho.

A Dra. Noemia Kazue, por disponibilizar as dependências do laboratório de Microbiologia CPTA/INPA para a realização deste trabalho.

Ao Mestre Paulo de Tarso Falcão, pela amizade e colaboração nas horas precisas.

Aos funcionários do CPTA, Sebastião, Ribamar e Marluce, agradeço pelo apoio administrativo.

Minha amiga Dra. Denise Cerávolo, pela amizade, sugestões, considerações durante toda a elaboração desta tese.

Meu amigo Elton Nunes Britto pelas análises estatísticas.

Aos amigos Sérgio Ferreira, Helena Lúcia, Rosária e Adriana pelo apoio e acolhimento quando cheguei a Manaus.

Aos amigos do CPTA, Dr. Pedro Roberto, Emanuel, Robson, Marta, Luty e tantos outros que por ali passaram e compartilharam conhecimentos, ajuda, confissões.

A Eliane Christine, aluna de PIBIC que muito me ajudou no laboratório de microbiologia.

A Carminha, secretária do BADPI, pelas sugestões e presteza nas informações sobre o curso.

A Universidade Federal do Maranhão (Departamento de Tecnologia Química), pelo incentivo e liberação para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas professores do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Maranhão, Dr. Armando Bayma, Dr. João Elias Mouchreck, Dr. Victor Elias Mouchreck, Dra. Gilvanda Nunes, Dr. Arão Filho, Dr. Herberth Furtado que mesmo distante me desejaram sucesso.

Aos amigos que fiz em Manaus, Satomi, Jamal, Pedro Roberto, Jerusa Andrade, Rosseval pelo companherismo nas horas difíceis.

A FAPEMA e Capes pela concessão de bolsa de doutorado durante toda esta pesquisa.

Ao CNPq que também contribuiu com recursos financeiros para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os amigos, familiares que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Elaboraram-se três hidrolisados biológicos de branquinha (*Potamorhina latior*) e acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) utilizando-se cepas de *Lactobacillus plantarum* (CCT 2568) e *Lactococcus lactis* (CCT 2739). Fizeram-se análises microbiológicas (coliformes total e termotolerante, bolores e leveduras, bactérias mesófilas, lactobacilos) no filé e no hidrolisado da branquinha. No filé e nos hidrolisados de acari-bodó realizaram-se análises físico-químicas (pH, acidez, umidade, proteínas, lipídios, RMF, carboidratos), microbiológicas (coliformes total e termotolerante, bolores e leveduras, bactérias mesófilas, lactobacilos), aminoácidos totais e livre. Efetuaram-se análises sensoriais em biscoitos doces obtidos com adição de hidrolisados biológicos de acari-bodó. Fez-se também a caracterização microbiológica do acari-bodó (filé, pele, vísceras, brânquias). Os hidrolisados foram obtidos a partir do filé de pescado adicionando-se sacarose comercial (açúcar) como fonte de carboidrato e bactérias ácido láctico. A mistura foi incubada em estufa bacteriológica a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ /5 dias. Após o período de incubação congelou-se os hidrolisados a -20°C para posterior liofilização. As análises microbiológicas, pH e acidez foram realizadas diariamente nos hidrolisados. Realizou-se também a composição centesimal e determinações de aminoácidos. Os biscoitos doces foram elaborados com a adição dos hidrolisados liofilizados. O filé da branquinha apresentou contagem elevada para coliformes total (2400NMP/g) e termotolerante (460NMP/g). Conseqüentemente seus hidrolisados também apresentaram valores elevados para os coliformes total (2400NMP/g) e termotolerante (2400NMP/g), assim como para as bactérias mesófilas (10^5 UFC/g), bolores e leveduras (10^5 UFC/g). O filé de acari-bodó apresentou para os coliformes total (28NMP/g) e termotolerante (<3NMP/g), bactérias mesófilas (10^3 UFC/g), bolores e leveduras (<10UFC/g) e lactobacilos (10^4 UFC/g). Seus hidrolisados apresentaram resultados semelhantes quanto aos lactobacilos (10^7 - 10^9 UFC/g), bactérias mesófilas (10^4 - 10^6 UFC/g), bolores e leveduras (10^3 - 10^4 UFC/g) e ausência de coliformes total e termotolerante para os três hidrolisados a partir do terceiro dia. O pH do filé de acari-bodó variou de 6,62 a 7,02 e a acidez em torno de 0,28% de ácido láctico. Nos hidrolisados o pH ficou entre 3,93 a 4,09 e a acidez entre 3,86 a 4,34. Todos os aminoácidos totais e livres foram determinados no filé e nos hidrolisados de acari-bodó. O hidrolisado obtido com o *Lactobacillus plantarum* apresentou os maiores valores para os aminoácidos analisados. No filé de acari-bodó encontraram-se valores de umidade (84,10%), proteínas (13,14%), lipídios (1,65%) e RMF (1,10%). Para os hidrolisados umidade (2,30-3,39%), proteínas (44,86-46,21%), lipídios (2,86-3,51%), RMF (2,31-3,18%) e carboidratos (43,20-46,57%). Não houve diferença significativa entre os parâmetros analisados da composição química dos biscoitos doces obtidos com os três hidrolisados. A avaliação sensorial dos biscoitos mostrou que o hidrolisado LL+LP foi o preferido pelos avaliadores.

ABSTRACT

Three biological hidrolisados of branquinha was elaborated (*Potamorhina latior*) and acari-bodo (*Liposarcus pardalis*) being used stumps of *Lactobacillus plantarum* (CCT 2568) and *Lactococcus lactis* (CCT 2739). Analyses microbiological was made (total and fecal coliforms, mould and yeasts, bacteria mesophilas, lactobacilli) in the filet and in the hidrolisates of the branquinha. In the filet and the acari-bodó hidrolisates it took place analyses physical-chemistries (pH, acidity, humidity, proteins, lipids, RMF, carbohydrate), microbiological (total and fecal coliforms, mould and yeasts, bacteria mesophylas, lactobacilli), total and free amino acids. It occurred sensorial analyses in sweet cookies obtained with addition of biological hidrolisates of acari-bodo. It was also made the characterization microbiological of the acari-bodo (filet, skin, viscera, gills). The hidrolisates were obtained starting from the fish filet being added commercial sucrose (sugar) as source of carbohydrate and bacteria lactic acid. The mixture was incubated in bacteriological greenhouse to $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ /5 days. After the incubation period it froze the hidrolisates for -20°C for subsequent liofilizate. The analyses microbiological, pH and acidity were accomplished daily in the hidrolisates. It also took place the centesimal composition and determinations of amino acids. The sweet cookies were elaborated with the addition of the hidrolisates liofilizates. The filet of the branquinha presented high count for total coliforms (2400NMP/g) and fecal (460NMP/g). Consequently your hidrolisados also presented high values for the total coliforms (2400NMP/g) and fecal (2400NMP/g), as well as for the bacterias mesophylas (10^5UFC/g), mould and yeasts (10^5UFC/g). The acari-bodo filet presented for the total coliforms (28NMP/g) and fecal ($< 3\text{NMP/g}$), bacterias mesophylas (10^3UFC/g), mould and yeasts ($< 10\text{UFC/g}$) and lactobacilli (10^4UFC/g). Your hidrolisates presented results similar with relationship to the lactobacilli ($10^7\text{-}10^9\text{UFC/g}$), mesophylas bacterias ($10^4\text{-}10^6\text{UFC/g}$), mould and yeasts ($10^3\text{-}10^4\text{UFC/g}$) and absence of total coliforms and fecal for the three hidrolisates starting from the third day. The pH of the acari-bodo filet varied from 6,62 to 7,02 and the acidity around 0,28% of lactic acid. In the hidrolisates the pH was between 3,93 to 4,09 and the acidity among 3,86 to 4,34. All the total and free amino acids were certain in the filet and in the hidrolisates of the acari-bodo. The hidrolisate obtained with the *Lactobacillus plantarum* it presented the largest values for the analyzed amino acids. In the acari-bodo filet it was humidity values (84,10%), proteins (13,14%), lipids (1,65%) and RMF (1,10%). For the hidrolisates humidity (2,30-3,39%), proteins (44,86-46,21%), lipids (2,86-3,51%), RMF (2,31-3,18%) and carbohydrate (43,20-46,57%). There was not significant difference among the analyzed parameters of the chemical composition of the sweet cookies obtained with the three hidrolisates. The sensorial evaluation of the cookies showed that the hidrolisate LL+LP was the favorite for the appraisers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	26
2.1- Objetivo Geral	26
2.2- Objetivos Específicos	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1. Amazonas: Biodiversidade, Economia e Produção Pesqueira	27
3.2. Produção de alimentos	29
3.3. Pescado	31
3.3.1. Composição química e valor nutricional do pescado	31
3.3.2. Microbiologia de pescado	35
3.3.3. Métodos de controle de qualidade de pescado	41
3.3.3.1. Análise microbiológica	41
3.3.3.2. Análise sensorial	43
3.3.4. Tecnologia de pescado	44
3.3.4.1. Hidrolisado de pescado	46
3.3.4.1.1 Definição, tipos de hidrolisados	46
3.3.4.1.2. Aplicações de hidrolisado protéico de pescado	53
3.4. Bactérias ácido láctico	56
3.5. Espécies estudadas	59
3.5.1. Branquinha (<i>Potamorhina latior</i> , Spix & Agassiz 1829)	59
3.5.2. Acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i> , Castelnau 1855)	60
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. Culturas lácticas	61
4.2. Pescado	62
4.2.1. Branquinha (<i>Potamorhina latior</i> , Spix & Agassiz 1829)	62
4.2.2. Acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i> , Castelnau 1855)	62
4.3. Preparação do hidrolisado	63
4.4. Preparação dos biscoitos doces	66
4.5. Análises	66
4.5.1. Análise físico-química do pescado “in natura” e dos hidrolisados	67
4.5.2. Análise microbiológica do pescado “in natura” e dos hidrolisados	69

4.5.3. Análise sensorial de biscoitos doces formulados com hidrolisados	71
4.5.4..Análises estatísticas	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1. Branquinha (<i>Potamorhina latior</i> , Spix & Agassiz 1829)	72
5.1.1. Microbiologia de filé e hidrolisados	72
5.2. Acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i> , Castelnau 1855)	75
5.2.1. Microbiologia de filé	75
5.2.2. Microbiologia de hidrolisado biológico	77
5.2.3. pH e acidez de filé e de hidrolisados	87
5.2.4. Composição físico-química de filé e de hidrolisados	94
5.2.5. Composição centesimal de biscoitos doces	103
5.2.6. Aminoácidos	104
5.2.7. Avaliação sensorial	112
6. CONCLUSÕES	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do pescado segundo a quantidade de gordura e proteínas do músculo.	32
Tabela 2 – Composição química do tecido muscular de algumas espécies de peixes amazônicos.	34
Tabela 3- Qualidade sensorial de hidrolisado de pescado.	44
Tabela 4- Nomenclaturas de Ensilados de Pescado.	47
Tabela 5– Microrganismos em filé de branquinha (<i>Potamorhina latior</i>).	72
Tabela 6 – Microrganismos em hidrolisado biológico de branquinha (<i>Potamorhina latior</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> .	74
Tabela 7 – Microrganismos em hidrolisado biológico de branquinha (<i>Potamorhina latior</i>) obtido com <i>Lactococcus lactis</i> .	74
Tabela 8 – Microrganismos em hidrolisado biológico de branquinha (<i>Potamorhina latior</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactococcus lactis</i> .	74
Tabela 9 - Microrganismos em filé de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>)	75
Tabela 10 – Avaliação bacteriológica de pele, vísceras, brânquias e filé do acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>).	76
Tabela 11 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP) - 1° experimento.	78
Tabela 12 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP) - 2° experimento.	78
Tabela 13 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP) - 3° experimento.	79
Tabela 14 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactococcus lactis</i> (LL) - 1° experimento.	79
Tabela 15 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactococcus lactis</i> (LL) - 2° experimento.	80
Tabela 16 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactococcus lactis</i> (LL) - 3° experimento.	80

Tabela 17 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactococcus lactis</i> (LP+LL) - 1° experimento.	81
Tabela 18 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactococcus lactis</i> (LP+LL) - 2° experimento.	81
Tabela 19 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactococcus lactis</i> (LP+LL) - 3° experimento.	81
Tabela 20 – pH e acidez em filé de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) em três amostras utilizadas na obtenção de hidrolisado biológico.	88
Tabela 21 – pH e acidez em hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtidos com adição de cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP), <i>Lactococcus lactis</i> (LL) e com as duas cepas juntas (LP + LL).	89
Tabela 22 – Valores médios de pH e acidez entre os dias dos três hidrolisados <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP), <i>Lactococcus lactis</i> (LL) e LL+LP.	90
Tabela 23 - Composição centesimal aproximada de filé de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>).	94
Tabela 24 - Composição físico-química de filé e de hidrolisado biológico de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) liofilizado.	98
Tabela 25 - Composição centesimal aproximada de hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP).	99
Tabela 26 - Composição centesimal aproximada de hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactococcus lactis</i> (LL).	99
Tabela 27 - Composição centesimal aproximada de hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) obtido com <i>Lactococcus lactis</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i> (LL+LP).	99
Tabela 28 – Composição físico-química de biscoitos doces obtidos com a adição de hidrolisados biológicos de acari-bodó.	103
Tabela 29 – Aminoácidos totais em filé de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i> , Castelnau 1855).	104
Tabela 30 - Aminoácidos totais em filé de acari-bodó (<i>Liposarcus pardalis</i>) e tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	105

Tabela 31 – Aminoácidos essenciais em filé de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau 1855) comparado com o padrão FAO. 106

Tabela 32 – Aminoácidos totais em hidrolisado liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau 1855) obtido com a adição de cepas de *Lactobacillus plantarum* (LP) e *Lactococcus lactis* (LL). 107

Tabela 33 – Aminoácidos livres em hidrolisado liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau 1855) obtido com a adição de cepas de *Lactobacillus plantarum* (LP) e *Lactococcus lactis* (LL). 108

Tabela 34 - Aminoácidos totais em filé e hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtidos com cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis*. 110

Tabela 35 - Aminoácidos em ensilado químico comparado com três hidrolisados biológico liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e os dois juntos (LL+LP). 112

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fluxograma de obtenção de hidrolisado biológico de pescado. 63
- Figura 2 – Seqüência de procedimentos utilizados para obtenção de hidrolisado biológico de peixes da Amazônia. 65
- Figura 3 – Evolução de bactérias mesófilas em três hidrolisados biológicos de acari-bodó. 82
- Figura 4 – Contagem de bactérias mesófilas em três hidrolisados biológicos de acari-bodó. 83
- Figura 5 – Resíduo de bactérias mesófilas em três hidrolisados biológico de acari-bodó. 83
- Figura 6 – Contagem de lactobacilos em três hidrolisados biológicos de acari-bodó. 84
- Figura 7 – Valores residual de lactobacilos em três hidrolisados biológico de acari-bodó. 84
- Figura 8 – Valores médios de coliformes totais em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 85
- Figura 9 – Valores médios de coliformes termotolerantes em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 85
- Figura 10 – Valores médios de lactobacilos em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 86
- Figura 11 – Valores médios de bolores e leveduras em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 86
- Figura 12 – Valores médios de bactérias mesófilas em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 87
- Figura 13 – pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 90
- Figura 14 – Acidez em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 91

Figura 15 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 92

Figura 16 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP). 93

Figura 17 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactococcus lactis* (LL). 93

Figura 18 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP) + *Lactococcus lactis* (LL). 94

Figura 19 – Valores médios de umidade em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 101

Figura 20 – Valores médios de proteínas em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 101

Figura 21 – Valores médios de lipídios em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 101

Figura 22 – Valores médios de RMF em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 101

Figura 23 – Valores médios de carboidratos em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 102

Figura 24 – Valores médios de composição química em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP. 102

ANEXOS

ANEXO 1 - Ficha de Avaliação Sensorial – Teste de ordenação	128
ANEXO 2 – Ficha de Avaliação Sensorial – Teste de aceitabilidade	129

1- INTRODUÇÃO

A pesca extrativa continental brasileira teve uma produção de 251.241 toneladas no ano de 2006, representa 23,9% da produção total de pescado do Brasil e apresentou um crescimento de 3,2% quando comparado ao ano de 2005 (Brasil, 2008).

A região Norte produziu em 2006, 147.931t (58,9%) do pescado brasileiro e detém a maior produção de pesca extrativa continental do Brasil. O Estado do Amazonas, por sua vez, produziu 57.316 t sendo esta totalmente artesanal (Brasil, 2008).

A Amazônia compreende mais de 40% do território nacional, e é quase totalmente coberta por florestas tropicais, drenadas para o Oceano Atlântico através da bacia do Rio Amazonas, a qual contribui com, aproximadamente, 25% de aporte de água doce do mundo para o sistema marinho (Castagnolli, 1995 *apud* Arruda, 2004).

O pescado é muito importante no contexto sócio-econômico da Amazônia (Neto, 2004). Segundo o relatório da Câmara Setorial da Agroindústria da Zona Franca de Manaus (Suframa, 2000), o Amazonas é o maior produtor de pescado de água doce do Brasil. Essa atividade gera, na Amazônia, 105 mil empregos diretos e indiretos e renda da ordem de US\$ 200 milhões/ano.

É a proteína animal com maior consumo na região, equivalente a 72% do consumo total (Jesus, 1999). O consumo per capita de pescado nas cidades de Manaus e Itacoatiara foi estimado entre 100 e 200 g/dia na década de 70 (Santos *et al.*, 2006). Outros dados (Batista, 1998), indicam que as populações rurais ribeirinhas consomem entre 360 e 500g/dia. Dessa forma observa-se que o pescado é o principal gerador de renda para essa população, assim como a mais importante fonte de proteína animal da região. A grande produção e o elevado consumo regional explicam o porquê da importância desse segmento na economia regional (Moroni, 2005).

Manaus ocupa uma posição estratégica no cenário amazônico. A cidade está situada às margens dos rios, Amazonas e Negro, na parte central da maior bacia hidrográfica do planeta. É a maior metrópole da região e conta com um mercado pesqueiro de extraordinária importância. Dados estatísticos das últimas décadas dão conta de uma produção média anual em torno de 30.000 toneladas de pescado, resultando numa intensa atividade socioeconômica, da qual participam milhares de pessoas tanto em Manaus quanto no interior. Uma das características mais marcantes do pescado comercializado em Manaus é a alta diversidade de peixes (Santos *et al.*, 2006).

Entre cerca de 2000 espécies de peixes existentes nos rios amazônicos, aparecem no mercado de Manaus em torno de 40 espécies, das quais somente 8 a 10 possuem expressão econômica. Os produtos de pescado amazônicos exportados ou são congelados inteiros ou em forma de filés, concentrando-se nas espécies de bagres (Jesus *et al.*, 2002).

A pesca, provavelmente, é a atividade que melhor representa a mão-de-obra praticada tradicionalmente pelos amazonenses. O ribeirinho acostumou-se durante anos a buscar e a retirar do rio o seu sustento, através da prática da pesca de subsistência, regida pelas variações sazonais, tais como a dinâmica própria de regime de águas que interfere diretamente no volume de capturas (Santos *et al.*, 1991). Esta atividade apresenta uma complexidade em sua estrutura de organização, de comercialização, de produção. Os elementos-chaves desta complexidade são a alta perecibilidade do produto, a imprevisibilidade e o alto risco associado, fatores que usualmente limitam a atuação dos investidores (Junk e Honda, 1976).

O caráter eminentemente artesanal da pesca na região, fundamenta-se, há décadas, no fraco investimento tecnológico do setor pesqueiro sustentado por uma política de pessoal insipiente, cuja remuneração é a base de parcerias, sendo ainda influenciado pela sazonalidade das capturas e heterogeneidade dos modos de exploração praticados (Fischer *et al.*, 1992).

A descapitalização da maioria dos produtores, as precárias condições de acondicionamento dos barcos e a inexistência de infra-estrutura portuária e de frio, são condições que se destacam dentre as manifestações do fraco

desenvolvimento das forças produtivas na pesca, constituindo fatores propícios à dominação do capital comercial (Parente e Batista, 2005).

É importante ressaltar que no Amazonas, assim como, em todo o mundo há um grande desperdício de pescado devido a sua utilização principalmente nos mercados de peixes frescos, congelados, enlatados ou curados. As plantas processadoras geram um resíduo de 50% do total processado. Soma-se a esse total uma quantidade considerável da pesca que não é aproveitada para consumo humano devido ao seu baixo valor comercial, ausência de infra-estrutura de desembarque e de comercialização agravada pela carência de pessoal qualificado para produção, manuseio, industrialização, comercialização, investigação e administração dos estoques pesqueiros (Fepesca, 2000).

A necessidade de agregar valor ao pescado e ofertar mais alimentos protéicos de origem animal à população tem encaminhado as pesquisas na busca de tecnologias que permitam aproveitar ao máximo a porção comestível das matérias-primas.

É de suma importância o desenvolvimento de novas tecnologias com vistas à utilização de peixes, preferencialmente na alimentação humana (Disney e Hoffman, 1978).

Os recursos pesqueiros oferecem uma boa possibilidade como fonte de alimentos de excelente valor biológico, que podem dar resposta a diferentes demandas do mercado consumidor (Morais e Martins, 1981).

A industrialização favorece o crescimento econômico e aumenta o bem estar social ao gerar maior nível de emprego e renda. Assim, buscar inovações tecnológicas que levem a maior produção de alimentos industrializados é uma estratégia para estimular o desenvolvimento da Amazônia (Moroni, 2005).

Os processos industriais baseados nas atividades microbiológicas estão sendo mais difundidos a cada ano. Os processos fermentativos microbianos são usados para produzir uma variedade de compostos químicos como os aminoácidos, vitaminas e antibióticos. Os produtos microbiológicos são especiais e de alto valor (Zelder e Hauer, 2000).

A fermentação é um dos métodos mais antigos e importantes que se conhece para a elaboração de alimentos. Este processo envolve transformações químicas complexas das substâncias orgânicas mediante a

ação catalítica de enzimas próprias dos alimentos ou produzidas por diversos microrganismos (Tomé, 1993).

Trabalhos têm sido conduzidos utilizando a fermentação microbiana como meio de preservação ácida. A fermentação microbiana atua rapidamente e fortemente na matéria-prima produzindo ácido láctico a partir dos carboidratos. As bactérias produtoras deste ácido, geram um ambiente impróprio ao desenvolvimento da maioria das bactérias patogênicas e putrefativas (Brito, 1991).

O pescado é rico em proteínas e lipídios porém tem um baixo nível de carboidratos fermentescíveis. A principal fonte de energia no pescado são os aminoácidos livres que aumentam à medida que o pescado se liquefaz. As bactérias lácticas têm uma limitada capacidade de sintetizar os aminoácidos, embora as bactérias putrefativas utilizem os aminoácidos como fonte de energia e assim produzem amônia.

A fermentação microbiana pode ocorrer no pescado, desde que haja uma fonte de carboidratos adicionada à biomassa. As bactérias produtoras de ácido láctico propiciarão sua preservação pela produção de ácido láctico e conseqüente abaixamento de pH (Oetterer, 1994 *apud* Borghesi, 2004), inibindo o crescimento de bactérias como *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* (Dapkevicius *et al.*, 2000 *apud* Borghesi, 2004).

Bertullo (1989), apresenta uma tabela de nomenclatura de ensilados de pescado de acordo com diversos autores, onde ele define hidrolisado biológico como sendo o produto obtido devido à ação de microrganismos proteolíticos ou enzimas (tabela 4, pág. 47 desta tese).

Oetterer (1991) define hidrolisado biológico como sendo uma mistura de pescado com carboidratos, colocado em contato com a cultura (inóculo) de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* ou outros microrganismos. Como na flora bacteriana do pescado ocorre um número reduzido de microrganismos produtores de ácido láctico, torna-se necessário à adição destas bactérias ao pescado, para que ocorra a fermentação adequadamente.

Os hidrolisados protéicos têm sido utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais para alimentação

enteral de bebês e para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas (Clemente, 2000).

A produção de hidrolisado pode ser destinada à alimentação humana ou animal. Suas vantagens estão em ser um alimento rico em aminoácidos que pode ser consumido em qualquer condição, inclusive ingerido diretamente (Carneiro, 1991).

Para o hidrolisado de pescado como alimentação humana, utiliza-se como matéria-prima principalmente as aparas de filetagem das indústrias. O produto produzido é consumido em forma de patê, apresentando odor e sabor agradáveis ao consumidor. Um ponto a considerar seria na escolha da matéria-prima fresca, certificando que não ocorre à presença de toxinas, pois há o risco de presença de *Clostridium botulinum*, quando a matéria-prima fresca encontra-se em deterioração (Brito, 1991).

Cândido (1998), utilizou o hidrolisado protéico de tilápia, de alto grau de hidrólise, como suplemento na elaboração de biscoitos nutricionalmente modificados para atletas e obteve boa aceitação. Este mesmo autor cita outros pesquisadores que também realizaram pesquisas com hidrolisados de pescado destinado à alimentação humana: Sripathy *et al.* (1963) constataram ser este produto uma fonte de proteína facilmente assimilável no tratamento de pacientes com desordens gastrointestinais e do fígado; Yáñez *et al.* (1976) aumentaram a qualidade e a quantidade de proteínas e seu potencial no combate a fome e desnutrição em países subdesenvolvidos fortificando com hidrolisado de pescado cereais como arroz, trigo e milho; Bostock e Montañó (1983) enriqueceram biscoitos com proteínas de pescado e obtiveram 96,65% de aceitação por crianças; Venugopal (1994) relatou que o hidrolisado tem vantagens óbvias sobre produtos secos como por exemplo o concentrado protéico de pescado e a farinha de peixe, para alimentação humana devido a sua alta solubilidade e balanço de aminoácidos; Yu e Fazidah (1994) utilizaram com sucesso hidrolisado protéico de carpa como suplemento protéico em biscoitos e massas para crianças de regiões pobres; Diniz e Martin (1999) constataram que o hidrolisado tem potencial para ser utilizado como ingrediente alimentar.

Os hidrolisados de pescado ainda apresentam outras aplicações para a alimentação humana e dentre elas pode-se citar: geriátrico, como suplemento energético, é utilizado em dietas enteral, terapêuticas, no controle de peso, em pacientes com má nutrição, associada ao câncer, traumas, queimaduras, encefalopatia hepática, nas formulações infantis hipoalergênicas. Podem ainda ser utilizada na obtenção de peptídios pequenos, biologicamente ativos, os quais podem desempenhar várias funções, regulando ou inibindo a atividade enzimática atuando como antibióticos, hormônios, agentes antivirais e antibacterianos ou imunomoduladores (Neves *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2004; Mira, 2001; Clemente, 2000).

Potamorhina latior (Spix & Agassiz, 1829), denominada branquinha pertence à ordem dos *Characiformes*, família *Curimatidae*. É uma espécie detritívora, consome matéria orgânica floculada, algas, detritos e microrganismos associados. Empreende migrações reprodutivas e desova no início da enchente, ocorrendo comumente em lagos de água branca (Santos *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 1998). Este pescado tem a sua distribuição na América do Sul (Brasil, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Peru) na bacia do Rio Amazonas (Fishbase, 2005).

A branquinha apresenta uma composição química aproximada de proteínas (19,19%), lipídios (3,18%) e de cinza (1,19%), (Jesus *et al.*, 2006), portanto um pescado com potencial para obtenção de novos produtos e utilização.

O *Liposarcus pardalis* (Castelnau, 1855), popularmente denominado acari-bodó, possui distribuição restrita na bacia do Amazonas, encontrado desde o rio Ucayali até a foz do rio Tapajós, pertence à ordem dos *Siluriformes* e à família *Loricariidae*. O bodó apresenta outros nomes comuns: Acari, acari-bodó, cascudo, carachama negra (Peru), cuchá (Colômbia); zapato (Bolívia) (Santos *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 1998).

Há um grande desperdício desse peixe durante sua comercialização. Nos períodos de safra ocorrem 50% de perda do acari-bodó vendido nas feiras, apesar de ser negociado com os preços mais baixos do ano, morre na banca dos vendedores (Ruffino, 2002). Como ninguém compra bodó “frio” (morto), ele é jogado nos corpos de água ou nos aterros sanitários. Isso poderia ser

revertido ou minimizado se o amazônida tivesse maiores opções de produtos obtidos a partir da carne do acari-bodó e aproveitamento tecnológico dos resíduos oriundos do processamento (Moroni, 2005; Castro, 1999).

O acari-bodó, possui um enorme potencial para o desenvolvimento tecnológico no seu processamento e utilização. É um peixe com excelente aceitação nos mercados amazônicos, pois a sua carne é considerada uma das mais saborosas, sendo muito apreciada em pratos regionais (como as caldeiradas) e preferida pelos ribeirinhos para o preparo do piracui, por ter a carne magra e formar flocos quando seca (Castro, 1999; Brito, 1981).

Mesmo algumas espécies participando consideravelmente da produção pesqueira e com boas qualidades nutricionais, são de baixo valor comercial, podendo, entretanto, serem utilizadas para a produção de hidrolisados de alto teor de proteínas com provável possibilidade de ser usado no enriquecimento da alimentação para a dieta humana.

Esta pesquisa foi desenvolvida com o intuito de responder as seguintes questões: Qual o melhor pescado da Amazônia, branquinha ou acari-bodó, na obtenção de hidrolisado biológico para alimentação humana? Qual a melhor bactéria ácido láctico (*Lactobacillus plantarum* ou *Lactococcus lactis*) para a obtenção do hidrolisado biológico? Qual dessas bactérias tem maior efeito inibitório sobre a microbiota deteriorante e patogênica presente nos hidrolisados?

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

Avaliar a qualidade microbiológica do músculo da branquinha (*Potamorhina latior*, Spix & Agassiz, 1829) e acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau, 1855) para a elaboração de hidrolisado biológico utilizando-se cepas de *Lactobacillus plantarum* (CCT 2568) e de *Lactococcus lactis* (CCT 2739) bem como a sua caracterização microbiológica, físico-química e sensorial.

2.2- Objetivos Específicos:

Realizar análises microbiológicas no músculo da branquinha (*Potamorhina latior*) e no de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*) e nos hidrolisados obtidos desses pescados;

Obter o hidrolisado biológico utilizando cepas de *Lactococcus lactis* (CCT 2739) e *Lactobacillus plantarum* (CCT 2568) individualmente e com as duas cepas juntas;

Avaliar o efeito das cepas de *Lactococcus lactis* (CCT 2739) e *Lactobacillus plantarum* (CCT 2568) sobre os microrganismos deteriorantes e patogênicos presentes nos hidrolisados;

Monitorar diariamente o pH e a acidez dos hidrolisados;

Determinar a composição centesimal aproximada da matéria-prima e dos hidrolisados;

Determinar o perfil dos aminoácidos presentes na matéria-prima e no hidrolisado;

Elaborar produtos alimentícios com os hidrolisados obtidos e realizar os testes sensoriais desses produtos.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Amazonas: Biodiversidade, Economia e Produção Pesqueira

Há mais espécies de peixes na Amazônia que em todo o Oceano Atlântico Norte (Lovejoy, 2005; Fearnside, 2003; Clement e Val, 2003).

De acordo com Araújo-Lima e Goulding (1998), a Amazônia possui a mais rica ictiofauna de água doce do mundo tendo cerca de 2500 espécies, entretanto grande parte desse potencial ainda não é explorada. Para Lovejoy (2005), apenas uma em cada dez espécies amazônicas é conhecida pelas ciências biológicas.

Existe também certo número de espécies com alta possibilidade de captura e baixa aceitação por parte do consumidor, porém o seu consumo é baixo devido ao seu tamanho, cor do músculo, alto teor de lipídios, presença de um grande número de espinhas e sabor pouco agradável. A possibilidade de aproveitamento de espécies com tais características, transformadas convenientemente em alimentação humana representaria uma importante fonte de nutrientes, principalmente a protéica (Suframa, 2000).

De acordo com dados da Fepesca (2000), as perdas de pescado na Bacia Amazônica giram em torno de 13% da produção anual, como conseqüência de uma frota pesqueira obsoleta deficiente ou em muitos casos ausência de infra-estrutura de desembarque e de comercialização agravada pela carência de pessoal qualificado para produção, manuseio, industrialização, comercialização, investigação e administração dos estoques pesqueiros.

Além da riqueza mineral e dos combustíveis fósseis, os recursos biológicos são garantia de emprego e renda para a maioria das 35 milhões de pessoas que vivem nessa região com crescimento demográfico de 3% ao ano. Setor como o ecoturismo, a agricultura, a pecuária e segmentos da economia extrativista, como setor madeireiro e a pesca dependem da biodiversidade ou das condições climáticas proporcionadas (Batista, 1998).

Fischer *et al.* (1992), Ruffino e Isaac (1994) apontam outros fatores condicionantes, responsáveis por este estado arcaico, além do ciclo hidrológico

das condições climáticas do sistema e das particularidades de cada uma das diferentes espécies, referentes a preferências culturais e aos interesses econômicos do mercado consumidor, onde os chamados peixes lisos, ditos de couro, como a pirara, o surubim, o mapará e a piramutaba são destinados à exportação, constituindo tabu alimentar pelo consumidor local. Por outro lado, as espécies de escamas, de hábitos sedentários ou migratórios representam o alvo da pesca comercial de pequena escala, mas de grande importância no mercado local, são exemplos o jaraqui, o pacu, a sardinha, o tambaqui, o pirarucu e outras espécies de menor valor comercial.

Para se ter idéia da importância desta atividade para o fornecimento de alimento a populações locais, basta lembrar que o peixe é a principal fonte protéica animal disponível na região. O consumo *per capita* de pescado nas cidades de Manaus e Itacoatiara foi estimado entre 100 e 200g/dia na década de 70 (Santos *et al.*, 2006). Segundo Honda *et al.* (1975) o consumo de pescado no Amazonas no período de 1970 a 1974 correspondeu a uma média de 50,2g/dia e em Manaus igual a 86,71g/dia. De acordo com Shrimpton e Giugliano (1979), o consumo médio *per capita* na região de Manaus foi de 190g/dia, 7 vezes a mais da média geral de outras regiões do país. Outros dados (Batista, 1998), indicam que as populações rurais e ribeirinhas consomem entre 360 e 500g/dia. Outro aspecto importante que influencia neste consumo elevado de pescado é facilitado pela grande acessibilidade de peixes para as classes sociais de menor poder aquisitivo, principalmente no interior (Santos *et al.*, 1991).

As frotas pesqueiras da região, cujo principal porto de desembarque é Manaus, exploram uma vasta área das fronteiras Brasil-Peru até o limite com o vizinho Estado do Pará, e afluentes. Grande parte desta captura é proveniente da região de várzea, incluindo a pesca dirigida às espécies migratória como o jaraqui que chega a constituir cerca de 40% do total desembarcado em Manaus (Barthem, 1995).

A pesca na região está diretamente ligada às grandes oscilações do nível de água dos rios amazônicos (Junk, 1985). Ocorre na época de vazante um excessivo aumento da captura, e a maioria da frota pesqueira é formada por pequenos barcos cujo processo de conservação do pescado é feito em

caixas isotérmicas, à conseqüência disso é o desperdício de cerca de 20 a 30% do peixe capturado na região por deficiências no manuseio (Jesus et al., 1990).

3.2- Produção de alimentos

A alimentação do homem é uma necessidade básica cada vez mais difícil de ser satisfeita para uma parcela crescente da população, especialmente nos países em desenvolvimento. Esta questão tem lançado desafios à Comunidade Científica e Autoridades Competentes na busca de solucionar os males decorrentes da fome. As diferenças existentes de abastecimento mundial agravadas pela explosão demográfica em várias partes do mundo, somados a exploração irracional dos recursos naturais, desperdícios e emprego inadequado de tecnologias têm gerado situações críticas de carências nutricionais e desajustes sociais (Castro, 1999).

Em 1981, Morais e Martins (1981) afirmavam existir um consenso universal de que a produção de alimentos é insuficiente para satisfazer à demanda de uma população crescente, elevando de maneira assustadora as dificuldades existentes.

No Amazonas, o panorama nutricional tem se mantido praticamente inalterado nas últimas décadas, principalmente se tratando das comunidades ribeirinhas e localidades do interior. Esta realidade alimentar é marcada pelo baixo consumo de frutas e hortaliças, monotonia alimentar, ocorrência de doenças espoliativas, do tipo parasitário e infecções banais como as gastroenterites, facilitadas pela situação sanitária precária (Alencar *et al.*, 1991).

A existência de uma infra-estrutura rudimentar na região, predominantemente extrativista, aliado às dificuldades de abastecimento e distribuição contribuiu neste panorama para aumentar os casos de desnutrição, por anemias, verminoses, deficiência de vitamina A, bócio, desmame precoce, cárie dental e doenças diarréicas logo no primeiro ano de vida (Petrere *et al.*, 1992).

Alencar *et al.* (1991) realizaram estudos em pré-escolares na cidade de Manaus e constatou que a desnutrição global no ano de 1984 alcançou os índices de 63,3%. Em 1995, Castro (1999) relatou que houve uma queda para 35,6%, o mesmo não ocorrendo no interior, onde na Calha do Rio Negro os índices se mantiveram praticamente os mesmos tanto na zona rural quanto na área urbana 45,2% e 49%, respectivamente, e na cidade de Barcelos 40,4% na zona rural e 42,7% na área urbana. Com relação à desnutrição crônica, neste mesmo período na cidade de Novo Airão os índices foram de 58%, em Barcelos 54% e em São Gabriel da Cachoeira 34,8%. Existem também as ocorrências de anemia, carência de iodo, deficiência de retinol e betacaroteno.

No município de Nhamundá/Am, estudo realizado por Yuyuama *et al.* (1997) constataram a incidência de monotonia alimentar na dieta de pré-escolares, onde os alimentos que se destacavam eram a farinha de mandioca, pão, arroz, e peixe sendo marcante também o baixo consumo de frutas e hortaliças, com relação aos minerais os que se mostraram em maior déficit foram o cálcio e zinco. No geral, a dieta se mostrou hipocalórica e hiperprotéica.

Pesquisa desenvolvida por Rocha *et al.* (1993) em Palmeiras do Javari/AM foi constatada expressiva incidência de anemia e desnutrição em crianças em idade pré-escolar e escolar, com inadequações para vitamina A, ferro e niacina além do alto índice de verminose.

Desde a década de 70, Shrimpton e Giugliano (1979) já sinalizaram o baixo consumo de frutas, verduras e leguminosas e a prevalência de alto consumo de peixe, pão e farinha, como sendo características marcantes da dieta alimentar em Manaus. Yuyuama *et al.* (1992) ao estudarem a composição química e o percentual de adequação da dieta regional de Manaus, constataram déficit calórico de 34,3% para o homem adulto e de 13,4% para a mulher adulta.

No Amazonas, estudos bioquímicos iniciados na área urbana de Manaus a partir de 1981 registraram baixos níveis, entre operários e pré-escolares, de retinol e beta caroteno. As pesquisas referentes à ocorrência de anemia por deficiência de ferro revelaram uma alta incidência, cerca de 90% em todos os grupos populacionais, mas principalmente em crianças em idade pré-escolar. Com relação à ocorrência do bócio endêmico, outro estudo realizado em 1995 abrangendo 1.197 escolares da rede de ensino público e privado de Manaus,

registrou a ocorrência de 13,6% de manifestações clínicas no estágio inicial de carência de iodo, sem contudo caracterizar problema de saúde pública (Alencar *et al.*, 1991).

Considerando essa deficiência alimentar na região Amazônica o que acarreta muitas vezes em desnutrição, deve-se fazer uso de processos tecnológicos adequados respeitando as preferências das dietas locais e da disponibilidade de recursos naturais num melhor aproveitamento dos recursos pesqueiros.

O pescado oferece uma boa possibilidade como fonte de alimentos de excelente valor biológico, que pode dar resposta a diferentes demandas do mercado consumidor.

No passado, não havia grande preocupação com a eficiência na utilização de proteína, aceitando-se grandes perdas, na forma de resíduos aproveitáveis, como resultados finais de uma dada operação no processamento de pescado. Tais resíduos têm sido, então, destinados à fabricação de ração animal ou descartados. Estes processos rendem de 25 a 70% da matéria-prima como produto comestível, de modo que deixam de participar de alimentação humana. Esta sobra de pescado é pelo menos igual ao peso de peixe inteiro utilizado para a produção de farinha. Em conseqüência, mais de 2/3 da captura não estão sendo utilizados como alimento humano, embora nutricionalmente seja comparável à porção ora comercializada. Isto representa uma fonte potencial que poderá permitir o aumento do suprimento de proteína de alta qualidade (Morais e Martins, 1981).

3.3- Pescado

3.3.1- Composição química e valor nutricional do pescado

A composição centesimal aproximada representa o conhecimento em porcentagem do constituinte de umidade, proteína, lipídios e cinza. O equilíbrio entre esses constituintes e sua variabilidade após a morte têm influência na qualidade dos peixes, fator importante para a indústria e consumidores (Love,

1992).

Análises mostram que a composição química dos peixes é bastante variável, indicando inclusive variações entre indivíduos da mesma espécie. Essas diferenças são influenciadas por fatores intrínsecos, como desova e migração e fatores extrínsecos, como a escassez de alimentos (Huss, 1998), além disso podemos citar também variações quanto à idade, estado fisiológico, época e região de captura (Ferreira, 1994).

A água é um dos componentes do peixe que apresenta maiores variações relacionadas às espécies e às épocas do ano, e pode compreender de 53 a 80% do total (Ordanez *et al.*, 2005). A água também participa de diversas reações no tecido muscular, conferindo propriedades reológicas aos músculos (Sikorski *et al.*, 1990).

Um dos critérios mais utilizados para classificar os peixes segundo a composição é a elaborada por Stansby (1962), ele propôs agrupar em cinco classes conforme os teores de gordura e proteína. A tabela 1 descreve esta classificação.

Tabela 1 – Classificação do pescado segundo a quantidade de gordura e proteínas do músculo.

Classe	Gordura (%)	Proteína (%)
A	< 5	15-20
B	5-15	15-20
C	>15	<15
D	<5	>20
E	<5	<15

Fonte: Stansby, 1962.

Almás (1981) fez uma outra classificação considerando dois fatores, o teor de lipídios (%) e o valor energético (Kcal/100g): 1) pescado magro : lipídios entre 0,2 a 0,8% e valor energético entre 80-90 kcal/100g; 2) pescado semi-gordo: lipídios entre 2,0 a 5,7 % e valor energético de 90 a 160 kcal/100g; e 3)

pescado gordo: lipídios entre 8 a 14% e valor energético de 150 a 220 kcal/100g.

O pescado tem grande variedade de minerais, dos quais os mais abundantes são cálcio, fósforo, sódio, potássio e magnésio. Em quantidades residuais podem-se encontrar iodo, ferro, cobre, flúor, cobalto e zinco (Ordanez *et al.*, 2005).

A quantidade de vitaminas do pescado varia conforme a espécie, a idade, a estação, a maturidade sexual e a área geográfica da pesca. A vitamina A encontra-se concentrada nas vísceras, especialmente no fígado. A carne do pescado contém de 0 a 1800 UI de vitamina A. O conteúdo de vitamina D depende da espécie. Diferentemente das vitaminas lipossolúveis, as hidrossolúveis são mais abundantes na carne do que nas vísceras (Ordanez *et al.*, 2005).

O Rio Amazonas e seus afluentes apresentam grandes oscilações no nível da águas ao longo do ano, com amplitudes que variam de 6 a 20 metros. A disponibilidade de nutrientes nos peixes é que determina a concentração de lipídios, sendo que alguns fatores influenciam na dita disponibilidade, como a estação do ano, o local de captura, a temperatura e o ciclo reprodutivo da espécie. Desta forma, os peixes prestam respostas a estes fenômenos através de migrações periódicas, tanto por razões reprodutivas como tróficas. O ciclo hidrológico no Amazonas tem efeito marcante sobre os peixes, provavelmente exerça influência sobre a sua composição química, e sobre o seu valor nutricional (Jesus *et al.*, 2006).

Segundo Junk (1985) na região Amazônica há uma marcante sazonalidade nos níveis de umidade e gordura. Na época da cheia, os níveis de gordura são mais elevados chegando nos peixes inteiros acima de 15% e de 5% para os filés, enquanto que o teor de umidade varia entre 65% e 75%, respectivamente. O baixo teor lipídico do músculo de *Liposarcus pardalis* foi descrito por esse autor. Os pescados magros armazenam lipídios nas vísceras e não nos músculos (Huss, 1998).

Muitas outras espécies de peixes gordos encontrados na região amazônica também estão associadas à variação sazonal, numa correlação inversa com o conteúdo de umidade do músculo (Jesus, 1999).

Na tabela 2, encontra-se a composição química de algumas espécies de peixes amazônicos de acordo com estudos desenvolvidos por pesquisadores da região.

Tabela 2 – Composição química do tecido muscular de algumas espécies de peixes amazônicos.

Espécie	Umidade (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinza (%)	Referência
Tambaqui ¹	74,33	17,01	7,60	0,95	Almeida (1998)
<i>Colossoma macropomum</i>	79,42	16,74	2,66	1,18	Andrade (2006)
Matrinxã ¹	72,33	18,43	7,49	0,98	Batista (2002)
<i>Brycon cephalus</i>	74,15	16,74	5,55	0,88	Andrade (2006)
Pirarucu ² (filé – lombo)	79,8	18,3	0,2	1,7	Dias (1983)
<i>Arapaima gigas</i>	80,4	18,0	0,4	0,7	Carvalho (1998)
Acari-bodó ²	83,42	15,26	0,24	1,03	Souza et al (2003).
<i>Liposarcus pardalis</i>					
Arauanã ²	77,33	19,31	0,47	0,92	Castro (1999)
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>					
Aracu ²	73,57	20,22	3,11	0,92	Jesus (1999)
<i>Schizodon fasciatum</i>					
Branquinha ²	75,40	19,19	3,18	1,19	Jesus (1999)
<i>Potamorhina</i> sp.					
Curimatã ²	74,63	20,25	2,49	1,15	Jesus (1999)
<i>Prochilodus nigricans</i>					
Jaraqui ²	76,55	20,16	1,43	0,79	Jesus (1999)
<i>Semaprochilodus</i> sp					
Mapará ²	64,91	11,37	20,94	0,86	Jesus (1999)
<i>Hypophthalmus edentatus</i>					
Pacu ²	74,56	18,41	2,97	1,14	Jesus (1999)
<i>Metynnis hypsauchen</i>					
Pirapitinga ²	74,68	20,03	2,11	1,17	Jesus (1999)
<i>Piaractus brachypomum</i>					
Piarmutaba ²	79,4	18,4	1,3	0,8	Filgueiras (2002)
<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>					

Fonte: Jesus, 1999.

1- procedente de piscicultura; 2- procedente dos rios Amazônicos.

Carvalho (2003) analisou a composição química de duas espécies amazônicas durante os meses de maio e setembro: o jaraqui (*Semaprochilodus* sp) e o aracu (*Shizodon fasciatum*) e observou que a quantidade de gordura encontra-se principalmente na cavidade abdominal sendo mais elevado no mês

de maio e menor em setembro nas duas espécies. O conteúdo de proteínas nas duas espécies variou entre 18% e 20%.

Moroni (2005) verificou em estudos realizados com o acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) que houve variação na composição química desse animal entre os períodos de seca e cheia. Os teores de umidade e proteína foram, respectivamente, maiores nos meses de março (seca) e agosto (cheia). Essas diferenças são reflexos da condição biológica *antemortem* do animal. Souza *et al.* (2003) também chegou a essa mesma conclusão.

As espécies aracú (*Schizodon fasciatum*), branquinha (*Potamorhina latior*) e curimatã (*Prochilodus nigricans*) foram analisadas por Jesus *et al.* (2006) quanto ao teor de lipídios que encontraram os valores de 3,11%, 3,18% e 2,49%, respectivamente. Esses valores, segundo os autores, refletem a situação em uma determinada época do ano. Eles ainda mencionam que para a inclusão dessas espécies amazônicas na tabela de composição de alimentos deve-se considerar o efeito da sazonalidade sobre os teores de umidade e de lipídios totais determinados durante todos os meses do ano.

3.3.2 – Microbiologia de Pescado

O pescado é um dos alimentos mais perecíveis e, por isso, necessita de cuidados adequados desde a sua captura até chegar ao consumidor ou à indústria. A maneira de manipular o pescado nesse intervalo de tempo determina a intensidade com que se apresentam as alterações, que obedecem a três causas: enzimática, oxidativa e bacteriana (Ferreira, 1994).

A autólise é o processo de degradação das proteínas e gorduras devido à ação das proteases e lipases tissulares, respectivamente. Mas é certo que a autólise produz alterações profundas nos tecidos que modificam a consistência da carne. A proteólise e a lipólise, por sua vez, criam um meio favorável aos microrganismos, facilitando, conseqüentemente a alteração e ao acúmulo de ácidos graxos livres (Ordanez *et al.*, 2005).

As reações enzimáticas que ocorrem nos tecidos dos pescados após a sua morte produzem várias substâncias nitrogenadas não-protéicas

(aminoácidos livres, creatina, uréia e óxido de trimetilamina), que serão utilizadas pelas bactérias (Franco e Landgraf, 2004; Jay, 1996; Frazier e Westhoff, 1993).

O peixe como qualquer outro alimento, tem sua microbiota própria e sofrerá alterações, dependendo de alguns fatores externos, tais como a contaminação de seu habitat, seja ele estuário, lacustre ou marinho, através de esgotos e cursos de água poluída. Algumas bactérias são típicas de ambientes de água doce e outras de água salgada (Vieira *et al.*, 2004; Franco e Landgraf, 2004; Jay, 1996; Frazier e Westhoff, 1993).

Logo após ser capturado o pescado sofre uma série de modificações bioquímicas, as quais poderão favorecer o crescimento e a multiplicação das bactérias, naturalmente presentes na sua microbiota. Se forem acrescidos a essas modificações fatores externos tais como: captura do pescado em águas poluídas, falta de condições ideais de refrigeração, manuseio e transporte, menor será o tempo de conservação do pescado (Vieira *et al.*, 2004; Ferreira, 1994).

A composição química do pescado também influencia o desenvolvimento microbiano. Verifica-se, neste alimento, o desenvolvimento de microrganismos capazes de utilizar substâncias nitrogenadas, protéicas ou não (Franco e Landgraf, 2004; Jay, 1996; Frazier e Westhoff, 1993).

A contaminação da carne do pescado ocorre principalmente por bactérias do intestino, das brânquias ou da pele. Ao iniciar a autólise, criam-se condições ótimas para o crescimento de microrganismos, o que, por sua vez, acentua a proteólise e a lipólise. O processo e a natureza da decomposição bacteriana dependem da composição da microflora, da oxidação aeróbia ou de processos de redução anaeróbia. Os principais produtos finais de decomposição bacteriana são: substâncias inorgânicas, hidrogênio, CO₂, amoníaco, compostos sulfurados, H₂S e mercaptanos; ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, valérico, láctico, succínico), ácidos aromáticos (benzóico, fenil proiônico e seus sais amoniacais), bases orgânicas, incluindo as mais simples monoaminas (metilamina, dimetilamina e trimetilamina), monoaminas cíclicas (histaminas e feniletilamina) e diaminas (putrescina e cadaverina). As principais alterações nos compostos não-protéicos são a

redução do óxido de trimetilamina (TMAO) a trimetilamina (TMA), a descarboxilação de histidina dando histamina e a decomposição da uréia com liberação de amoníaco (Ordanez *et al.*, 2005).

As bactérias também decompõem a gordura, acarretando hidrólise de triglicerídios e oxidação de gorduras, formando peróxidos, aldeídos, cetonas e ácidos graxos de cadeia curta. Esses processos são mais lentos do que a decomposição das substâncias nitrogenadas, principal causa de alteração durante o armazenamento (Franco e Landgraf, 2004; Aldrigue *et al.*, 2002).

A maioria dos estudos assinala que as bactérias bacilares Gram-negativo dos gêneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Vibrio* são os tipos predominantes e representam 80% da microbiota do pescado. Em pescado procedente de zonas tropicais e subtropicais, pode haver predomínio de gênero Gram-positivo, como *Bacillus*, *Micrococcus* e corineformes. Situação similar ocorre com os peixes de água doce, nos quais predominam os Gram-positivos nas espécies de água quente e os Gram-negativos nas de água fria. Ordanez *et al.* (2005) afirmam que depois dos artigos de Shewan (1971), no qual se revisa a bibliografia sobre a microbiologia do pescado desde 1930, e de Stenstrom e Molin (1990), em que se apresentam os resultados da alteração do pescado de numerosas espécies, fica evidente que durante o armazenamento, *Pseudomonas* e *Shewanella putrefaciens* assumem rapidamente posição dominante, sendo os dois gêneros responsáveis, portanto, pela alteração do pescado em condições de anaerobiose.

As *Pseudomonas* que chegam a ser dominante incluem grande número de diferentes tipos que compartilham características comuns. Todas crescem rapidamente à temperatura de refrigeração e, para seu crescimento, utilizam com rapidez e eficiência grande variedade de compostos de baixo peso molecular presentes nos fluidos tissulares do pescado. Os compostos sulfurados são talvez os mais importantes como componentes do odor alterado, sendo gerados pela atividade de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* e *S. putrefaciens* (Franco e Landgraf, 2004; Aldrigue *et al.*, 2002; Jay, 1996; Frazier e Westhoff, 1993).

As principais bactérias pertencentes ao grupo de coliformes totais são dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais - *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* e *Shigella*. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (Vieira *et al.*, 2004; Aldrigue *et al.*, 2002).

As bactérias pertencentes ao grupo de bactérias termotolerantes correspondem aos coliformes totais que apresentam capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 45°C. A pesquisa de coliformes termotolerantes nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (Franco e Landgraf, 2004).

Escherichia coli, é a principal bactéria representante do grupo dos coliformes termotolerantes. É considerada a indicadora mais específica de contaminação fecal recente e da eventual presença de organismos patogênicos (Brasil, 2004).

A principal causa de doenças diarréicas é a ingestão de alimentos e/ou água contaminadas por microrganismos patogênicos. Um dos agentes etiológicos das infecções entéricas é a bactéria *Escherichia coli* que, presente em águas ou alimentos, indica uma contaminação de origem fecal e um possível risco a saúde (Vieira *et al.*, 2004; Franco e Landgraf, 2004; Aldrigue *et al.*, 2002).

Contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas condições sensoriais do alimento, um número elevado de microrganismos indica que o alimento é insalubre. Exceção deve ser feita aos alimentos fermentados (Jay, 1996; Frazier e Westhoff, 1993).

O método da Contagem Padrão em Placas (CPP) estima o número de células viáveis contido num alimento qualquer e baseia-se na premissa de que cada célula viável, isolada, homogeneizada em meio sólido (ágar) dará origem a uma colônia, uma vez que é teoria biológica que uma colônia provém de uma única célula microbiana. Em função de tais suposições não serem aplicadas às espécies que se desenvolvem em cachos ou cadeias (estafilococos, estreptococos, etc.), os resultados das contagens são expressas como “Unidades Formadoras de Colônias” por mililitro ou grama (UFC/mL ou g) do produto analisado (Vieira *et al.*, 2004).

Os bolores são fungos com estrutura filamentosa. O conjunto de filamentos (hifas) forma o micélio. As leveduras são fungos unicelulares, de forma esférica, ovóide, cilíndrica ou triangular. Algumas leveduras são alongadas, formando um filamento semelhante aos dos bolores, podendo inclusive formar micélio verdadeiro. Essas leveduras, que formam pseudomicélios ou micélios verdadeiros, constituem uma fase de transição entre as leveduras unicelulares e os fungos filamentosos. Bolores e leveduras são aeróbios, por isso desenvolvem-se na superfície dos alimentos (Vieira *et al.*, 2004).

O crescimento de bolores e leveduras é mais lento do que bactérias em alimentos de baixa acidez e de alta atividade de água. Em alimentos ácidos e de baixa atividade de água, no entanto, o crescimento de fungos é maior, provocando deterioração com grande prejuízo econômico em frutas frescas, vegetais e cereais (Jay, 1996; Frazier e Westhoff, 1993).

De acordo com Franco e Landgraf (2004):

Lactococcus – contém algumas espécies que anteriormente pertenciam aos gêneros *Streptococcus* (grupo sorológico N de Lancefield) e *Lactobacillus*. Crescem a 10°C mas não a 45°C. O principal produto de fermentação é o ácido L-láctico. As espécies reconhecidas são: *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* (anteriormente *Streptococcus lactis* subespécies *lactis*), *Lactococcus lactis* subespécies *cremoris* (anteriormente *Streptococcus cremoris* subespécie *cremoris*), *L. lactis* subespécie *hordinae* (anteriormente *Lactobacillus hordinae*), *L. lactis* subespécie *diacetylactis* (anteriormente *S. lactis* subespécie

diacetylactis), *L. garviae* (anteriormente *S. garviae*), *L. plantarum* (anteriormente *S. plantarum*) e *L. raffinolactis* (anteriormente *S. raffinolactis*).

Lactobacillus - são bacilos Gram-positivos e catalase negativa. Os *Lactobacillus* são microaerófilos existindo, no entanto, cepas anaeróbias, principalmente em cepas humanas e rúmen. Ocorrem na maioria dos vegetais juntamente com outras bactérias lácticas e também em laticínios.

Esse gênero apresenta espécies homoláticas e heteroláticas. São importantes em alimentos porque:

- apresentam capacidade de fermentar açúcares com produção de quantidade considerável de ácido láctico;

- são produtores de gás e outros produtos voláteis (espécies heterofermentadoras) podendo provocar a deterioração de alimentos. - a maioria é termodúrica, sobrevivendo à pasteurização e outros processamentos térmicos, podendo causar a deterioração nos alimentos submetidos a esses processos, como acontece com o coalho do queijo suíço ou queijos similares;

- são ainda úteis na determinação de vitaminas em alimentos uma vez que são incapazes de sintetizá-las. Apresentam grande dificuldade para se desenvolver em alimentos com baixo teor vitamínico.

Vários autores afirmam que a maioria dos produtos elaborados a partir de pescado fermentado não oferece riscos quando adequadamente preparados. A contaminação deste produto pode ser proveniente do próprio pescado ou como conseqüência de sua manipulação. Os primeiros podem constituir um risco limitado, *Clostridium botulinum* sempre que prevalecer condições de anaerobiose no produto e de *Vibrio parahaemolyticus* para o pescado de origem marinha.

Nos hidrolisados biológicos os coliformes, salmonelas, estafilococos coagulase positivo e os esporos do *Clostridium botulinum* são destruídos pela acidez láctica. Os hidrolisados de pescado não possuem maiores riscos de contaminação microbiana que outros alimentos e que disso depende o estado higiênico sanitário das matérias-primas empregadas e da manipulação adequada durante o processo de elaboração (Borghesi, 2004; Tomé, 1993; Oetterer, 1991; Lindgren e Pleje, 1983).

3.3.3 – Métodos de controle de qualidade do pescado

3.3.3.1 – Análise microbiológica

Entre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, os mais importantes são, sem dúvida, aqueles que definem as suas características microbiológicas. A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e quanto ao risco à saúde da população (Franco e Landgraf, 2004).

Os critérios de avaliação estabelecidos pela análise microbiológica são estabelecidos pela legislação de cada país, e, em nível internacional, por um programa conjunto FAO/WHO, da Organização das Nações Unidas (Joint FAO/WHO Food Standards Program), através da Comissão do Codex Alimentarius (Franco e Landgraf, 2004).

No Brasil, a Resolução RDC n° 12 de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, define os critérios e padrões microbiológicos para alimentos expostos à venda e a exportação. As bactérias sobre as quais a Legislação estabelece limites quase sempre não alteram a aparência do pescado, pois a razão de suas limitações decorre destas serem patógenas ao homem e não deterioradoras do produto. Sabe-se que as salmonelas e as escherichias são redutoras de OTMA, mas as primeiras, em pequeno número, já são capazes de causar danos aos que consumirem um pescado em que elas estejam presentes, bem antes de causarem cheiros amoniacais no produto, razão por que se investiga apenas sua presença, ou ausência, em 25g de qualquer alimento. Entre os coliformes termotolerantes, mesmo não explicitados na Legislação vigente (somente no item 5.9.1), *Escherichia coli* figura em maiores quantidades de qualquer representante do grupo, quando testado a 45°C (Brasil, 2001).

Os microrganismos oferecem diferentes graus de risco ao produtor e ao consumidor. Segundo esse comportamento, o ICMSF (1983) os classifica em categorias diferentes, a saber:

- microrganismos sem risco direto à saúde: neste grupo estão incluídos aqueles de importância limitada quanto à sua capacidade de causar alterações no alimento, sem serem patogênicos. É o caso dos fungos e das bactérias aeróbias mesófilas;

- microrganismos que oferecem um risco indireto à saúde do consumidor: neste grupo incluem-se os que dão indicações higiênico-sanitárias do produto (microrganismos indicadores). Sem serem patogênicos eles podem indicar a possível presença de outros microrganismos prejudiciais à saúde, como *Salmonella*, *Staphylococcus* e muitos outros. Além disso, muitos deles podem causar alterações nas características originais dos alimentos;

- microrganismos que oferecem risco direto à saúde do consumidor: incluídos todos os patogênicos de interesse em alimentos. Dependendo da gravidade da patologia que provocam e do tamanho dos surtos que são capazes de causar, são classificados em três grupos:

1 – risco direto, moderado e difusão limitada: microrganismos potencialmente patogênicos que causam doenças relativamente brandas. Normalmente, esses são inicialmente transmitidos por um único alimento, mas contaminações cruzadas podem causar sua transferência para outros alimentos. Nesse grupo estão: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* tipo A, *Coxiella burnetti*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e o nematóide *Trichinella spiralis*;

2 – risco direto, moderado e difusão extensa: microrganismos potencialmente patogênicos, mas que causam doenças mais graves que a do grupo anterior, e em doses infectantes mais baixas. São capazes de se difundir pelos alimentos com mais facilidade. Pertencem a esse grupo: *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* patogênica, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus* e estreptococos beta-hemolíticos;

3 – risco direto e grave: microrganismos altamente patogênicos, que não devem estar presentes em nenhum alimento. Pertencem a esse grupo: *Clostridium botulinum*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A e B, *Salmonella* Choleraesuis, *Shigella dysenteriae* tipo I, *Vibrio cholerae*, *Brucella melitensis*, *Clostridium perfringens* tipo C e vírus da hepatite infecciosa.

3.3.3.2 – Análise sensorial

A análise sensorial foi definida, em 1975, pela Divisão de Análise Sensorial do Instituto de Tecnologia de Alimentos dos EUA como disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações àquelas características dos alimentos e materiais quando são percebidos pelos órgãos dos sentidos: visão, olfato, gosto, tato e audição. Essas reações dependem não só da classe e intensidade do estímulo, mas também das condições fisiológicas, psicológicas e sociológicas da pessoa ou grupo de pessoas que avaliam. As condições psicológicas e físicas do avaliador são muito importantes para a obtenção de resultados confiáveis (Mori, 1988).

A análise sensorial baseia-se, portanto, no emprego de um grupo ou equipe de pessoas treinadas para medir as características sensoriais de um produto.

Os testes sensoriais classificam-se em testes afetivos, discriminatórios, descritivos e de qualidade. Nos testes afetivos, normalmente comparativos, o consumidor ou provador é instado a indicar sua preferência ou aceitação do produto. Em laboratório a equipe é composta de 25 a 50 pessoas e, na população esse número é entre 75 a 200 pessoas. Em testes discriminatórios, há treinamento da equipe para discriminar as características sensoriais de amostra, desse modo não é utilizado ao nível de consumidor. Os testes descritivos servem para avaliar características quanto à aparência, o aroma, o sabor, a textura, quantificando por pontos cada um desses atributos, a equipe de provadores pode ser composta de 6 a 12 julgadores. Os testes de qualidade são empregados na comparação da amostra teste e do padrão. É uma combinação entre testes afetivos e descritivos e a equipe pode ser composta de 3 a 6 provadores (Chaves, 1998; Teixeira *et al.* 1987).

O processo de deterioração do pescado relacionado à qualidade sensorial é consequência de mudanças físico-químicas as quais são percebidas como perda de frescor (Hanna 1995; Sigurgisladottir *et al.* 1994).

Ferreira e Lessi (2008) realizaram análises microbiológicas de acordo com ICMSF (1983) e sensorial conforme Torry Research Station (1953) em branquinha (*Potamorhina latior*) e jaraqui (*Semaprochilodus spp*), constataram

que o jaraqui apresentou o melhor resultado quanto à análise sensorial, classe A e a branquinha classe B. Mesmo a análise sensorial tendo classificado o peixe em excelente e aceitável, os altos valores encontrados na análise microbiológica indicam ser este alimento manipulado em condições inadequadas de higiene.

A qualidade sensorial do hidrolisado se baseia no aroma, cor, consistência e eventualmente no sabor (Tabela 3). O aroma é o indicador primordial da qualidade do hidrolisado e do pescado fermentado em geral. Uma parte do aroma surge durante o processo de fermentação que segundo o processo estará constituído de aminas voláteis principalmente TMA (pescado marinho) e ácidos graxos voláteis. Quando se utilizam elasmobrânquios (peixes cartilagosos) como substrato ou em certos processos o NH₃ pode ser dominante.

Tabela 3- Qualidade sensorial de hidrolisado de pescado.

Características	Boa	Regular	Impróprio
Odor (aroma)	Ácido, suave	Picante	Pútrido
Cor *	Marrom, marrom claro	Amarronzado ou marrom escuro	Preto
Consistência	Líquido pastoso ou líquido	Líquido pastoso ou líquido	Pastoso
Sabor *	Ácido suave	Picante e muito amargo	Não recomendável

Fonte: Bertullo, 1989.

* Pode variar de acordo com a técnica de elaboração.

3.3.4 – Tecnologia de Pescado

A ciência dos alimentos inclui o estudo das características físicas e químicas dos alimentos, enquanto que a tecnologia de alimentos inclui a seqüência de operações desde a seleção da matéria-prima até o processamento, preservação e distribuição (Gava, 2007).

A inovação tecnológica na industrialização de alimentos visa obter novos conceitos, definições e parâmetros para serem desenvolvidos novos métodos e técnicas destinadas à obtenção de produtos e processos. Assim, toda inovação tecnológica, contém três etapas principais: a pesquisa básica orientada; desenvolvimento do processo/produto e a introdução desses no sistema produtivo (Jung, 2004; Souza, 1997).

A pesquisa básica orientada visa entender e controlar as mudanças fisiológicas e bioquímicas no alimento com o objetivo de manter suas qualidades originais por um maior período de tempo. O desenvolvimento do processo/produto visa melhorar o alimento e seu consumo continuamente como, por exemplo, aumentar a solubilidade de uma sopa instantânea, redesenhar embalagens para torná-las mais atrativas ou diminuir a quantidade calórica de alimentos. Mudanças fundamentais para processos produtivos são aquelas que “pulam” etapas, economizando tempo e dinheiro, como por exemplo, os produtos de congelamento rápido. A introdução de novos produtos no sistema produtivo envolve a pesquisa de mercado e a elaboração do plano de negócios, definindo o preço e o posicionamento estratégico, o local de comercialização, como o produto será divulgado e qual o canal de distribuição a ser escolhido (Arthur, 1990).

Embora os recursos pesqueiros tenham diferentes usos, tais como os recreativos e os medicinais são mais comuns e com grande diferença à sua utilização como fonte de alimento. A proporção e a produção mundial de pescado utilizada para o consumo humano direto aumentou durante a década de 1990, de 71% em 1990, para 79% em 1998. O consumo total de alimentos disponíveis procedentes da pesca é de 16 Kg/ano/habitante. O consumo *per capita* de peixe na década de 1950 era de 7 Kg/ano/habitante. Essa produção se manteve em um ritmo igual ou superior ao crescimento demográfico. No entanto, é necessário contemplar esses dados com cuidado já que não representa o consumo individual (FAO, 2008a).

Após a captura o pescado deve ser manuseado e transportado em condições de higiene e conservação adequadas para garantir uma qualidade e inocuidade apropriada. Manter o valor nutricional do pescado, conservar as

vantagens de sua rica composição e evitar os custos e efeitos das enfermidades que transmite são aspectos de grande importância (FAO, 2008a).

São vários os métodos utilizados para a conservação do pescado. Alguns empregam técnicas baseadas no controle de temperatura, através do gelo, refrigeração ou congelamento, outros se baseiam no controle da atividade de água que compreende a secagem, salga, defumação e liofilização. Também se podem empregar técnicas baseadas na redução de óxidos como a embalagem a vácuo. Normalmente se recorre a uma combinação de diferentes técnicas para a conservação do pescado. Por último as operações de elaboração do pescado compreendem técnicas adequadas para a gestão de resíduos (FAO, 2008b).

O processamento do pescado compreende em primeiro lugar a aplicação de técnicas para conservar a sua qualidade e aumentar sua vida de armazenamento e em segundo lugar também se pode agregar valores para gerar uma ampla variedade de produtos. A primeira e mais óbvia técnica de manejo para conservar a qualidade de pescado consiste em mantê-lo com vida tanto quanto possível antes de cozinhá-lo e consumi-lo. Assim se tem feito na China, no caso da carpa, durante milênios através de técnicas muito antigas. Atualmente são muitas as espécies que se mantêm vivas para conservar a sua qualidade antes do consumo (FAO, 2008b).

O acari-bodó, *Liposarcus pardalis* (Castelnau, 1855) possui um enorme potencial para o desenvolvimento tecnológico no seu processamento e utilização. Este pescado é comercializado vivo dentro das embarcações com o porão parcialmente inundado (Castro, 1999; Brito, 1981).

3.3.4.1 – Hidrolisado de pescado

3.3.4.1.1- Definição e tipos de hidrolisados

Bertullo (1989) apresenta nomenclaturas de ensilados de pescado de acordo com diversos autores, onde define hidrolisado biológico como sendo o produto obtido devido à ação de microrganismos proteolíticos ou enzimas (Tabela 4).

Tabela 4- Nomenclaturas de Ensilados de Pescado.

DENOMINAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	AUTOR
Ensilados	Ação enzimática ou por agregação de um fermento microbiano sobre substrato de melaço.	EDIH, H., 1940; BERTULLO, V. H., 1953
Ensilados	Ação enzimática natural controlada por redução de pH ao se agregar ácidos orgânicos ou inorgânicos	PETERSEN, H., 1943; TATTERSON & WINDSOR, 1974; WINSOR & BARLOW, 1981.
Ensilados Ácidos	Ação enzimática natural controlada pela redução de pH ao se agregar ácidos orgânicos ou inorgânicos.	PETERSEN, H., 1943; TATTERSON & WINDSOR, 1974; WINSOR & BARLOW, 1981.
Ensilados Biológicos	Ação de enzimas exógenas de origem animal, vegetal ou microbiana.	QUEE, L., 1973
Hidrolisados Químicos	Ação restrita de ácidos ou substâncias alcalinas.	SAINGLIVIER, M., 1985.
Hidrolisados Biológicos	Ação de microrganismos proteolíticos ou enzimas	BERTULLO, V. H., 1970.
Hidrolisados Mistos	Ação enzimática natural controlada por redução de pH ao se agregar ácidos orgânicos ou inorgânicos.	SAINGLIVIER, M., 1985
Autolisados	Ação de enzimas tissulares ou digestivas do pescado	SAINGLIVIER, M., 1985
Heterolisados	Ação de microrganismos proteolíticos ou enzimas	SAINGLIVIER, M., 1985

Fonte: Bertullo, 1989.

Segundo Sanclivier (1985) apud por Bertullo (1989), os hidrolisados ou proteínas líquidas de pescado se caracterizam por uma degradação de material protéico original do produto de pesca ao estado de peptídeos, oligopeptídeos e aminoácidos em maior ou menor grau segundo a técnica empregada para sua elaboração.

Quando se obtém a hidrólise por enzimas tissulares ou digestivas do pescado, dito autor os designa como autolisados do pescado, quando se produzem por enzimas exógenas de origem animais, vegetais ou microbianos são designados heterolisados. Os hidrolisados químicos são produzidos pela ação estrita de ácidos ou substâncias alcalinas. Os hidrolisados mistos compreendem uma ação enzimática natural e pela adição de ácidos orgânicos ou inorgânicos.

Outro tipo de hidrolisado misto são os obtidos por fermentação os quais são conhecidos como ensilados biológicos, hidrolisados biológicos, ensilados

fermentados ou pescado fermentado. Nesse tipo de hidrolisado se observa que há diminuição do pH devido à presença de ácido láctico e eventualmente outros ácidos orgânicos produzidos por fermentos lácticos endógenos (próprio do pescado) ou de cultivos microbianos exógenos puros ou mistos (Bertullo, 1989).

O método de preservação de alimentos por diminuição de pH foi utilizado pela primeira vez por Virtanen em 1920 (citado por Disney e Hoffman, 1978) empregando ácido sulfúrico. Mais tarde, Petersen em 1953, elaborou um hidrolisado de pescado por fermentação bacteriana sugerindo deste modo, o hidrolisado biológico de pescado que consiste basicamente na mistura ao pescado de uma fonte de carboidrato e cultivos microbianos ácido-láctico, que produz um ácido requerido para a preservação do produto (Tomé, 1993).

Hidrolisado Biológico de Pescado

A fermentação é um dos métodos mais antigos e importantes que se conhece para a elaboração de alimentos. Este processo envolve transformações químicas complexas das substâncias orgânicas mediante a ação catalítica de enzimas próprias dos alimentos ou produzidas por diversos microrganismos (Han-Ching *et al.*, 1995).

O uso direto de células microbianas na hidrólise de proteínas parece conferir características desejáveis ao produto, como uma superior funcionalidade da proteína, além da ausência do gosto amargo, favorecendo a incorporação do produto em formulações alimentares (Diniz e Martin, 1999).

O hidrolisado microbiano é um produto final de um processo de fermentação controlada no qual os carboidratos adicionados ao pescado inteiro, músculo (filé) ou resto deles são fermentados por bactérias ácido láctico (Van Wyk e Heydenrych, 1985). Estes microrganismos podem estar presentes naturalmente na matéria-prima ou em outros casos requer cultivos iniciadores puros (Kompiang *et al.*, 1980). O ácido produzido favorece a ação das mesmas e inibe o desenvolvimento de bactérias putrefativas e patogênicas. Durante o processo de fermentação se observa uma mudança rápida em sua composição

bacteriológica com domínio das bactérias ácido láctico e inibição da flora competitiva da matéria-prima (Lindgren e Pleje, 1983).

Tem-se empregado metodologia de elaboração de hidrolisado de pescado misturando-se fontes de carboidratos de baixo valor comercial (melaço, vegetais e frutas) e o aproveitamento das enzimas do próprio pescado ou com adição de microrganismos proteolíticos. É certo que com o decréscimo de pH durante a fermentação há também uma diminuição dos carboidratos fermentecíveis. A conservação se complementa com a formação de substâncias bacteriostáticas e bactericidas produzidas pelas bactérias ácido láctico (Tomé, 1993).

A adição de açúcares contribui para a conservação do produto durante as etapas iniciais do processo de fermentação já que inibe a ação de enzimas que liberam amônia dos aminoácidos e das bactérias deteriorantes (Raa e Gildberg, 1982). Uma quantidade relativamente alta de carboidratos deve ser adicionada ao pescado para assegurar a conservação adequada do produto.

Durante o processo de fermentação do hidrolisado de pescado, as proteínas são fragmentadas devido à ação das enzimas em peptídios de baixo peso molecular e em aminoácidos livres, o qual se manifesta por um aumento da liquefação do produto.

As enzimas das vísceras e do trato digestivo (tripsina, quimotripsina e pepsina) são as mais ativas na degradação das proteínas e liquefação do pescado, particularmente em pH neutro. A pepsina é encontrada no estômago do peixe sendo a principal enzima do suco gástrico. A tripsina está presente no ceco pilórico. Estas enzimas apresentam variações em sua atividade e estabilidade nas diferentes espécies de pescado (Tarr e Deas, 1949; Doshiro, 1968; Shenderyuk e Shumarova apud Mackie et al., 1971).

As catepsinas contidas no lisossoma celular são as endoenzimas musculares de maior atividade proteolítica tanto em condições ácidas como alcalinas variando seu nível de atividade e dos subtipos presentes segundo as espécies. A ação ótima das catepsinas se verifica em pH neutro ou de preferência em pH ácido e portanto seu papel é secundário quando o processo de fermentação se realiza fora desse intervalo (Bertullo, 1989).

Bello (1994) menciona que as vantagens do hidrolisado biológico de pescado em seu país são: a) sua simples manipulação, sem os perigos e riscos apresentados pelo hidrolisado químico; b) seus custos são reduzidos porque não tem necessidade de importar o ácido orgânico; c) a possibilidade de adicionar diversas cepas de bactérias ácido lácticas; d) o uso de carboidratos é facilmente obtido; e) o tempo de processo é reduzido; f) é um produto incluindo sabor e odor, mais atrativo, agradável e apetitoso.

A deterioração do hidrolisado biológico de pescado é causada principalmente pela atividade das leveduras que são relativamente insensíveis à atividade antimicrobiana do ácido láctico.

De acordo com Bertullo (1989) os grupos bacterianos utilizados na obtenção de hidrolisados biológicos de pescado são principalmente *Lactobacillus plantarum* (Kreuzer, 1952; Prolux, 1961; James, 1975; Bello, 1988), *Streptococcus lactis* (Krishnadwamy, 1965), bolores e leveduras proteolíticas: *Aspergillus oryzae* (Takei, 1955; Tanikawa, 1950); *Aspergillus flavus* (Jeffries, 1965); *Saccharomyces platensis* (Bertullo e Pérez, 1959), *Cândida* lipolítica (Roels, 1969) e *Hansenula montevideo* (Bertullo, 1970).

Do ponto de vista prático é essencial que os microrganismos utilizados na preparação de hidrolisados biológicos sejam de fácil manipulação e de resistência a contaminações. Baixas doses de inóculo são suficientes para que o processo ocorra e geralmente são mais baratos.

A preparação de hidrolisados protéicos destinados ao consumo humano exige cuidados redobrados, tanto na questão higiênica, quanto nas suas propriedades funcionais. Recomenda-se que o hidrolisado de pescado seja obtido a partir de músculo de pescado assepticamente isolado e em bom estado de conservação (Gurgel, 1995).

Hidrolisado Enzimático de Pescado

O método de hidrólise enzimática é baseado na adição de enzimas para a clivagem de proteínas. É utilizado para modificar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais da proteína, sem prejudicar seu valor nutricional (Holanda, 2004).

A hidrólise enzimática de pescado objetiva recuperar as proteínas de espécies subutilizadas ou de resíduos de processamento que seriam desperdiçados através do emprego de enzimas proteolíticas para solubilização da proteína do pescado, resultando em duas frações: solúvel e insolúvel (Furlan e Oetterer, 2002).

A hidrólise caracteriza-se pela quebra da maioria das proteínas através de enzimas proteolíticas, resultando numa mistura contendo proteínas, peptídios e aminoácidos, cujas propriedades funcionais são melhoradas e sua absorção pelo organismo é mais acentuada (Gurgel, 1995).

A escolha das enzimas proteolíticas é um fator importante, por causa da natureza da enzima, a qual é relacionada com sua ação específica sobre a proteína, influenciando, assim, a composição dos produtos de digestão (Marable e Sarizone, 1989).

A ação proteolítica no processo hidrolítico é acelerada pela adição de enzimas à matéria-prima, com controle de pH, da temperatura e de outras variáveis. As enzimas mais comumente empregadas nesse processo são a papaína, a pancreatina e a bromelina (Furlan e Oetterer, 2002).

As enzimas proteolíticas hidrolisam a cadeia de aminoácidos, geralmente em um certo ponto, dependendo da especificidade ou natureza da enzima. Inicialmente as moléculas das enzimas se associam com as ligações peptídicas, logo em seguida elas se quebram e liberam peptídios e aminoácidos simples. As enzimas proteolíticas podem ser divididas em dois grupos, o exo e o endopeptidase. O primeiro se refere as que se unem aos aminoácidos terminais da cadeia, como também as aminas e carboxilas finais, enquanto que, a segunda hidrolisa as ligações peptídicas dentro do sítio específico da molécula (Mackie, 1982 *apud* Gurgel, 1995).

Segundo Verreschi (2005), existem desvantagens do uso de enzimas proteolíticas em hidrólise protéica: a maioria das proteases não é suficientemente estável ou ativa sob condições adversas de pH, temperatura, e concentração de substrato; as proteases não são normalmente reutilizadas devido à dificuldade de sua separação, após o uso, dos substratos e dos produtos quando está solúvel.

A hidrólise enzimática das proteínas dos alimentos geralmente resulta em variações nas suas propriedades funcionais. Essas modificações são freqüentemente requeridas para produzir melhores propriedades funcionais, as quais aumentam a incorporação da proteína na formulação dos alimentos. Contudo, a degradação extensiva das cadeias peptídicas causa a formação de peptídios amargos, produzindo um hidrolisado inaceitável para o uso como suplemento alimentar ou ingrediente. No entanto, Ricks *et al.* (1978) afirmaram que o gosto amargo de hidrolisados não depende somente da composição dos aminoácidos do substrato, mas também da especificação do agente proteolítico.

Os sabores amargos são características comuns de hidrolisados de proteína produzidos enzimaticamente. Esse sabor depende do grau de hidrólise e da especificidade da protease, ou seja, do tamanho dos peptídios gerados e da intensidade da quebra das ligações. Acredita-se também ser devido aos peptídios de baixo peso molecular e da exposição de aminoácidos hidrofóbicos ao ambiente aquoso, pois o peso molecular dos peptídios é tal que eles não podem se esconder dentro da molécula protéica, o que ocorreria normalmente na proteína intacta (Hall e Ahmad, 1992 *apud* Furlan e Oetterer, 2002) . O amargor pode ser reduzido, mas não eliminado, através do controle do grau de hidrólise, uma vez que o tempo de hidrólise determinará o tamanho do peptídio (Mackie *et al.*, 1982).

Hidrolisado Químico (ácido) de Pescado

Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, a elaboração de hidrolisado ácido de pescado, é uma alternativa econômica para o aproveitamento do subproduto da pesca. Sua produção é viável tanto artesanal quanto industrialmente, onde, as distâncias, custos de transporte e de armazenagem, sugerem o aproveitamento local do subproduto da pesca antes de sua deterioração (Carneiro, 1991).

Segundo Raa e Gildberg (1982), pode-se citar a silagem de peixe como sendo um hidrolisado protéico líquido feito a partir de resíduos de

processamento de peixes ou de peixes pelágicos sob condições ácidas. O material *in natura* é acidificado com um ácido orgânico ou inorgânico. O que provoca a liquefação da biomassa.

O uso de ácido fórmico auxilia a mistura de ácido sulfúrico e clorídrico, porque promove a diminuição do pH a níveis entre 4,0 e 4,5, enquanto que o uso de ácidos minerais sozinho baixa o pH para cerca de 2,0, necessitando porém de uma neutralização posterior à hidrólise (Wignall e Tatterson, 1977).

Canonizado (1980) citou que o hidrolisado de pescado é um suplemento protéico para adicionar na alimentação animal. Este produto líquido é preservado com o uso de ácidos. O ácido provoca a quebra da proteína em pequenas unidades solúveis tornando o produto numa forma semi-líquida, e produz condições desfavoráveis ao crescimento de bactérias. Enzimas proteolíticas presentes no próprio músculo do pescado, contribuem para a hidrólise por quebra dos peptídios que não são hidrolisados pela ação do ácido e subseqüentemente, a liquefação do produto é alcançada.

A hidrólise ácida, com emprego de ácido clorídrico é praticada industrialmente por meio do emprego de proteínas de origem vegetal, e é preferida devido ao seu custo relativamente reduzido, à rapidez e à produção de sabor agradável (Furlán e Oetterer, 2002). Apesar da importância da hidrólise ácida na produção de aromas cárneos, a produção de glicerol cloridrinas, especialmente a 3-cloro-1,2 propanediol e a 1,3-dicloro-2-propanol, torna-se um problema quando essa metodologia é utilizada, visto que esses compostos estão sendo associados à infertilidade masculina e a mutações em bactérias (Velizek, 1991).

3.3.4.1.2 – Aplicações de hidrolisado protéico de pescado

Os hidrolisados protéicos têm sido utilizados desde 1940 com finalidades médicas na preparação de dietas especiais para alimentação enteral de bebês e para manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Na década de 70 assistiu-se um expressivo crescimento nos métodos de preparação e uso de hidrolisados

protéicos, tanto com finalidades clínica e nutricional como para a melhoria de propriedades funcionais de proteínas de base protéica (Clemente, 2000).

Esses produtos são geralmente utilizados para modificar propriedades funcionais de alimentos e em alimentos dietéticos, como fonte de pequenos peptídios e aminoácidos (Venugopal, 1994).

Dessa forma observa-se que os hidrolisados podem ser utilizados tanto na alimentação humana (suplementos protéicos, dietas especiais, substituto de proteínas de ovos, etc.) e animal como para nutrientes em cultivo de microrganismos. Assim como se poderiam aproveitar como provedores de aminoácidos na síntese de plasteínas (Martone *et al.*, 2003).

Como produto para consumo humano, serve como suplemento em certos tipos de biscoitos, como os butterscotch, barra de nozes e produtos tipo hambúrguer, entre outros. Os hidrolisados também pode ser adotado em dietas para pessoas com problemas de digestão ou de má absorção de proteínas, graças a sua elevada digestibilidade e aos aminoácidos essenciais disponíveis (Sgarbieri, 1996).

Os hidrolisados para fins nutricionais devem reunir as seguintes propriedades: ser osmoticamente equilibrados, hipoalergênicos; apresentar sabor aceitável sendo que o valor nutritivo do hidrolisado deve permanecer tão próximo da proteína original quanto possível (González-Tello *et al.*, 1994).

Usualmente são empregadas fórmulas sintéticas constituídas de misturas de aminoácidos livres ou hidrolisados protéicos contendo peptídios de baixo peso molecular, de preferência di e tripeptídios, para o tratamento clínico de pacientes que apresentam complicações gastrointestinais, desnutrição decorrente de processos tumorais, queimaduras ou outros traumas, diarreia aguda ou crônica, alergias alimentares, ou desordens no metabolismo de aminoácidos (Clemente, 2000; Frokjaer, 1994; Schmidl *et al.*, 1994).

De acordo com Neves *et al.* (2006), peptídios biologicamente ativos vêm sendo encontrados em hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de diversas fontes protéicas e extensivamente estudadas durante os últimos 15 anos, a fim de atender os interesses de pesquisadores, bem como da indústria farmacêutica e alimentícia no desenvolvimento de dietas contendo ingredientes funcionais capazes de modular funções fisiológicas específicas.

Na alimentação enteral dá-se preferência aos hidrolisados protéicos, ricos em peptídios de baixo peso molecular, devido a excelente absorção gastrointestinal e a sua baixa osmolalidade, sendo estes melhor utilizados pelo organismo do que as proteínas intactas ou os aminoácidos livres (Siemensma *et al.*, 1993).

Um outro campo de estudo e de aplicação para os hidrolisados protéicos é a obtenção de peptídios pequenos, biologicamente ativos, os quais podem desempenhar várias funções, regulando ou inibindo a atividade enzimática, atuando com antibióticos, hormônios, agentes antivirais e antibacterianos ou imunomoduladores (Pihlanto-Leppala, 2001; Gill *et al.*, 1996).

A aplicação dos hidrolisados varia em função da distribuição do peso molecular dos peptídios. Assim, peptídios com pesos moleculares entre 5 e 20KDa são utilizados geralmente como fontes de nitrogênio, em alimentos com fins especiais e suplemento alimentar para adultos. Já, peptídios com pesos moleculares menores que 5KDa são oriundos de proteínas alimentares altamente hidrolisadas sendo freqüentemente utilizados em formulações hipoalergênicas (Mahmoud, 1994).

Formulações à base de hidrolisados protéicos com alto teor de aminoácidos ramificados (ACR), valina, leucina e isoleucina, e com um baixo conteúdo em aminoácido aromático (AA), fenilalanina e tirosina, podem ser empregadas com sucesso no tratamento dietético de pacientes com lesões hepáticas crônicas, incluindo a encefalopatia hepática. Uma relação ACR/AA, denominada de “Relação de Fisher” maior que 3,0 contribui para a melhoria significativa no quadro clínico dos pacientes, atribuída à normalização da concentração plasmática de aminoácidos e à manutenção de um aporte protéico adequado (Bautista *et al.*, 1996; Adachi *et al.*, 1991; Tanimoto *et al.*, 1991).

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem um elevado valor biológico, decorrente de uma alta sensibilidade à hidrólise e de uma composição balanceada em aminoácidos, particularmente daqueles que costumam ser os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína. Sendo as proteínas mais comumente usadas para a produção de hidrolisados protéicos as derivadas do leite (caseína, lactoalbumina e as proteínas do soro), soja, carne e pescado (Neves *et al.*, 2006).

3.4 – Bactérias ácido láctico

As bactérias ácido láctico são largamente usadas na conservação e processamento de alimentos tais como carne, peixe, leite e vegetais. Há um grande aumento na utilização de uma microbiota selecionada e identificada no processamento de alimentos. O controle do processo requer conhecimento das cepas de microrganismos da matéria-prima e da reação bioquímica do produto final. Esse processo no qual se utiliza bactérias ácido láctico assegura a estabilização e modificação da qualidade sensorial dos produtos. As bactérias ácido láctico têm ocupado um importante espaço na tecnologia de produtos marinhos (Han-Ching *et al.*, 1995).

Tomé (1993) menciona que o crescimento de bactérias ácido láctico é um método amplamente utilizado para a conservação de alimentos tanto para consumo humano como animal já que elas inibem o crescimento de outras mediante a produção de peróxido de hidrogênio e de antibióticos.

As propriedades antagônicas das bactérias ácido láctico se devem ao aumento da proporção de ácido em sua forma não dissociada o qual passa livremente através da membrana celular bacteriana. Uma vez no interior da célula o ácido se dissocia causando diminuição do pH interno e conseqüentemente morte da célula bacteriana (Lindgren e Pleje, 1983). A conservação se completa com a produção de antibióticos, peróxido de hidrogênio, etc. por parte das bactérias ácido láctico. Estas bactérias não somente evitam a decomposição microbiana do alimento mas também adicionam aromas característicos aos produtos e podem prevenir a rancidez e outras reações químicas que diminuem a qualidade (Raa e Gildberg, 1982).

O pescado é rico em proteínas e lipídios porém, tem um baixo nível de carboidratos fermentescíveis. A principal fonte de energia no pescado são os aminoácidos livres que aumentam à medida que o pescado se liquefaz. As bactérias lácticas têm uma limitada capacidade de desdobrar os aminoácidos. As bactérias putrefativas utilizam os aminoácidos como fonte de energia e assim produzem amônia. A adição de açúcares fermentescíveis a um meio rico em proteínas como o pescado, aumenta a taxa de crescimento das bactérias

ácido láctico devido ao fato de que a glicose reprime a produção das desaminas de bactérias putrefativas (Raa e Gildberg, 1982).

O metabolismo fermentativo das bactérias ácido láctico na presença de oxigênio diminui o pH do meio. Esta diminuição de pH resulta na produção de ácido láctico. O *Lactobacillus plantarum* isolado por Schroder *et al.* (1980) apud Han-Ching *et al.* (1995) apresentou metabolismo homofermentativo em anaerobiose e na presença de alta concentração de glicose, e metabolismo heterofermentativo na presença de oxigênio e baixa concentração de glicose. Essa mudança no metabolismo ocorre devido ao nível de piruvato produto secundário e de produtos primários tais como acetato, etanol e CO₂.

Algumas espécies de bactérias ácido láctico podem fermentar compostos contendo nitrogênio com produção de amônia e produtos orgânicos estes não são muito diferentes dos formados pela fermentação de açúcar.

A fermentação láctica é realizada pelas bactérias pertencentes ao grupo láctico ou bactérias lácticas. Fazem parte deste grupo os seguintes gêneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium* e *Vagonococcus*.

Na fermentação láctica há produção de ácido láctico, podendo ser do tipo homoláctica (produção de 2 moles de ácido láctico por mol de glicose), com maior quantidade desse componente em relação aos demais produtos formados, como diacetil, etanol e CO₂ ou heteroláctica, quando a proporção desses produtos são praticamente, as mesmas.

Todos os membros dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium* e *Vagonococcus* são homofermentadores, juntamente com algumas espécies de *Lactobacillus*.

As diferenças entre homo- e heterofermentadores têm base genética e fisiológica. Os homoláticos apresentam as enzimas aldolases e hexose-isomerase, mas não apresentam a fosfoctolase. Utilizam a via de Embden-Meyerhof-Parnas para produzir duas moléculas de lactato para uma de glicose. Já os heteroláticos apresentam a fosfoctolase, mas não a aldolase e a hexose-isomerase e, em vez de utilizarem a via de Embden-Meyerhof-Parnas na degradação de glicose, usam ou a do monofosfato-hexose ou a via das pentoses.

As bactérias ácido láctico isoladas do peixe podem requerer e obter energia para o metabolismo de degradação da arginina (Jonsson *et al.*, 1985). Este aminoácido está presente no peixe em quantidades significativas. Outros aminoácidos também podem ser sintetizados pelas bactérias ácido láctico do peixe (Kjosbakken *et al.* 1983 *apud* Jonsson *et al.*, 1985).

A produção de uma grande variedade de substâncias por parte das bactérias ácido láctico podem inibir muitos grupos de bactérias. Nos demais casos a formação de ácidos lácticos ou acéticos diminuem o pH do meio e inibe a microbiota deteriorante. Em alguns produtos, embora o efeito inibitório seja a presença de compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias antibióticas (Martins e Franco, 1997; Pinto, 1996).

O hidrolisado biológico de peixe utilizando a fermentação de bactérias ácido láctico tem sido desenvolvida desde 1950. Há produção em grande escala em países como Israel, Índia, Noruega e Suécia. Este processo é considerado pela América e Canadá como uma valorização de produto de peixe e redução de poluição ambiental. O principal objetivo desse processo é a preservação do material pela rápida acidificação e redução do potencial redox (Raa e Gildberg, 1982).

As cepas usadas neste processo tem sido principalmente de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus halophilus* e *Pediococcus acidilactici*. A concentração de bactéria de 10^7 células/g após 24 horas causa o decréscimo do pH até 4,5. A produção de ácido é maior do que na silagem de ervas e isto é devido aos efeitos de proteínas e aminoácidos que estão presentes em concentrações muito altas em silagem de peixe.

3.5 – Espécies estudadas

3.5.1 – Branquinha (*Potamorhina latior*, Spix & Agassiz 1829)

Ordem: *Characiformes*

Família: *Curimatidae*

Gênero: *Potamorhina*

Espécie: *Potamorhina latior*, Spix & Agassiz, 1829.



Essa espécie também é conhecida por outros nomes comuns, a saber: branquinha, sabatina (Bolívia), viscaíno (Colômbia).

A branquinha em geral apresenta um porte médio de até 30cm; corpo relativamente alongado; região pré-pélvica com uma quilha mediana que se estende até a porção pós-pélvica, porém sem serras, linha lateral com 90 a 120 escamas; 15 a 18 séries de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral e 16 a 20 entre esta e a origem da anal; coloração uniformemente cinza, ligeiramente mais escura no dorso e clara no ventre.

É uma espécie detritívora, consome matéria orgânica floculada, algas, detritos e microrganismos associados; empreende migrações reprodutivas e desova no início da enchente, ocorrendo comumente em lagos de água branca (Santos *et al.*, 2006).

3.5.2 – Acari-bodó (*Liposarcus pardalis*, Castelnau 1855)

Ordem: *Siluriformes*

Família: *Loricariidae*

Gênero: *Liposarcus*

Espécie: *Liposarcus pardalis*, Castelnau, 1855.



O bodó apresenta outros nomes comuns: Acari, acari-bodó, cascudo, carachama negra (Peru), cuchá (Colômbia); Zapato (Bolívia).

É um animal de porte grande, até 50cm; distingue-se da maioria das espécies de bodós pelo grande número de raios da nadadeira dorsal, de 12 a 14; ocorre em áreas de várzea, em lagos e margens de rios de águas brancas. Essa espécie foi largamente citada na literatura até recentemente como *Pterygoplichthys multiradiatus*.

O bodó pertence à família *Loricariidae*, os membros dessa família apresentam corpo roliço ou achatado em seção transversal e coberto por placas ósseas, formando três a cinco séries sobre o tronco, sendo cada uma munida de pequenas estruturas ósseas, bastante ásperas ao tato ou mesmo perfurantes denominadas odontódios, região abdominal achatada ou plana, boca inferior, lábios expandidos em forma de ventosa e papilosos, uma ou mais fileiras de dentes delgados, fracamente implantados e quase sempre com duas cúspides assimétricas ou em forma de conchas; um par de barbilhões curtos no canto da boca, na conexão entre os lábios superior e inferior; nadadeira adiposa quando presente com um raio curto e duro na borda anterior; pedúnculo caudal normalmente longo e comprido; nadadeiras peitorais e dorsal munidas de um espinho; intestino longo e enovelado. A maioria das

espécies habita o fundo de lagos e rios, onde normalmente permanece imóvel, às vezes em troncos, ou se movimenta lentamente; sua dieta é constituída basicamente de detritos, algas, larvas de insetos e outros microrganismos associados ao fundo e ao perifiton; fecundidade baixa e ovócitos relativamente grandes. Todas as espécies de grande porte são utilizadas na pesca de subsistência e comercial e muitas de pequeno porte são utilizadas na aquariofilia, sobretudo as coloridas e de formas exóticas. A família inclui seis subfamílias, 82 gêneros e cerca de 680 espécies (Santos *et al.*, 2006).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Culturas lácticas

Para promover a produção de ácido láctico e diminuir o pH do meio fermentativo, favorecendo com isto a hidrólise protéica pelas enzimas presentes no peixe, utilizou-se culturas liofilizadas de microrganismos lácticos que foram adquiridas junto a Fundação Tropical André Tosello em Campinas, São Paulo.

- *Lactobacillus plantarum* (CCT 2568);
- *Lactococcus lactis* (CCT 2739).

Para a reativação e para aumentar o volume do inóculo foram seguidas as técnicas propostas pela Fundação Tropical André Tosello, que serão descritas a seguir:

As ampolas contendo as culturas foram desinfetadas em álcool, flambadas em bico de Bunsen e posteriormente abertas com o auxílio de uma lima em ambiente asséptico.

Com uma pipeta Pasteur, adicionou-se 0,2ml de água destilada esterilizada, obtendo desta forma a suspensão das células que foram transferidas para tubos de ensaio que continham 5ml de meio de cultura específico para crescimento de culturas lácticas (MRS - Man Rogosa Sharpe broth, DIFCO 0881-

101-3) e incubados por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para obtenção de crescimento (turbacão do meio e/ou precipitação).

Após o período de incubação o conteúdo do tubo foi transferido para um erlenmeyer contendo 50ml de caldo MRS e incubados na mesma condição por 48 horas.

4.2- Pescado

4.2.1- Branquinha (*Potamorhina latior*, Spix & Agassiz 1829)

A branquinha (*Potamorhina latior*) foi adquirida diretamente do pescador na feira livre da CEASA, Manaus/AM. O peixe foi acondicionado com gelo em caixas isotérmicas e transportado para o laboratório de tecnologia de pescado da Coordenação de Pesquisa em Tecnologia de Alimentos – CPTA do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, onde foram filetados.

Os filés foram acondicionados em recipiente estéril, sendo levados ao laboratório de Microbiologia de Alimentos do CPTA/INPA.

4.2.2- Acari-bodó (*Liposarcus pardalis*, Castelnau 1855)

O acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) foi adquirido diretamente do pescador na feira livre da CEASA, Manaus/AM. Esse peixe é normalmente vendido vivo, uma vez que, estando morto há um rápido apodrecimento da carne.

O pescado foi acondicionado com gelo em caixas isotérmicas sofrendo, portanto o processo de hipotermia e transportado para o laboratório de tecnologia de pescado da Coordenação de Pesquisa em Tecnologia de Alimentos – CPTA do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, onde foram lavados e filetados.

Os filés foram acondicionados em recipiente estéril, sendo levados ao laboratório de Microbiologia de Alimentos do CPTA/INPA.

4.3- Preparação do hidrolisado

Para a obtenção do hidrolisado biológico de pescado das espécies estudadas (Figura 1) foram estabelecidos três tratamentos, a saber:

- Tratamento 1 - Recipiente estéril contendo 500g de filé de pescado; 1% da cultura láctica (*Lactobacillus plantarum*,) e 15% de açúcar comercial.
- Tratamento 2 - Recipiente estéril contendo 500g de filé de pescado; 1% da cultura láctica (*Lactococcus lactis*) e 15% de açúcar comercial.
- Tratamento 3 - Recipiente estéril contendo 500g de filé de pescado; 0,5% da cultura láctica (*Lactobacillus plantarum*,); 0,5% da cultura láctica (*Lactococcus lactis*) e 15% de açúcar comercial.

Repetiu-se o experimento de obtenção do hidrolisado biológico de acaribodó três vezes.

Figura 1- Fluxograma de obtenção de hidrolisado biológico de pescado.



Obtenção do hidrolisado

A obtenção do hidrolisado biológico de pescado foi preparada de acordo com os procedimentos descritos abaixo:

- a) **Pescado** – o pescado foi disposto sobre a bancada de inox para que fosse lavado sob água corrente (figura a).
- b) **Lavagem** – nesta etapa, lavou-se o pescado um a um em água corrente, para eliminar a sujeira da superfície (figura b).
- c) **Filetamento** – os peixes foram filetados um a um tendo-se o cuidado para não perfurar as vísceras (figura c).
- d) **Lavagem** - os filés foram lavados um a um em água corrente. Colocados dentro de recipiente de vidro esterilizado (figura d).
- e) **Refrigeração** – o recipiente de vidro esterilizado contendo os filés foi acondicionado em geladeira para mantê-los refrigerado até o momento da trituração (figura e).
- f) **Trituração** - a trituração dos filés foi realizada em homogenizador universal estéril (liquidificador) e eles foram mantidos sob refrigeração até a adição dos componentes da fórmula (figura f).
- g) **Homogeneização** – nesta etapa adicionou-se aos filés já triturados o açúcar na concentração de 15% e as bactérias lácticas na concentração de 1% (figura g).
- h) **Acondicionamento** - os recipientes de vidro já contendo toda a mistura (filé, açúcar, bactérias lácticas) foram incubados em estufa bacteriológica à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 dias (figura h).
- i) **Pasteurização** - a pasteurização ocorreu em banho-maria na própria embalagem (recipiente de vidro) à 70°C por 5 minutos (figura i).
- j) **Congelamento** – os hidrolisados foram colocados em bandejas de alumínio com tampa e congelados à $-20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Antes do congelamento esses foram resfriados à $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (figura j).
- k) **Liofilização** – os hidrolisados congelados em bandejas de alumínio foram levados para o liofilizador modelo LH0400/3L, onde foram liofilizados a uma temperatura de -40°C por 14 horas (figura k).



Figura a- pescado



Figura b- lavagem



Figura c- filetamento



Figura d – lavagem



Figura e – refrigeração



Figura f – trituração



Figura g – homogeneização



Figura h – acondicionamento



Figura i - Pasteurização



Figura j - Congelamento



Figura k - Liofilização

Figura 2- Seqüência de procedimentos utilizados para obtenção de hidrolisado biológico de peixes da Amazônia.

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista “Acta Amazônica”.

4.4- Preparação dos biscoitos doces

Os biscoitos doces foram preparados utilizando-se como ingredientes farinha de trigo, amido de milho, açúcar, margarina, hidrolisado biológico de pescado da Amazônia.

Os ingredientes secos foram misturados e os biscoitos modelados na mão.

Os biscoitos foram colocados em uma bandeja de inox e levados ao forno pré-aquecido a uma temperatura de 180°C para serem assados durante 15 minutos.

Primeiramente prepararam-se os biscoitos adicionando-se três diferentes concentrações de hidrolisado 2,5%, 5,0%, 7,5 e 10,0% para avaliar quanto ao sabor. Fez-se uma avaliação sensorial com 10 julgadores escolhidos aleatoriamente, e não treinados, para a determinação do biscoito preferido quanto ao parâmetro analisado. Todos os julgadores tinham entre 20 e 50 anos (Anexo 1).

Posteriormente, prepararam-se novos biscoitos já com a concentração definida para os três hidrolisados (LP, LL e LL+LP) e uma amostra controle (sem hidrolisado). Fez-se uma avaliação sensorial em escala hedônica de 7 pontos com 28 julgadores escolhidos aleatoriamente, e não treinados, para os seguintes parâmetros aparência, cor, odor, sabor e textura. Todos os julgadores tinham entre 20 e 50 anos (Anexo 2).

4.5- Análises

4.5.1- Análise físico-química do pescado “in natura” e dos hidrolisados

Todas as análises para o músculo do peixe e hidrolisados foram realizadas em triplicata.

a) Umidade por dessecação

Nos filés, a umidade foi determinada pesando-se 5g da amostra através de método gravimétrico em estufa à 105°C até peso constante, segundo as

técnicas descritas pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985), expressa em porcentagem de umidade.

Nos hidrolisados liofilizados e nos biscoitos, a umidade foi determinada pesando-se 5g da amostra através de método gravimétrico em estufa a 65°C com ar circulante até peso constante, segundo as técnicas descritas pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 2005), expressa em porcentagem de umidade.

b) Proteínas

Nos filés, hidrolisados e biscoitos, a proteína foi determinada pesando-se 0,1g da amostra seca utilizando-se o método microkjeldahl, segundo as técnicas descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985), utilizando-se o fator de conversão 6,25. Para a digestão das amostras e posterior destilação foram utilizados equipamentos TECNAL. Os resultados das determinações foram expressos em porcentagem de proteína.

c) Lipídios

Nos filés, hidrolisados e biscoitos a fração lipídica foi obtida pesando-se 1g da amostra seca, pelo método de Soxhlet segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985), utilizando-se como solvente o hexano. Os resultados das determinações foram expressos em porcentagem de lipídio.

d) Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)

Nos filés, hidrolisados e biscoitos o teor de cinzas foi obtido pesando-se 1g da amostra seca. Fez-se a incineração da matéria orgânica em bico de Bunsem, e em seguida levou-se as amostras a mufla a 550°C/4horas, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985). Os resultados das determinações foram expressos em porcentagem de cinza.

e) Açúcares redutores (totais)

Para a determinação do teor de açúcares totais primeiramente foi necessário realizar a desproteínização das amostras, pesando-se 1g da amostra para 100mL de água destilada. Pipetou-se 3mL desta solução para tubos de

centrífuga e adicionou-se 1,2mL de hidróxido de bário 0,3N e 1,2mL de sulfato de zinco a 5%. Adicionou-se 5mL de água destilada e deixou-se em repouso por 10min. Centrifugou-se a solução a 15000rpm/15min. Pipetou-se 1mL da amostra desproteïnizada para tubos de ensaio, adicionou-se 1mL de água destilada e 1mL do reativo cúprico. Aqueceu-se a mistura em banho-maria a 85°C por 10 minutos e resfriou-se imediatamente em banho de gelo. Adicionou-se 1mL de arsenomolibdo e 6mL de água destilada. Fez-se a leitura em espectrofotômetro modelo SPECTRUM – SP 2000UV a 510nm, segundo o método de Somogyi-Nelson, Southgate (1991). Os resultados das determinações foram expressos em porcentagem de açúcares totais.

f) pH

O valor de pH dos hidrolisados foi medido, diariamente, durante os cinco dias de acondicionamento segundo as técnicas descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985).

g) Acidez

A acidez dos filés foi avaliada através de titulação com solução de NaOH 0,1N e adição de fenolftaleína, segundo as técnicas descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985). Os resultados foram expressos em p/v de ácido láctico.

A acidez dos hidrolisados foi avaliada, diariamente, durante os cinco dias de acondicionamento através de titulação com solução de NaOH 0,1N e adição de fenolftaleína, segundo as técnicas descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985). Os resultados foram expressos em p/v de ácido láctico.

h) Aminoácidos

As análises de aminoácidos totais e aminoácidos livres foram realizados nos hidrolisados obtidos dos três tratamentos. No filé de acari-bodó realizaram-se apenas aminoácidos totais. Realizaram-se todas as análises no laboratório do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL (Campinas – SP).

Aminoácidos totais

Pesou-se o equivalente a 25mg de proteína da amostra e hidrolisou-se com 10mL de HCL 6,0N, a vácuo, à temperatura de 110°C por 22 horas. A amostra foi recuperada em diluente pH 2,2 (marca Pickering). Uma alíquota de 25µl foi injetada no analisador Dionex DX 300 para separação dos aminoácidos em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência solução padrão e aminoácidos Pierce, segundo as técnicas descritas por Spackman *et al.* (1958).

Aminoácidos livres

Uma solução da amostra foi preparada por dissolução em diluente pH 2,2 (marca Pickering), filtrada em membrana 0,45µM. Alíquotas de 25µl foram injetadas no analisador Dionex DX 300 para separação dos aminoácidos em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência solução padrão de aminoácidos Pierce, segundo as técnicas descritas por Spackman *et al.* (1958).

4.5.2- Análise microbiológica do pescado “in natura” e dos hidrolisados

Todas as análises para o filé do peixe e hidrolisados foram realizadas em triplicata.

Pesquisou-se nos filés bactérias à 35°C, bolores e leveduras, lactobacilos, coliformes total e termotolerante de acordo com método descrito por ICMSF (1983).

Diariamente durante os cinco dias de acondicionamento pesquisou-se nos hidrolisados bactérias à 35°C, bolores e leveduras, bactérias lácticas, coliformes total e termotolerante de acordo com método descrito por ICMSF (1983).

As análises para contagem padrão em placas de bactérias (item d), contagem de lactobacilos (item e) e contagem de bolores e leveduras (item f) foram realizadas utilizando-se a técnica “pour plate”.

a) Preparo da amostra para análise microbiológica

Pesou-se assepticamente 25g da amostra em erlenmeyer contendo 225ml de solução salina 0,85% peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}). Em seguida fizeram-se diluições sucessivas até 10^{-7} .

b) Coliformes Totais

As análises de coliformes totais foram realizadas pela técnica de Número Mais Provável (NMP) em série de três tubos utilizando-se como meio de cultura o Caldo Lauril Triptose para o teste presuntivo, o Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose para o teste confirmativo. Os tubos de ensaio foram incubados em estufa bacteriológica à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/48\text{horas}$.

c) Coliformes Termotolerantes

As análises de coliformes termotolerantes foram realizadas pela técnica de NMP em série de três tubos utilizando-se como meio de cultura o Caldo EC. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}/24\text{horas}$.

d) Contagem Padrão em Placas de Bactérias (CPP)

Fez-se a contagem padrão em placas (CPP) de bactérias à 7°C , 20°C e 35°C para o filé, pele, vísceras e brânquias.

Com auxílio de pipetador e ponteiras esterilizadas, inoculou-se 1ml das amostras em placas de Petri até a diluição 10^{-7} . Verteu-se 18 a 20mL de Plate Count Agar (PCA). Homogeneizaram-se as placas em movimentos circulares. Esperou-se esfriar. Inverteu-se as placas e incubou-se em estufa bacteriológica $7^{\circ}\text{C}/10\text{dias}$, $20^{\circ}\text{C}/5\text{dias}$ e $35^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. Após o período de incubação as colônias foram contadas em contador de colônia.

e) Contagem de Lactobacilos

Com auxílio de pipetador e ponteiras esterilizadas, inoculou-se 1ml das amostras em placas de Petri até a diluição 10^{-7} . Verteu-se 18 a 20mL de Agar Man Rogosa e Sharpe (MRS). Homogeneizaram-se as placas em movimentos circulares. Esperou-se esfriar. As placas foram invertidas e incubadas em estufa

bacteriológica à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/48\text{horas}$. Após o período de incubação as colônias foram contadas em contador de colônia.

f) Contagem de bolores e leveduras

Com auxílio de pipetador e ponteiras esterilizadas, inoculou-se 1ml das amostras em placas de Petri até a diluição 10^{-5} . Verteu-se 18 a 20mL de Agar Batata Dextrose (BDA). Homogeneizaram-se as placas em movimentos circulares. Esperou-se esfriar. As placas foram invertidas e incubadas em estufa BOD à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/5\text{dias}$. Após o período de incubação as colônias foram contadas em contador de colônia.

4.5.3- Análise sensorial de biscoitos doces formulados com hidrolisados

A avaliação sensorial dos biscoitos adicionados de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% de hidrolisados biológicos de acari-bodó (LP, LL e LL+LP) foi realizada mediante o uso do teste de ordenação, com 10 julgadores. Depois do teste de ordenação, as amostras que obtiveram melhor aceitação (biscoitos com 2,5% de hidrolisado) foram submetidas a uma nova avaliação mediante escala hedônica de 7 pontos, com 28 julgadores mediante teste de perfil de atributos, sendo eles, aparência geral, cor, odor, sabor, textura. Todos julgadores eram consumidores de biscoitos, possuíam de 20 a 50 anos, de ambos os sexos, escolhidos de modo aleatório, sem conhecimento sobre a composição das amostras (Anexos 1 e 2).

4.5.4- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas considerando os dados físico-químicos e microbiológicos. Utilizaram-se os testes de Kruskal-Wallis, teste de Tukey para dados não paramétricos e o teste de ANOVA para dois fatores.

A significância de 95% foi adotada para a análise de resultados.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Branquinha (*Potamorhina latior*, Spix & Agassiz 1829)

5.1.1- Microbiologia de filé e hidrolisados

A análise microbiológica tem a finalidade de informar sobre o padrão de higiene durante o manuseio e a elaboração do produto e a possível presença de bactérias ou microrganismos patogênicos de importância para a saúde pública (Huss, 1998), ou ainda servir de orientação para indicar possíveis problemas e comercialização do alimento (Filgueiras, 2002).

Os altos valores determinados para os coliformes total (2400NMP/g) e termotolerante (460NMP/g) para as amostras de filé de branquinha indicam ser esse pescado manipulado, armazenado e comercializado em condições inadequadas de higiene (Tabela 5).

Tabela 5– Microrganismos em filé de branquinha (*Potamorhina latior*).

Repetições	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
1	2400	460	$1,91 \times 10^5$	$1,58 \times 10^2$
2	460	240	$9,5 \times 10^4$	$3,31 \times 10^2$
3	2400	460	$2,42 \times 10^5$	$1,13 \times 10^2$

Foram altos os valores encontrados para as bactérias aeróbias mesófilas em filé de branquinha (Tabela 5). De acordo com Atayde *et al.* (2005) o pescado *in natura* e seus derivados, expostos à elevada umidade da região amazônica e, principalmente à temperatura inadequada de estocagem ocasionam o início do processo de deterioração microbiológica, proveniente, provavelmente, de possíveis contaminações no momento da preparação do pescado, antes do resfriamento ou congelamento, descongelamento e estocagem. Também a contaminação pode advir pelo contacto do pescado com gelo preparado com água poluída.

O pescado que chega a Manaus, capturado nos rios do Estado do Amazonas, permanece nos convés dos barcos exposto à temperatura ambiente por algumas horas. Após esse período é colocado com gelo nas caixas dos barcos, onde o manuseio e a higiene são descuidados, permanecendo por tempo variável, podendo atingir 7 ou mais dias.

O desembarque do pescado no porto acontece sem cuidados especiais. Retira-se todo o peixe das caixas com gelo para canoas abertas sem gelo, e, em terra, para caixas de madeira também sem gelo. Isto mostra uma sucessão de agressões, falta de gelo e contaminações diversas que permitem, muitas vezes, que o pescado se deteriore rapidamente.

Costa (2006) analisando o filé de acará-açú (*Astronotus ocellatus*) encontrou valores de $9,7 \times 10^3$ UFC/g para bactérias aeróbias mesófilas, 100NMP/g para coliformes totais e ausência para coliformes termotolerantes.

O músculo do pescado fresco é muito susceptível à deterioração, devido principalmente a dois fatores: processo enzimático e a atividade microbiana *post mortem*. O efeito da atividade enzimática e microbiana nas proteínas do pescado origina pronunciado mau odor que reduz a vida útil do produto com perdas econômicas significativas (Leitão, 1988a).

Para Leitão (1988b), a participação microbiana é um dos fatores determinantes da vida útil dos pescados e cada espécie tem a sua própria microbiota, a qual está associada com as condições de equilíbrio ecológico do ambiente onde se cria e/ou de onde é capturado, e pode trazer conseqüências durante a comercialização e/ou transformação do produto para consumo.

Os hidrolisados biológicos obtidos da branquinha (Tabelas 6, 7, 8) tiveram que ser descartados, devido aos altos valores de microrganismos encontrados, principalmente os coliformes termotolerantes que chegaram a 2400NMP/g. Estes altos índices tornaram o alimento impróprio para consumo humano, além de poderem veicular microrganismos patogênicos de origem fecal. Os produtos também mofaram a partir do terceiro dia, devido à alta contagem de bolores e leveduras ($9,0 \times 10^5$ UFC/g).

Tabela 6 – Microrganismos em hidrolisado biológico de branquinha (*Potamorhina latior*) obtido com *Lactobacillus plantarum*.

Repetições	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
1	2400	2400	$3,24 \times 10^5$	$5,20 \times 10^5$
2	2400	460	$6,92 \times 10^5$	$7,72 \times 10^5$
3	2400	2400	$6,32 \times 10^5$	$9,00 \times 10^5$

Tabela 7 – Microrganismos em hidrolisado biológico de branquinha (*Potamorhina latior*) obtido com *Lactococcus lactis*.

Repetições	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
1	1100	1100	$1,62 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$
2	1100	1100	$5,56 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5$
3	2400	2400	$6,88 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$

Tabela 8 – Microrganismos em hidrolisado biológico de branquinha (*Potamorhina latior*) obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis*.

Repetições	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
1	2400	2400	$3,70 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$
2	460	240	$8,60 \times 10^4$	$1,21 \times 10^5$
3	2400	2400	$9,50 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$

5.2- Acari-bodó (*Liposarcus pardalis*, Castelnau 1855)

5.2.1- Microbiologia de filé

Como não foi possível obter um hidrolisado biológico da branquinha para consumo humano tivemos que realizar análises com outras espécies de peixes amazônicos, cuja carga microbiana da matéria-prima fosse baixa e tivéssemos um hidrolisado próprio para consumo humano.

Dentre as espécies pesquisadas o acari-bodó foi a que apresentou melhor resultado, uma vez que essa espécie é comercializada viva. É um peixe magro, diminui o risco de oxidação e a introdução de gordura na dieta humana.

O filé de acari-bodó apresentou ausência de coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e uma baixa contagem para coliformes totais. Os números de lactobacilos determinados durante os experimentos 10^3 - 10^4 UFC/g também foram satisfatórios, visto que se tinha como objetivo promover a hidrólise através de bactérias ácido lácticas (Tabela 9).

Tabela 9 - Microrganismos em filé de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*)

Repetições	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)
1	75	< 3	$1,78 \times 10^4$	< 10	$3,70 \times 10^3$
2	28	< 3	$2,45 \times 10^3$	< 10	$5,10 \times 10^4$
3	240	28	$1,52 \times 10^4$	< 10	$2,68 \times 10^4$

A técnica de manejo para conservar a qualidade de pescado consiste em mantê-lo com vida tanto quanto possível antes de cozinhá-lo e consumi-lo. Assim se tem feito na China, no caso da carpa, durante milênios através de técnicas muito antigas. Atualmente são muitas as espécies que se mantêm vivas para conservar a sua qualidade antes do consumo (FAO, 2008b).

De acordo com Oetterer (1999) para um produto beneficiado de pescado chegar ao consumidor e ter condições de consumo, deve-se tentar contornar os problemas ligados à falta de higiene e qualidade na comercialização *in natura*.

O desenvolvimento microbiano ao lado dos processos de deterioração, como a ação dos sucos digestivos e também das enzimas dos tecidos que ocorrem no pescado após a morte, contribui para acelerar as alterações do pescado durante o seu armazenamento. Na carne de peixe, a deterioração ocorre mais rapidamente do que em outros produtos cárneos devido não só a autólise, como também ao pH próximo à neutralidade (Franco e Landgraf, 2004).

Na caracterização microbiológica do acari-bodó (Tabela 10) a contagem para os coliformes total e termotolerante, bactérias mesófilas, bactérias psicrófilas, bactérias psicrotróficas, lactobacilos, bolores e leveduras apresentaram valores elevados para as brânquias e vísceras. Esses dados concordam com pesquisas realizadas por Huss (1998) que afirma que a microbiota do peixe vivo está presente na pele com contagens entre 10^2 a $10^7/cm^2$, nas guelras e intestino entre 10^3 a $10^9/g$.

Tabela 10 – Avaliação bacteriológica de pele, vísceras, brânquias e filé do acari-bodó (*Liposarcus pardalis*).

Amostras	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (UFC/g)	Bactérias psicrófilas (UFC/g)	Lactobacilos (UFC/g)
Filé	23	< 3	$1,02 \times 10^5$	$1,23 \times 10^5$	$1,40 \times 10^4$	$1,96 \times 10^3$
Pele	93	15	$4,50 \times 10^5$	$6,50 \times 10^5$	$2,90 \times 10^5$	$5,42 \times 10^3$
Brânquias	≥ 2400	210	$1,64 \times 10^7$	$2,49 \times 10^7$	$9,70 \times 10^6$	$2,10 \times 10^4$
Vísceras	≥ 2400	≥ 2400	$3,47 \times 10^7$	$2,87 \times 10^7$	$5,90 \times 10^7$	$3,97 \times 10^4$

Moroni (2005) analisando o filé de acari-bodó encontrou 4,30; 3,73; 1,70 UFC/g para bactérias mesófilas, bactérias psicrófilas e bactérias psicrotróficas, respectivamente, e ausência para bolores e leveduras, coliformes total e termotolerante. Esse resultado difere dos valores encontrados nesta pesquisa (Tabela 10) que são bem elevados no que se refere às bactérias mesófilas, psicrófilas e psicrotróficas.

De acordo com Frazier e Westhoff (1993), o pescado é o alimento mais susceptível à deterioração devido à rápida ação destrutiva de suas enzimas, a reação menos ácida do músculo, à ação dos sucos digestivos, à oxidação dos lipídios e ao desenvolvimento bacteriano que só se inicia após o término do “rigor mortis”.

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista “Acta Amazônica”.

A atividade microbiana é uma das principais causas da deterioração nos alimentos, sendo que é mais acentuada em países de clima tropical, onde as condições de temperatura permitem a multiplicação de microrganismos.

Liston (1973) *apud* Han-Ching (1995) explica a deterioração da seguinte maneira: as bactérias estão presentes na microbiota natural do peixe, ao terminar o *rigor mortis*, esses microrganismos utilizam os aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas não protéicas, altera-se a composição do substrato, a atividade das proteinases é aumentada acelerando o processo proteolítico, com produção de bases voláteis, H₂S e outros derivados relacionados com a deterioração do pescado.

Para Leitão (1988a), a intensidade da contaminação do pescado depende de inúmeros fatores, tais como temperatura, grau de poluição das águas e vísceras repletas ou não de alimentos, situações em que a população bacteriana varia entre 10² -10⁵ UFC/cm² na superfície, 10³ – 10⁷ UFC/g nas vísceras de pescado capturadas em diversas condições.

No limo superficial, nas guelras e nos intestinos de pescado vivo se acham presentes milhões de bactérias e de outros microrganismos, muitos dos quais são potenciais agentes de alteração. No entanto pouco depois da morte do pescado as bactérias começam a invadir os tecidos. Se crer que os microrganismos penetram pelas guelras e rins através de veias e artérias e diretamente através da pele e do peritônio (Burgess, 1987).

Silva (2001) analisando bacteriologicamente as brânquias de tambaqui criado em cativeiro no Amazonas detectou as seguintes bactérias Gram-negativas: *Flavobacterium* sp., *Moraxella* sp., *Pasteurella* sp., *Rochalimaea henselae*, *Xenorhabdus* sp., *Haemophilus* sp., *Proteus* sp., *Cardiobacterium* sp., *Providencia* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Hafnia* sp., *Providencia* sp., e *Pseudomonas* sp.

5.2.2 - Microbiologia de hidrolisado biológico

Não se tem conhecimento de estudos relativos à contagem microbiana durante os dias de fermentação na obtenção de hidrolisado biológico como foi

feita nesta pesquisa. Esta contagem foi feita diariamente para saber qual das bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ou os dois juntos) tem maior efeito inibitório sobre a microbiota deteriorante e patogênica presente nos hidrolisados.

Tabela 11 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP) - 1° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	240	$8,80 \times 10^8$	<10	$7,60 \times 10^5$
2	240	120	$4,10 \times 10^9$	<10	$8,50 \times 10^5$
3	<3	<3	$1,92 \times 10^9$	<10	$5,20 \times 10^5$
4	<3	<3	$5,72 \times 10^8$	$7,50 \times 10^3$	$3,80 \times 10^4$
5	<3	<3	$9,41 \times 10^8$	$1,58 \times 10^3$	$1,47 \times 10^4$

Tabela 12 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP) - 2° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	210	210	$9,04 \times 10^7$	<10	$7,44 \times 10^5$
2	240	120	$9,36 \times 10^8$	<10	$7,92 \times 10^5$
3	<3	<3	$7,76 \times 10^8$	$9,40 \times 10^4$	$3,97 \times 10^5$
4	<3	<3	$9,20 \times 10^8$	$3,41 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$
5	<3	<3	$2,37 \times 10^8$	$3,05 \times 10^4$	$2,12 \times 10^4$

Os valores de lactobacilos para os hidrolisados obtidos com as duas cepas de bactérias (*Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis*) após 24 horas de fermentação são de 10^7 - 10^9 UFC/g (Tabelas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19). Esses valores permanecem até o último dia garantindo a produção de ácido láctico (Tabela 21).

Nos hidrolisados as contagens de aeróbios mesófilos são semelhantes (10^4 - 10^6 UFC/g), o que era de se esperar já que o microrganismo inoculado no

produto pertence a este grupo de micróbios (Tabelas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19).

Outro aspecto importante é a ausência de coliformes total e termotolerante nos hidrolisados (Tabelas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19) a partir do terceiro dia de fermentação. A presença desses microrganismos poderia veicular patógenos de origem fecal tais como *Salmonella*, *Eschechia coli*, *Shigella*.

Tabela 13 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP) - 3° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	210	$6,90 \times 10^7$	$6,30 \times 10^2$	$5,50 \times 10^5$
2	240	120	$7,70 \times 10^8$	$1,44 \times 10^4$	$7,60 \times 10^5$
3	<3	<3	$2,76 \times 10^8$	$4,13 \times 10^4$	$7,20 \times 10^5$
4	<3	<3	$3,68 \times 10^8$	$9,52 \times 10^4$	$7,44 \times 10^4$
5	<3	<3	$4,32 \times 10^8$	$9,10 \times 10^4$	$1,63 \times 10^4$

Tabela 14 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactococcus lactis* (LL) - 1° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	240	$1,83 \times 10^9$	<10	$1,67 \times 10^5$
2	240	240	$2,19 \times 10^8$	$3,10 \times 10^2$	$1,66 \times 10^5$
3	<3	<3	$1,46 \times 10^9$	$5,28 \times 10^2$	$3,60 \times 10^5$
4	<3	<3	$6,92 \times 10^8$	$1,01 \times 10^3$	$7,80 \times 10^4$
5	<3	<3	$7,61 \times 10^8$	$9,68 \times 10^3$	$4,92 \times 10^4$

O processo de fermentação inicia-se devido à ação das bactérias lácticas e das enzimas proteolíticas naturalmente presentes no peixe promovendo a hidrólise do produto. As proteínas são hidrolisadas em pequenos peptídios podendo chegar a aminoácidos livres. A fração de nitrogênio presente em aminoácidos livres aumenta e a fração presente de polipeptídios diminui como resultado do processo de hidrólise.

Lindgren e Pleaje (1983) avaliaram ensilado de pescado e observaram que microrganismos patogênicos tais como: coliformes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.*, são ausentes devido ao baixo pH do produto e que a presença de certas substâncias antibacterianas produzidas pelas bactérias lácticas contribuem para inibir a ação destes microrganismos. Para esse autor, ensilado é o produto obtido com resíduos de peixe, carboidrato e bactérias ácidos láctico.

Tabela 15 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactococcus lactis* (LL) - 2° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	240	$3,56 \times 10^8$	<10	$6,84 \times 10^6$
2	240	240	$6,30 \times 10^8$	<10	$4,70 \times 10^6$
3	240	240	$6,80 \times 10^8$	$2,90 \times 10^4$	$3,28 \times 10^5$
4	<3	<3	$2,56 \times 10^8$	$3,77 \times 10^4$	$3,88 \times 10^5$
5	<3	<3	$2,90 \times 10^8$	$3,05 \times 10^4$	$1,72 \times 10^5$

Tabela 16 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactococcus lactis* (LL) - 3° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	240	$6,08 \times 10^8$	$2,80 \times 10^2$	$8,20 \times 10^5$
2	240	240	$4,70 \times 10^8$	$1,93 \times 10^4$	$4,16 \times 10^5$
3	<3	<3	$6,16 \times 10^8$	$9,68 \times 10^4$	$2,56 \times 10^5$
4	<3	<3	$2,94 \times 10^8$	$5,84 \times 10^4$	$6,12 \times 10^4$
5	<3	<3	$1,79 \times 10^8$	$6,30 \times 10^4$	$1,17 \times 10^4$

A aplicação de *Lactobacillus plantarum* isoladamente ou associado ao *Lactococcus lactis* no músculo de acari-bodó para promover a hidrólise de proteínas diminui a população de bactérias mesófilas, coliformes total e termotolerante. Após 24 horas de incubação há um aumento nos valores de acidez e diminuição de pH que atingem 1,09 e 4,70, respectivamente. A partir do segundo dia, observa-se que os valores de acidez (4,34) vão aumentando, e os De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista "Acta Amazônica".

das bactérias diminuindo, devido ao efeito letal que pode produzir a acidez sobre esses microrganismos (Tabela 21).

Tabela 17 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* (LP+LL) - 1° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	240	$5,32 \times 10^9$	<10	$5,88 \times 10^5$
2	460	240	$4,84 \times 10^8$	<10	$5,16 \times 10^5$
3	21	7	$4,36 \times 10^8$	$1,21 \times 10^4$	$2,03 \times 10^5$
4	<3	<3	$5,70 \times 10^8$	$2,83 \times 10^4$	$2,92 \times 10^4$
5	<3	<3	$6,68 \times 10^8$	$2,47 \times 10^4$	$1,12 \times 10^4$

Tabela 18 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* (LP+LL) - 2° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	210	$3,28 \times 10^8$	<10	$4,68 \times 10^5$
2	240	240	$1,07 \times 10^8$	$1,30 \times 10^3$	$1,07 \times 10^5$
3	<3	<3	$6,13 \times 10^8$	$1,67 \times 10^4$	$2,88 \times 10^5$
4	<3	<3	$2,81 \times 10^8$	$3,29 \times 10^4$	$2,37 \times 10^4$
5	<3	<3	$5,08 \times 10^8$	$2,16 \times 10^4$	$5,30 \times 10^4$

Tabela 19 - Microrganismos em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* (LP+LL) - 3° experimento.

Dias	Coli. Total (NMP/g)	Coli. Termotolerante (NMP/g)	Lactobacilos (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	Bactérias mesófilas (UFC/g)
1	240	240	$4,32 \times 10^8$	$1,18 \times 10^2$	$1,12 \times 10^6$
2	240	240	$5,20 \times 10^8$	$2,34 \times 10^4$	$4,16 \times 10^6$
3	<3	<3	$2,08 \times 10^8$	$6,26 \times 10^4$	$2,72 \times 10^4$
4	<3	<3	$2,77 \times 10^8$	$4,31 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$
5	<3	<3	$2,24 \times 10^8$	$6,30 \times 10^4$	$6,30 \times 10^4$

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista "Acta Amazônica".

A presença de oxigênio permite o desenvolvimento dos microrganismos tolerantes ao pH ácido, como os bolores e leveduras, esse fato foi observado neste estudo (Tabelas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19).

Trabalho realizado por Bello *et al.* (1989) na obtenção de ensilados com espécies de peixe provenientes da fauna do acompanhamento do camarão demonstraram que o microrganismo fermentador mais adequado para a elaboração do ensilado foi o *Lactobacillus plantarum* 8014 em função de sua eficiência de produzir ácido láctico, resultando assim, em um produto estável satisfatório do ponto de vista físico-químico, microbiológico e sensorial. Segundo os autores é conveniente utilizar 15% de melação como fonte de carboidratos, para que se produza o ácido láctico necessário para manter o pH baixo durante um longo tempo de armazenamento. A concentração de carboidrato é um fator limitante na estabilidade de ensilado.

Através do programa Statistic 5.0, analisou-se os valores de lactobacilos, teste de Kruskal-Wallis $H(4, N=15)=4,266667$; $p=0,3711$ e de bactérias mesófilas, $H(4, N=15)=12,83125$; $p=0,0121$ para os três tratamentos (LP, LL e LL+LP) em relação ao tempo (5 dias). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os microrganismos em estudo (Figuras 3, 4 e 5). O número de bactérias mesófilas decresce com o tempo para os três tratamentos devido à diminuição do pH e aumento da acidez (Tabela 21). Com relação aos lactobacilos o seu crescimento máximo ocorre no segundo dia de fermentação (Figuras 6 e 7). Mesmo havendo uma queda no seu número há produção de ácido láctico suficiente para manter a estabilidade do produto.

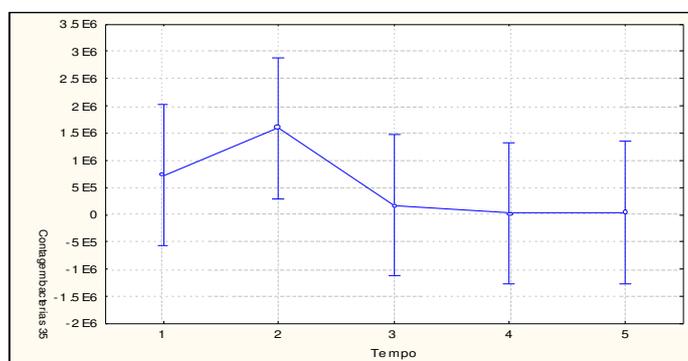


Figura 3 – Evolução de bactérias mesófilas em três hidrolisados biológicos de acari-bodó.



Figura 4 – Contagem de bactérias mesófilas em três hidrolisados biológicos de acari-bodó.

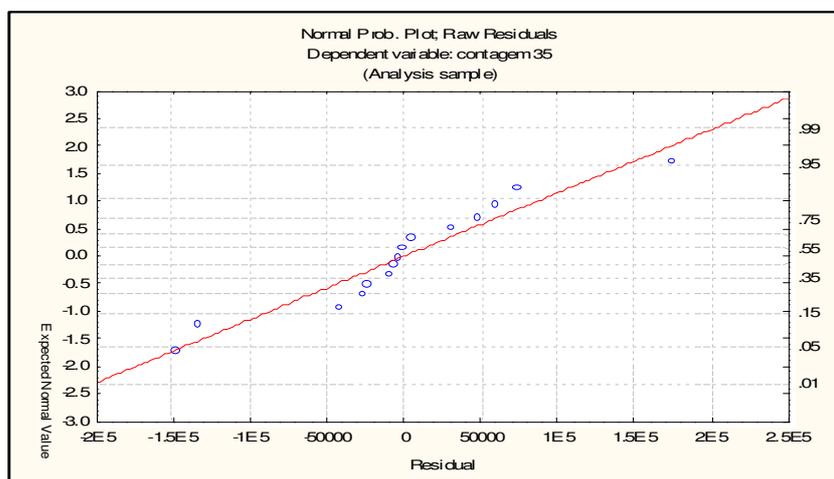


Figura 5 – Resíduo de bactérias mesófilas em três hidrolisados biológico de acari-bodó

Para o hidrolisado obtido com o *Lactobacillus plantarum* (LP), há um aumento de bactérias mesófilas e lactobacilos no segundo dia de fermentação e a partir do terceiro dia esses números começam a cair. O teste de Tukey demonstrou que não houve diferença significativa no crescimento de bactérias mesófilas entre os três hidrolisados.

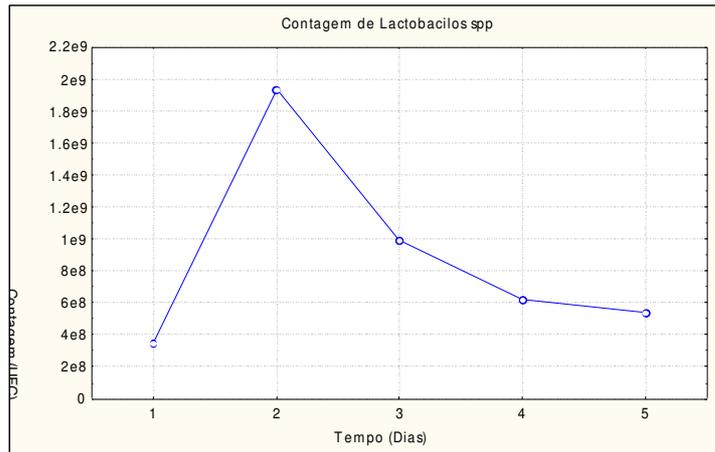


Figura 6 – Contagem de lactobacilos em três hidrolisados biológicos de acari-bodó.

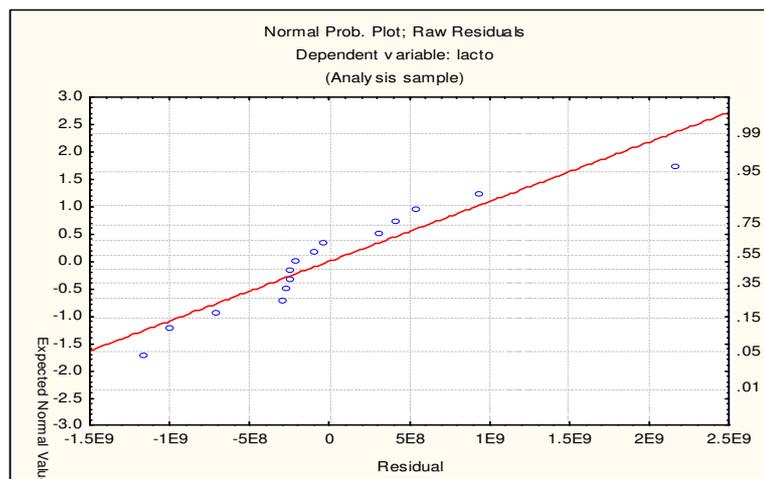


Figura 7 – Valores residual de lactobacilos em três hidrolisados biológico de acari-bodó.

Para o hidrolisado obtido com as duas culturas juntas (LL+LP) não houve diferença significativa nos valores médios das contagens para lactobacilos ao longo do tempo ($df = 4$; $p = 0,08075$).

Há uma diminuição na contagem microbiana de aeróbios mesófilos ao término do processo fermentativo, porém os valores ainda são elevados (10^4 - 10^5 UFC/g) apesar dos baixos valores de pH e também porque o processo de fermentação acontece a temperatura de 35°C que é ótima para o crescimento dessas bactérias.

Para os três hidrolisados obtidos (LP, LL e LL+LP), observa-se que os dois primeiros dias apresentam os maiores valores de coliformes totais, porém o hidrolisado (LL) apresenta a maior contagem até o terceiro dia. Só a partir do quarto dia é que há ausência dessas bactérias (Figura 8). Esse mesmo comportamento se observa para os coliformes termotolerantes (Figura 9).

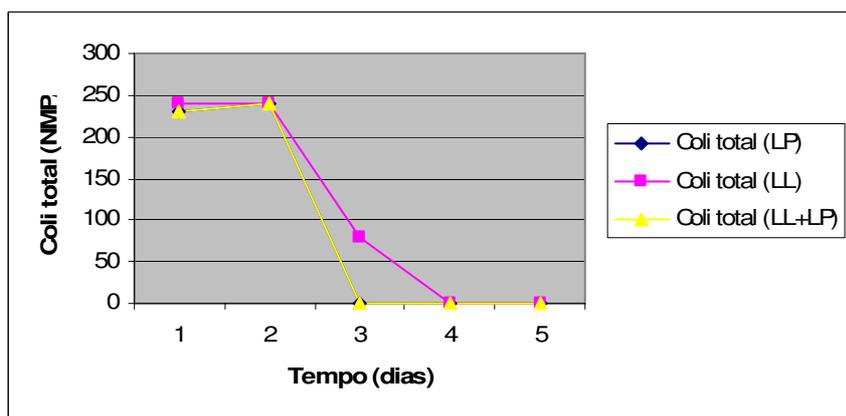


Figura 8 – Valores médios de coliformes totais em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

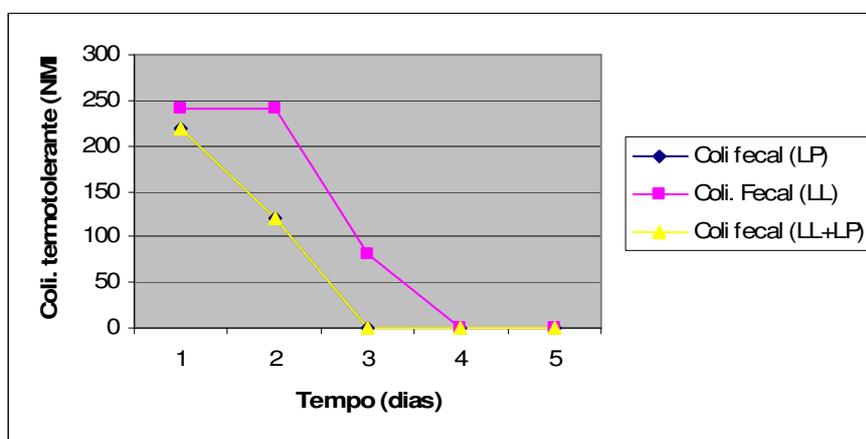


Figura 9 – Valores médios de coliformes termotolerantes em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP

Mesmo sendo o pH e a acidez favorável ao crescimento de lactobacilos, observa-se que a partir do terceiro dia há uma diminuição no número dessas bactérias (Figura 10) e um aumento no número de bolores e leveduras (Figura 11). Microrganismos que também se multiplicam neste intervalo de pH (Tabela De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista “Acta Amazônica”.

21). Durante todo o período de fermentação não há diferença significativa entre os valores de lactobacilos para os hidrolisados LP e LL+LP (Figura 10).

O *Lactococcus lactis* quando adicionado ao filé de peixe isoladamente para promover a hidrólise, proporcionou o menor valor de lactobacilos em relação ao *Lactobacillus plantarum*. Porém quando houve adição das duas culturas juntas, observa-se que os valores de lactobacilos são praticamente os mesmos dos obtidos com o *Lactobacillus plantarum* (Figura 10).

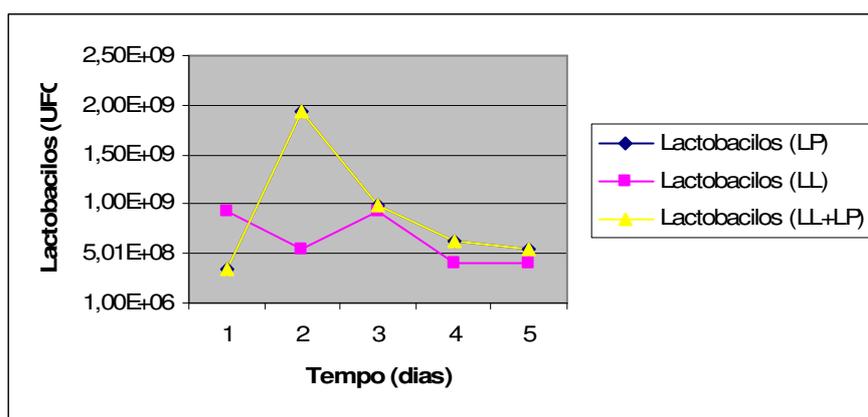


Figura 10 – Valores médios de lactobacilos em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP

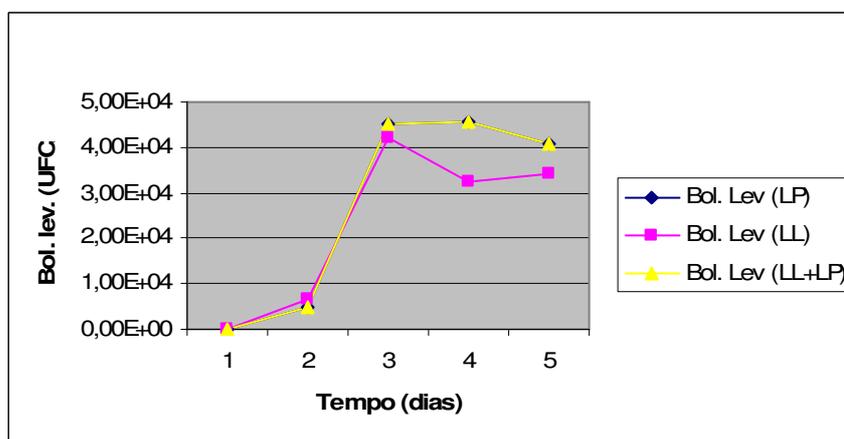


Figura 11 – Valores médios de bolores e leveduras em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

As bactérias mesófilas nos três hidrolisados LP, LL e LL+LP diminuem a partir do primeiro dia de fermentação, porém os números são mais elevados no

hidrolisado LL não havendo diferença significativa para os hidrolisados LP e LL+LP (Figura 12).

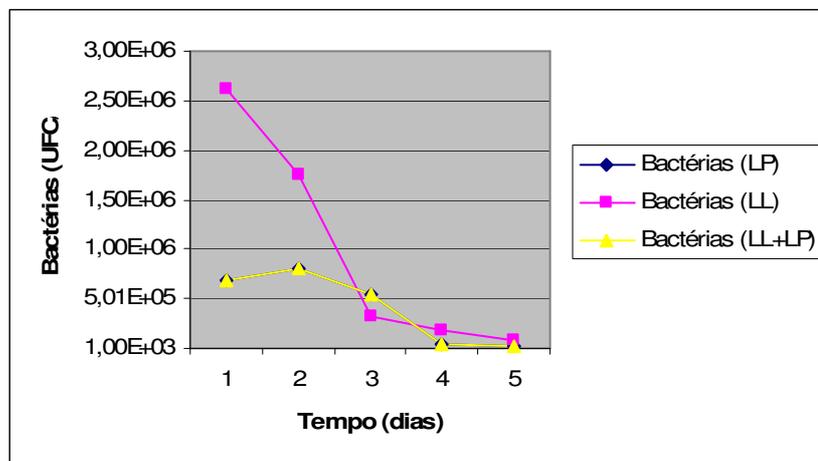


Figura 12 – Valores médios de bactérias mesófilas em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

O *Lactobacillus plantarum* foi mais eficiente no controle da microbiota deteriorante (bactérias mesófilas, bolores e leveduras) e patogênica (coliformes total e termotolerante) em hidrolisado biológico de acari-bodó do que o *Lactococcus lactis*. O *Lactococcus lactis* quando empregado juntamente com o *Lactobacillus plantarum* apresentou resultados semelhantes ao do hidrolisado obtido com o *Lactobacillus plantarum* (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12), ou seja, maior eficiência do que sozinho.

Os microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos são inibidos devido à presença das bactérias ácido láctico associado à diminuição de pH e aumento de acidez, como se observa nas figuras 8, 9, 11 e 12.

5.2.3 - pH e acidez de filé e de hidrolisados

O pH do filé de acari-bodó variou de 6,62 a 7,02 (Tabela 20), valores bem próximos aos determinados por Carvalho (2003) para as espécies de jaraqui e aracu 6,35 e 6,70, respectivamente.

O valor de pH determinado por Tomé (1993) para uma mistura de pescado que foi utilizado na elaboração de ensilado fermentado como uma mistura em proporções iguais de sardinha (*Sardinella anchovial*) e pérola (*Lepophidium profundorum*) foi de 6,60.

O músculo do peixe é altamente susceptível a ação de bactérias deteriorantes e patogênicas devido o seu pH ser próximo do neutro alto em comparação a carne. Esta característica é desfavorável para a microbiota ácido láctico. Um dos objetivos da fermentação é baixar o pH rapidamente e extensivamente. Isto só pode ser obtido adicionando-se fonte de carbono monossacarídeo ou dissacarídeo (Han-Ching *et al.*, 1995).

Tabela 20 – pH e acidez em filé de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) em três amostras utilizadas na obtenção de hidrolisado biológico.

Amostras	pH	Acidez (% ácido láctico)
1	6,70 ± 0,21	0,18 ± 0,10
2	7,02 ± 0,21	0,29 ± 0,10
3	6,62 ± 0,21	0,38 ± 0,10
Média	6,78 ± 0,21	0,28 ± 0,10

O pH do pescado, logo após sua captura, apresenta geralmente uma redução. Com a morte, o processo de respiração pára e instala-se o processo de degradação do glicogênio por via glicolítica ou amilolítica, produzindo o ácido láctico (Oliveira, 2007).

Para se conhecer o efeito das bactérias ácido lácticas sobre a hidrólise das proteínas de pescado assim como a produção de ácido e diminuição de pH se comparou os resultados obtidos entre os hidrolisados.

Após 24 horas de fermentação, observa-se que o pH dos hidrolisados obtidos com LP, LL e LP+LL caíram para 4,74; 4,71 e 4,70, respectivamente (Tabela 21). O mesmo ocorreu com o teor de acidez porém em processo inverso. Após o primeiro dia, houve um aumento de 0,28 para próximo de 1,00% e do terceiro dia em diante começou a se estabilizar em torno de 4,00%. Resultados semelhantes foram encontrados por Carneiro(1991) e Lessi *et al.* (1989).

Tristão (1997), encontrou valores de pH no músculo de aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) de 6,45 e após 24 horas de fermentação o pH do ensilado foi de 3,60, mantendo-se em torno de 3,80 durante o processo de fermentação de seis dias. Quanto à acidez, inicialmente foi de 0,34% no filé do peixe, no ensilado 0,67% após 24 horas e de 3,40% após seis dias de fermentação.

Na Tabela 21 e Figuras 13, 16, 17 e 18, observa-se que houve diminuição do pH nos três hidrolisados, porém este foi menor no hidrolisado LL+LP. No caso do hidrolisado LL+LP a diminuição no pH é mais visível no segundo dia quando se têm valores de pH que se garante a estabilidade do produto (pH < 4,50). Nos hidrolisados LP e LL o pH < 4,50 se alcançou no terceiro dia de armazenamento.

Tabela 21 – pH e acidez em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtidos com adição de cepas de *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e com as duas cepas juntas (LP + LL).

Tempo (dias)	LP		LL		LP + LL	
	pH*	Acidez (% ácido lático)*	pH*	Acidez (% ácido lático)*	pH*	Acidez (% ácido lático)*
1	4,74	1,02	4,71	0,97	4,70	1,09
2	4,57	1,78	4,53	1,84	4,44	2,16
3	4,17	2,17	4,14	2,59	4,07	2,93
4	4,07	3,18	3,88	3,30	3,92	3,45
5	4,09	4,16	3,93	4,34	4,06	3,86

* Valores médios obtidos em três repetições

Kompiang, Yushadi e Creswell(1980), Lindgren e Pleje (1983), Lupín (1983), Adams et al. (1987), Areche et al. (1989), Arthur (1991), Carneiro (1991) e Lessi et al. (1989), obtiveram variações de pH entre 4,3 a 4,5 e acidez, em ácido lático de 2,8 a 3,1% em ensilado de resíduo de peixe. Para esses

pesquisadores ensilados é o produto obtido com resíduo de peixe, carboidrato e bactérias lácticas.

Os valores de pH e acidez em ácido láctico determinados por Pérez (1995) em ensilado biológico de pescado após sete dias de incubação a 30°C só se estabilizaram após o quarto dia em 4,0 e 3,50%, respectivamente. Esses valores são bem próximos aos encontrados nesta pesquisa.

Segundo Van Wik e Heyderich (1985), para se obter um ensilado estável deve-se alcançar um pH menor ou igual a 4,50 já que para valores de pH acima de 4,0 se tem o crescimento e atividade de certos microrganismos que podem conduzir à decomposição do ensilado.

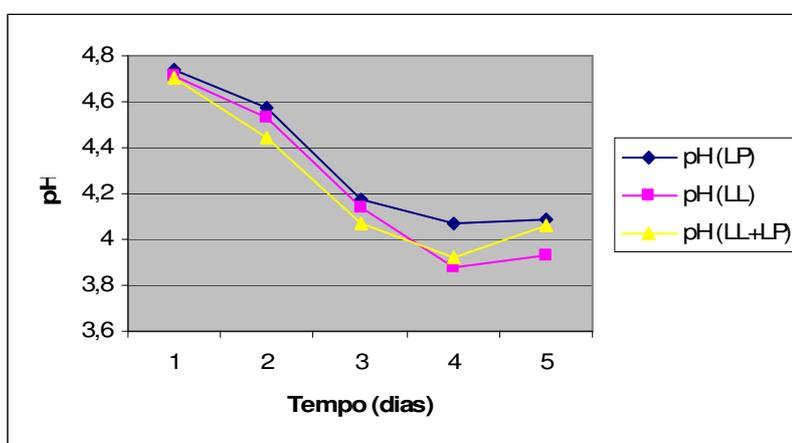


Figura 13 – pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP

Utilizou-se os valores médios do 1º dia, 2º dia, 3º dia, 4º dia e 5º dia para o cálculo da regressão e correlação em pH e acidez (Tabela 22).

Tabela 22 – Valores médios de pH e acidez entre os dias dos três hidrolisados *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

Dias	pH	Acidez (% ácido láctico)
1	4,72 ^a	1,03 ^b
2	4,51 ^a	1,93 ^a
3	4,13 ^b	2,56 ^a
4	3,96 ^b	3,31 ^a
5	4,03 ^b	4,12 ^c

Letras diferentes: diferença estatisticamente significativa.

O modelo não é significativo para LP, pois $p=0,06$ logo não é possível aplicar a equação: $\text{acidez} = a + b(\text{pH})$. Para LL o modelo é significativo ($n=5$; $p=0,022$; $r= 0,93$) e a equação que descreve a $\text{acidez}=16,53 - 3,28(\text{pH})$. O modelo também é significativo para LL+LP ($n=5$; $p=0,017$; $r= 0,94$) e a equação de regressão que descreve a $\text{acidez}=16,3 - 3,22(\text{pH})$.

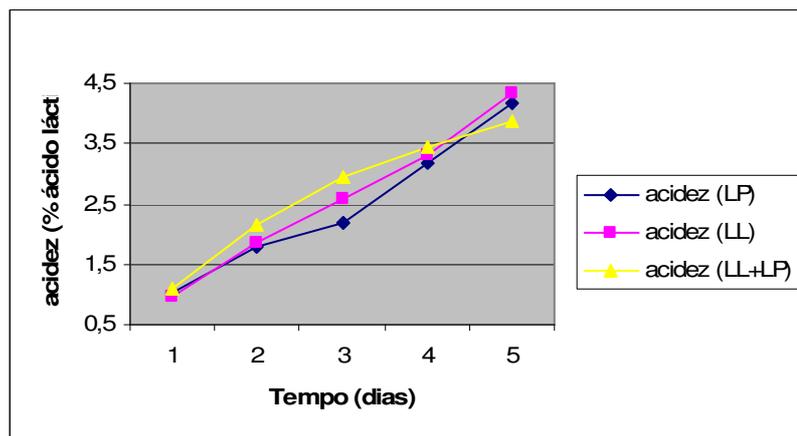


Figura 14 – Acidez em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP

De acordo com o teste de Tukey, os valores médios de pH para os dias 1 e 2 são iguais. Da mesma forma entre os dias 3, 4 e 5, porém os valores médios dos tempos 1 e 2 diferem dos valores médios dos tempos 3, 4 e 5. Para a acidez o valor médio do 1° dia difere de todos porque é o menor resultado. Os dias 2, 3 e 4 apresentaram valores médios iguais e o 5° dia difere de todos porque é o maior resultado. Não houve diferença estatisticamente significativa de pH ($p=0,3241$) e nem de acidez ($p=0,5591$) entre as espécies de bactérias estudadas e também não houve uma interação significativa entre os dois fatores: tipo de bactéria e dias de fermentação ($p=0,9799$), ($p=0,9077$) para o pH e acidez, respectivamente. Porém houve uma diferença estatisticamente significativa entre os dias tanto para o pH quanto para a acidez onde o p determinado apresenta o mesmo valor ($p=0,0000$).

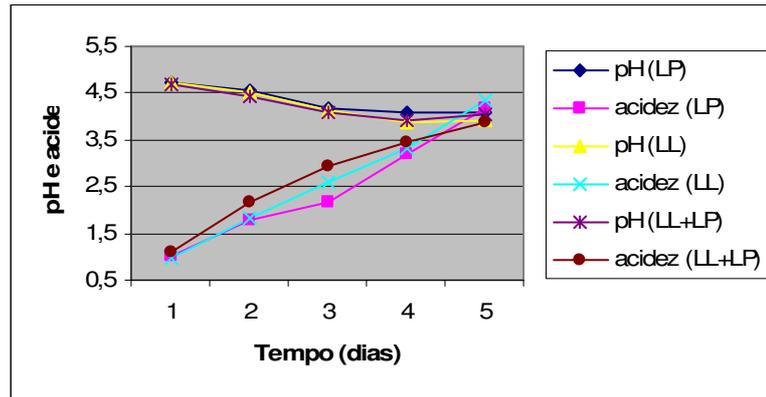


Figura 15 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP

Carneiro (1991), analisando ensilado biológico de pescado encontrou após cinco dias de fermentação 2,30% de ácido láctico e 3,65 de pH, sendo que os maiores valores foram atingidos após três dias de fermentação com valores de 3,55 e 4,64 de pH e acidez, respectivamente.

Geiger (1978) observou que o ensilado com pH 3,5 – 4,0 não está protegido contra a ação de fungos como o *Aspergillus flavus*.

Segundo Hercules e Heydenrych (1985), a qualidade do produto final de um ensilado fermentado naturalmente, está relacionada com a habilidade dos lactobacilos em produzir ácido láctico e na sua estabilidade, bem como na temperatura e tempo de armazenamento.

O pH do hidrolisado obtido com as duas cepas juntas (LP+LL) apresenta os menores valores para os cinco dias de fermentação (Tabela 21), porém os valores encontrados para os três hidrolisados são muito próximos não havendo diferença significativa entre eles (Figura 13).

A fonte de carboidrato é de grande importância para que as bactérias lácticas continuem fermentando o meio. As bactérias produtoras de ácido láctico, utilizam o açúcar como fonte de carboidrato produzindo ácido láctico, pequenas quantidades de CO₂, além de outros ácidos orgânicos. Porém o pescado não contém carboidrato suficiente para produzir uma fermentação com trocas de pH e acidez que preserve o hidrolisado. Outros autores como Lessi et al. (1989), Areche et al. (1989) e Bello et al. (1989) utilizaram 30% de farinha de trigo, sacarose e 20% de farinha de trigo, respectivamente para

conseguirem um pH próximo de 4,0 e preservação do produto. Nessa pesquisa foi possível conseguir esse mesmo pH utilizando como fonte de carboidrato 15% de açúcar comercial.

Adams *et al.* (1987) obtiveram uma diminuição de pH até 5,4 em 24 horas e 4,2 em 4 dias com 4% de glicose usando *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

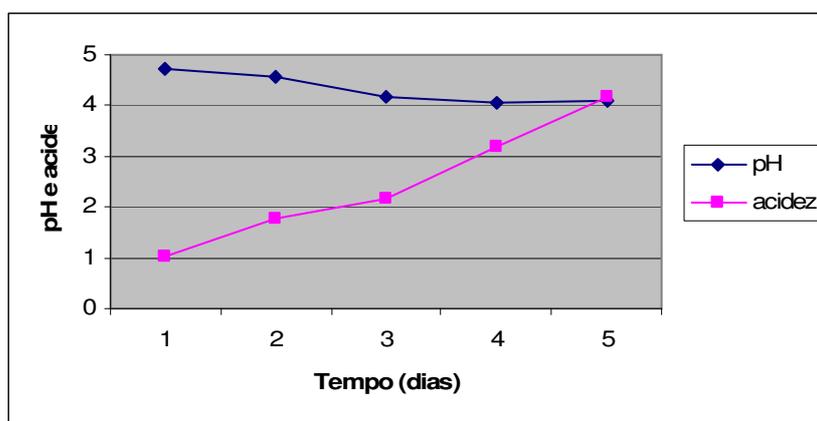


Figura 16 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP)

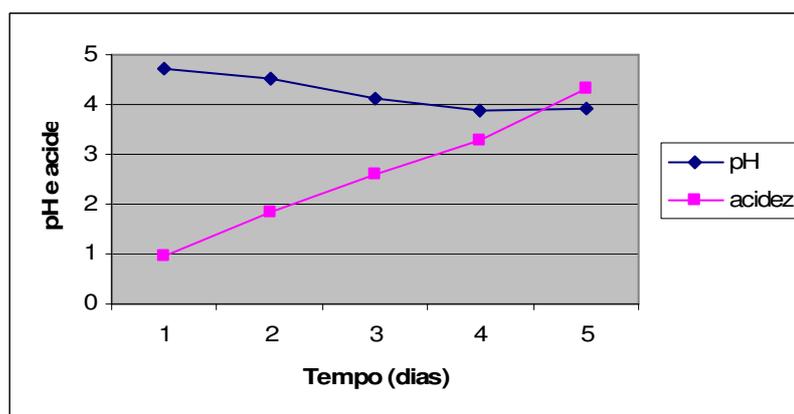


Figura 17 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactococcus lactis* (LL)

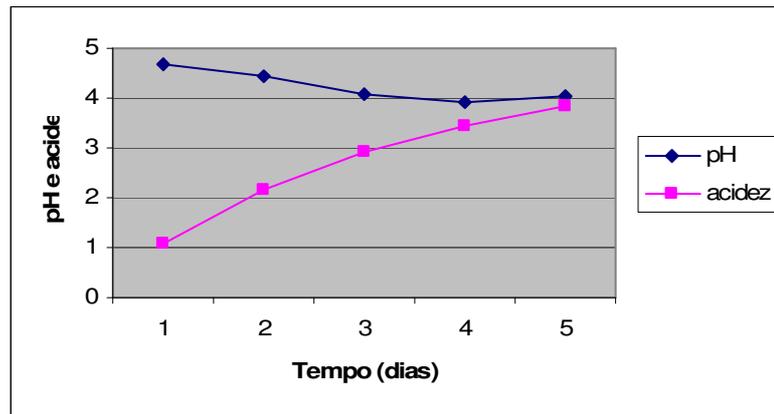


Figura 18 – Acidez e pH em hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP) + *Lactococcus lactis* (LL)

5.2.4 - Composição Físico-química de filé e de hidrolisados

Na Tabela 23, os valores determinados para umidade, proteínas, lipídios e Resíduo Mineral Fixo (R.M.F) são bem próximos aos encontrados por Castro (1999), que analisou o filé de acari-bodó durante o período de safra que no Amazonas é de setembro a janeiro e encontrou 82,36%, 16,20%, 0,29% e 0,82% para umidade, proteínas, lipídios e RMF, respectivamente.

Tabela 23 - Composição centesimal aproximada de filé de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*).

Repetições	Umidade (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	R.M.F* (%)
1	83,47 ± 0,62	14,53 ± 0,65	0,98 ± 0,07	1,02 ± 0,07
2	84,33 ± 0,62	13,47 ± 0,65	1,05 ± 0,07	1,15 ± 0,07
3	83,13 ± 0,62	14,64 ± 0,65	1,11 ± 0,07	1,12 ± 0,07
Média	83,64 ± 0,62	14,21 ± 0,65	1,05 ± 0,07	1,10 ± 0,07

*R.M.F – Resíduo Mineral Fixo.

Soccol (2002) analisando filé de tilápia determinou teores de umidade, proteína, lipídios e cinza de 78,63%, 16,73%, 3,05% e 0,91%, respectivamente. Os valores de umidade e cinza são bem próximos aos encontrados nesta pesquisa e das proteínas e das gorduras são mais elevados (Tabela 23). Essa variação nos teores de umidade, cinza, proteína e gordura podem ocorrer entre as espécies de pescado devido à idade, sexo, maturidade sexual, regime alimentar e estação sazonal. De acordo com Sikorski *et al.* (1990) os pescados magros apresentam um alto teor de umidade, podendo atingir 83%.

Batista (2002) analisando o filé de matrinxã (*Brycon cephalus*) oriundo da piscicultura encontrou os seguintes valores de umidade (72,33%), proteínas (18,43%), lipídios (7,49%) e RMF (0,98%). Esse pescado foi classificado como gordo de acordo com Almás (1981) que cita como limite de variação do teor de gordura entre 7,0 – 14,0% para peixe gordo.

Lessi (1999) também avaliou o matrinxã de cativeiro e encontrou 69,50% de umidade, 11,17% de lipídios, 17,61% de proteínas e 0,99% de cinza. O autor menciona que o alto teor de lipídios determinados pode ter sido influenciado pela alimentação ministrada à espécime.

Os filés de acari-bodó foram lavados e colocados em recipientes para posterior análises de composição centesimal, talvez isso explique os altos valores de umidade encontrados (Tabela 24). Carvalho (2003) observou que houve elevação no teor de umidade após lavagem nos filés de jaraqui e aracu de 83% para ambas as espécies.

O estado de frescor da matéria-prima também afeta as propriedades de retenção de água, estando diretamente relacionado com a perda de qualidade, retendo mais água conforme o nível de deterioração do peixe, porém a matéria-prima utilizada nos experimentos para obtenção dos hidrolisados estava com boa qualidade uma vez que o peixe encontrava-se vivo, sendo abatido no laboratório quando da obtenção do produto.

Observa-se o inverso no que se refere à análise de proteínas, possivelmente pela remoção das proteínas sarcoplasmáticas e outras substâncias solúveis em água como enzimas proteolíticas, pigmentos, sangue e compostos heme presentes no músculo do peixe, permanecendo somente parte das proteínas miofibrilares, insolúveis em água.

Segundo Junk (1985), na região Amazônica há uma marcante sazonalidade nos níveis de umidade e gordura. Na época da cheia, os níveis de gordura são mais elevados chegando nos peixes inteiros acima de 15% e de 5% para os filés, enquanto que o teor de umidade ficou entre 65% e 75%, respectivamente. O baixo teor lipídico do músculo de *Liposarcus pardalis* foi descrito por esse autor. Os pescados magros armazenam lipídios nas vísceras e não nos músculos (Huss, 1998).

Muitas outras espécies de peixes gordos encontrados na região amazônica também estão associadas à variação sazonal, numa correlação inversa com o conteúdo de umidade do músculo (Jesus, 1999).

Os períodos de seca são caracterizados pela maior competição por alimentos quando comparados com a cheia, quando os rios da bacia amazônica saem de seus leitos inundando as áreas de várzea. Isso propicia abrigo e alimento para os peixes.

Carvalho (2003) analisou a composição química de duas espécies amazônicas durante os meses de maio e setembro: o jaraqui (*Semaprochilodus* sp) e o aracu (*Shizodon fasciatum*) e observou que a quantidade de gordura encontra-se principalmente na cavidade abdominal sendo mais elevado no mês de maio e menor em setembro nas duas espécies. O conteúdo de proteínas nas duas espécies variou entre 18% e 20%.

Moroni (2005) verificou em estudos realizados com o acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) que houve variação na composição química desse animal entre os períodos de seca e cheia. Os teores de umidade e proteína foram respectivamente maiores nos meses de março (seca) e agosto (cheia). Essas diferenças são reflexos da condição biológica *antemortem* do animal.

O acari-bodó é um peixe sedentário, isto é, não realiza migrações (Batista, 1998), mas no mês de março podem-se encontrar alguns animais desovados, com desvio da síntese protéica para proteínas constitutivas dos ovócitos e não para as proteínas do músculo (Neves e Ruffino, 1998 apud Moroni, 2005).

O conteúdo de carboidratos no músculo do pescado é muito baixo, geralmente inferior a 0,5% (Huss, 1998). Os resultados obtidos por Moroni (2005) corroboram com esses valores, não apresentando quantidades maiores

da fração “Nifext”, que corresponde aos carboidratos. No entanto, esse baixo percentual não significa pouca influência nos metabolismo *posmortem*, pois o carboidrato acumulado na forma de glicogênio determina o prolongamento do tempo de entrada em *rigor mortis*.

Os baixos valores encontrados para os lipídios (Tabela 23) são muito bons, pois resulta em produto final magro o que é conveniente pois evita a oxidação, ranço da gordura e confere ao produto final um leve odor e sabor agradável de pescado.

Os pescados magros, como o acari-bodó, quando sofrem variações o fazem substituindo a perda de proteínas para suprir o déficit energético (neoglicogenese) por água (Moroni, 2005).

A disponibilidade de nutrientes para os peixes é que determina a concentração de lipídios, sendo que alguns fatores influenciam na dita disponibilidade, como a estação do ano, o local de captura, a temperatura e o ciclo reprodutivo da espécie. Desta forma, os peixes prestam respostas a esses fenômenos através de migrações periódicas, tanto por razões reprodutivas, como tróficas. O ciclo hidrológico tem efeito marcante sobre o comportamento dos peixes, provavelmente também exerça influência sobre a sua composição química, e conseqüentemente, sobre o seu valor nutricional (Jesus *et al.*, 2006).

É importante que espécies com alto teor de lipídios sejam evitadas na obtenção de hidrolisados, devido à dificuldade de sua remoção e de sua oxidação o que resultaria em alterações de sabor, cor, textura, valor nutricional.

A oxidação de lipídios pode causar a formação de peróxidos que podem complexar às proteínas através de ligações físicas e covalentes. Ligações covalentes entre produtos oxidados e proteínas podem destruir aminoácidos como triptofano, oxidar a metionina e ligar a lisina a outros compostos tornando estes aminoácidos indisponíveis (Nelson e Cox, 2000 *apud* Borghesi, 2004).

Utilizando-se o teste de ANOVA para dois fatores (composição química centesimal) e (tipo de hidrolisado), constatou-se que não houve diferença significativa para um alfa de 5% de significância entre hidrolisado p(0,9653) e interação p(0,1535).

De acordo com o teste de Tukey, verificou-se para todos os hidrolisados que houve diferença significativa na composição química $p(0,0000)$, sendo que as proteínas e os carboidratos apresentaram porcentagem média iguais, porém a porcentagem média de ambos diferiu da porcentagem média de umidade, lipídios e cinzas. E a porcentagem média em todos os hidrolisados de umidade, lipídios e cinzas foi igual. Em todos os hidrolisados as maiores porcentagens médias foram de proteínas e carboidratos e as menores porcentagens médias de lipídios, cinzas e umidade.

Tabela 24 - Composição físico-química de filé e de hidrolisado biológico de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) liofilizado.

Matéria- prima/ Hidrolisado	pH	Acidez (% ácido lático v/p)*	Umidade (%)*	Proteínas (%)*	Lipídios (%)*	R.M.F (%)*	Carboidratos (%)*
Filé	6,78	0,28	84,10	13,14	1,65	1,10	ND
LP	4,09	4,16	3,39	45,95	3,28	3,18	43,20
LL	3,93	4,34	2,30	46,21	3,51	2,31	45,54
LL+LP	4,06	3,86	2,35	44,86	2,86	3,07	46,57

ND: Não determinado

*: Valores médios de três repetições.

LP: *Lactobacillus plantarum*

LL: *Lactococcus lactis*

A baixa umidade encontrada nos hidrolisados já era esperada por se tratar de um produto liofilizado. A proteína variou de 44,86% a 46,21%; lipídios de 2,86% a 3,51%; cinzas 2,31% a 3,18%; e carboidratos 43,20% a 46,57% (Tabela 24). Não houve diferença entre os teores de composição analisados para os hidrolisados, segundo Windsor (1969) a composição química de produtos protéicos de pescado depende da natureza da matéria-prima usada e do processo de produção.

Tabela 25 - Composição centesimal aproximada de hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactobacillus plantarum* (LP).

Repetições	Umidade*	Proteínas*	Lipídios*	R.M.F*	Carboidratos*
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	3,39	44,59	3,27	3,06	44,98
2	3,46	44,18	3,46	3,75	44,25
3	4,05	49,03	3,12	2,72	40,37

* em base seca

Tabela 26 - Composição centesimal aproximada de hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactococcus lactis* (LL).

Repetições	Umidade*	Proteínas*	Lipídios*	R.M.F*	Carboidratos*
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	3,01	45,20	3,63	2,51	45,60
2	2,17	45,53	3,54	2,32	46,21
3	1,73	47,91	3,37	2,11	44,81

* em base seca

Tabela 27 - Composição centesimal aproximada de hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtido com *Lactococcus lactis* + *Lactobacillus plantarum* (LL+LP).

Repetições	Umidade*	Proteínas*	Lipídios*	R.M.F*	Carboidratos*
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	2,21	44,42	2,79	2,46	47,64
2	2,74	42,28	3,31	3,57	47,89
3	2,11	47,89	2,49	3,18	44,19

* em base seca

De acordo com Vidotti *et al.* (2003), o baixo teor de proteínas 59,61%, 42,09% e 35,84% para peixe marinho, peixe de água doce e resíduo de tilápia, respectivamente determinado em ensilado fermentado se deve a adição de caldo de cana (15%) e *Lactobacillus plantarum* (5%). O valor determinado de proteína em ensilado de peixe de água doce encontra-se bem próximo ao encontrado nessa pesquisa (Tabelas 25, 26 e 27), porém o processo de De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista "Acta Amazônica".

fermentação foi a uma temperatura de 28-32°C/31 dias em um período maior que o desenvolvido nessa pesquisa (5 dias).

Tristão (1997) preparou ensilado de peixe com adição de açúcar e bactérias ácido láctico e após seis dias de fermentação encontrou um teor de proteínas de 12,68% e de carboidrato 11,96% em base úmida, portanto valores bem próximos. Neste estudo também foi possível verificar essa proximidade de valores entre as proteínas e os açúcares, porém os nossos resultados são de um produto liofilizado, portanto bem maiores (Tabelas 25, 26 e 27).

Resultado semelhante foi determinado por Carneiro (1991) que obteve um ensilado com 13,27% de proteínas e 12,41% de carboidratos.

Bello et al. (1989) também encontraram resultado similar para ensilado elaborado com 15% de melão e 1% de inóculo: 16,76% de proteínas e 11,05% de carboidratos.

Os altos valores determinados para os carboidratos talvez se devam ao curto período de fermentação (5 dias). Tempo insuficiente para que todo o açúcar fermentecível fosse transformado em ácido láctico.

Dentre os hidrolisados, LL+LP foi o que apresentou o menor resultado para umidade, lipídios, proteínas e o maior teor de carboidratos (Figuras 19, 20, 21 e 23). Observa-se no entanto que para os parâmetros analisados (umidade, proteínas, lipídios, RMF e carboidrato) os valores estão muito próximos, ou seja, tanto as culturas juntas quanto separadas, apresentam resultados semelhantes (Figura 24).

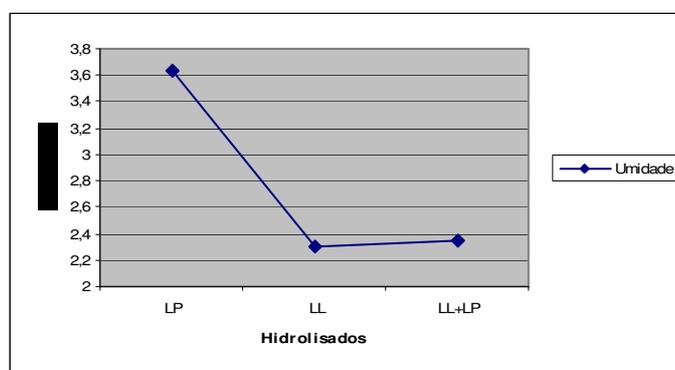


Figura 19 – Valores médios de umidade em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

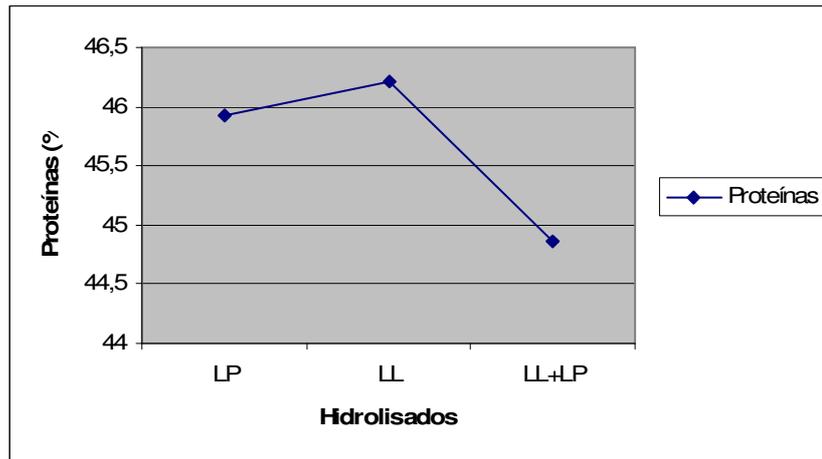


Figura 20 – Valores médios de proteínas em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

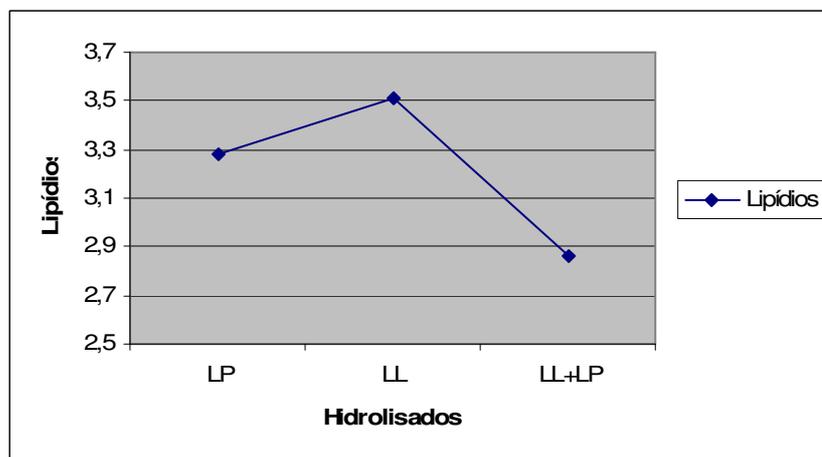


Figura 21 – Valores médios de lipídios em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

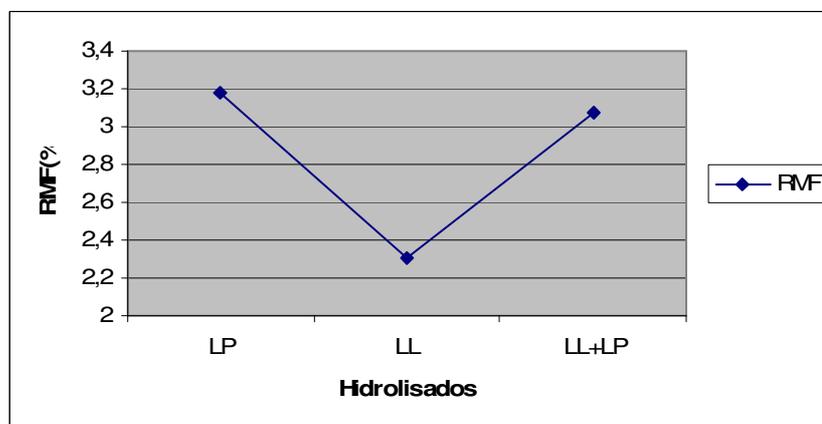


Figura 22 – Valores médios de RMF em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista “Acta Amazônica”.

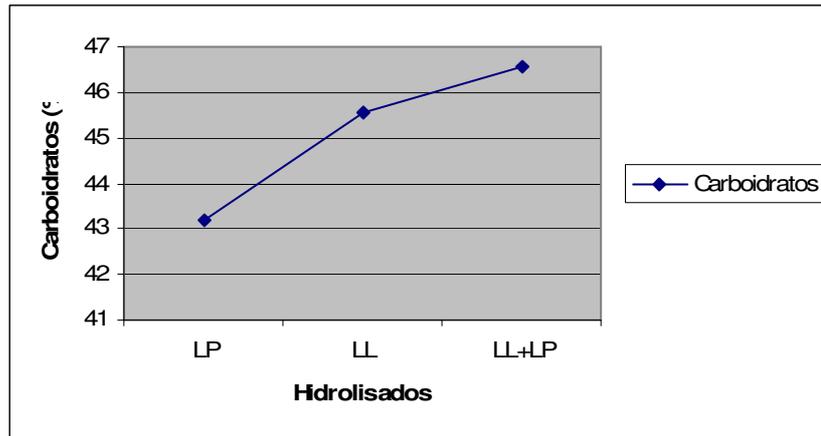


Figura 23 – Valores médios de carboidratos em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

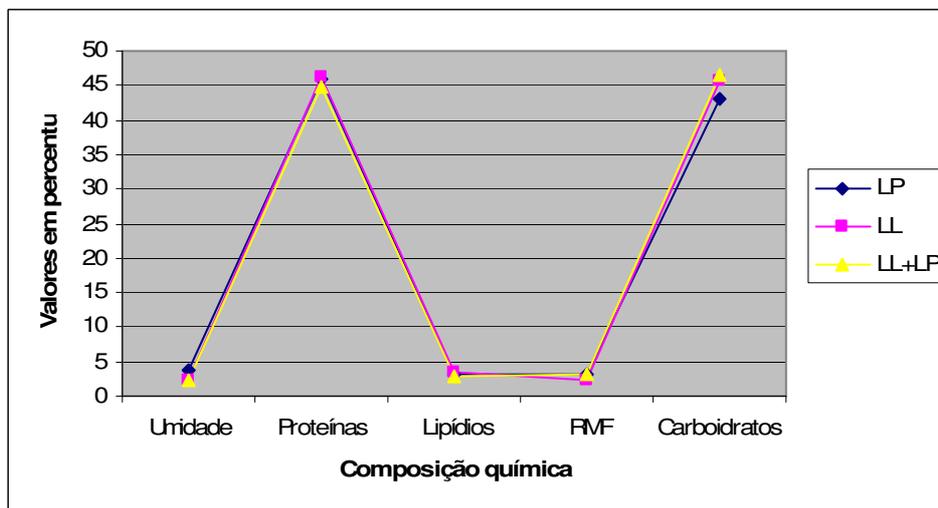


Figura 24 – Valores médios de composição centesimal aproximada em três hidrolisados de acari-bodó obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e LL+LP.

Os valores de proteínas 11,36%, lipídios 1,19%, cinzas 31,87% e carboidratos 1,94% foram encontrados por Cifuentes et al. (1989) em pesquisa com hidrolisado ácido de jurel (*Trachurus murphys*),

Em trabalhos com ensilado de sardinha (cabeça e vísceras), utilizando bactérias lácticas do iogurte realizado por Areche e Berenz (1989), os resíduos cozidos de sardinha apresentaram uma umidade similar ao pescado inteiro (71,06%), 6,23% em gordura, um teor de proteínas igual ao de algumas espécies marinhas (16,16%) e uma elevada porcentagem de cinzas em comparação ao pescado inteiro devido a uma grande porcentagem de cálcio

que se encontra na cabeça. O ensilado úmido, apresentou uma menor porcentagem de umidade (65,80%), em razão dos componentes sólidos estarem agregados ao açúcar e ao sal; a porcentagem de gordura (8,40%) aumentou ligeiramente por diminuição de porcentagem de umidade; as proteínas se mantiveram (16%); as cinzas se incrementam (7,24%) e o valor calórico foi um pouco mais elevado que os resíduos, devido à presença de carboidratos agregados que propiciaram a fermentação. O ensilado seco apresentou 10,20% de umidade e 16,20% de gordura. O valor de gordura foi considerado alto pelos autores quando comparado com a farinha de pescado inteiro que é de 10% aproximadamente.

5.2.5 - Composição centesimal de biscoitos doces

Os valores determinados na composição química dos biscoitos doces obtidos com os três hidrolisados são semelhantes, não havendo diferença significativa entre os parâmetros analisados (Tabela 28).

Tabela 28 – Composição físico-química de biscoitos doces obtidos com a adição de hidrolisados biológicos de acari-bodó.

Biscoitos	Umidade (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	R.M.F (%)
Controle (CO)	50,94	1,91	45,03	1,01
<i>L. plantarum</i> (LP)	46,30	4,35	47,73	1,12
<i>L. lactis</i> (LL)	45,37	4,33	48,62	1,08
LL+LP	47,14	4,44	47,10	1,06

Observa-se que houve um aumento no teor protéico de todos os biscoitos adicionados de hidrolisado biológico em relação ao controle (Tabela 28), logo a adição de hidrolisados protéicos pode contribuir para o enriquecimento desse tipo de produto.

Centenaro *et al.* (2007) adicionaram proteína de peixe em pão e também constataram um aumento no teor desse constituinte.

Os altos valores de lipídios (Tabela 28) se devem a adição de margarina, ingrediente utilizado no seu preparo.

5.2.6 - Aminoácidos

Os aminoácidos ácido glutâmico (14,44%), ácido aspártico (9,27%), lisina (8,37%), leucina (7,06%), arginina (5,39%) e alanina (5,97%) determinados no filé de bodó (Tabela 29) estão próximos dos determinados por Maia e Ogawa (2000), em tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e curimatá (*Prochilodus scrofa*). Os teores de aminoácidos encontrados por esses autores foram semelhantes para as quatro espécies, onde o ácido glutâmico variou de 19 a 22%, o ácido aspártico de 11 a 14%, lisina 10 a 13%, leucina 9 a 12%, arginina 7 a 9% e alanina 7 a 8% (Tabela 29).

Tabela 29 – Aminoácidos totais em filé de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau 1855).

Aminoácidos totais	(g/100g)
Ácido Aspártico	9,27
Treonina	4,13
Serina	3,61
Ácido Glutâmico	14,44
Prolina	3,61
Glicina	4,54
Alanina	5,97
Cistina	0,16
Valina	4,52
Metionina	0,33
Isoleucina	3,83
Leucina	7,06
Tirosina	2,62
Fenilalanina	3,53
Lisina	8,37
Amônia	1,37
Histidina	1,78
Arginina	5,39

Os valores de aminoácidos determinados no filé de acari-bodó são maiores que os de filé de tilápia do Nilo determinado por Arruda (2004), exceto para cistina, glicina, metionina, tirosina e histidina (Tabela 30).

Tabela 30 - Aminoácidos totais em filé de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Aminoácidos totais	Filé de acari-bodó (g/100g)	Filé de tilápia do Nilo (g/100g)*
Ácido Aspártico	9,27	8,43
Treonina	4,13	3,73
Serina	3,61	3,18
Ácido Glutâmico	14,44	12,67
Prolina	3,61	3,29
Glicina	4,54	4,63
Alanina	5,97	5,10
Cistina	0,16	0,70
Valina	4,52	3,91
Metionina	0,33	2,30
Isoleucina	3,83	3,61
Leucina	7,06	6,46
Tirosina	2,62	2,71
Fenilalanina	3,53	3,36
Lisina	8,37	7,48
Amônia	1,37	ND
Histidina	1,78	2,16
Arginina	5,39	5,09

* Arruda (2004); ND: Não determinado

Comparando os valores de aminoácidos essenciais determinados no filé de acari-bodó com os do padrão FAO, observa-se que a treonina, leucina, lisina, arginina, fenilalanina+tirosina são maiores que os valores recomendados nesta mesma ordem decrescente de grandeza e apenas a metionina, valina, isoleucina e histidina são menores, (Tabela 31).

Tabela 31 – Aminoácidos essenciais em filé de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau 1855) comparado com o padrão FAO.

Aminoácidos essenciais	Filé de bodó (g/100g)	Padrão FAO (g/100g)
Treonina	4,13	4,00
Valina	4,52	5,00
Metionina	0,33	3,50
Isoleucina	3,83	4,00
Leucina	7,06	7,00
Lisina	8,37	5,50
Histidina	1,78	2,00
Arginina	5,39	5,00
Fenilalanina + Tirosina	6,15	4,29

Considerando-se o aminoácido lisina para os três hidrolisados, observa-se que este aminoácido apresenta um valor próximo ao do padrão da FAO, sendo encontrado em maior concentração no hidrolisado com meio inóculo de *Lactobacillus plantarum* (Tabela 32).

O ácido glutâmico foi o aminoácido encontrado em maior valor para os três hidrolisados, seguido do ácido aspártico (Tabela 32).

Houve um pequeno aumento de amônia, devido provavelmente a reações de desaminação, para os hidrolisados obtidos com *Lactobacillus plantarum* e para o hidrolisado obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* (Tabela 32).

O hidrolisado obtido com o *Lactobacillus plantarum* é o que apresenta os maiores valores para os aminoácidos analisados, exceto para a prolina, cistina, fenilalanina e histidina que foram maiores para o hidrolisado obtido com o *Lactococcus lactis*, e para o hidrolisado obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis*, respectivamente (Tabela 32).

Tabela 32 – Aminoácidos totais em hidrolisado liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau 1855) obtido com a adição de cepas de *Lactobacillus plantarum* (LP) e *Lactococcus lactis* (LL).

Aminoácidos Totais	LP (g/100g)	LL (g/100g)	LL+LP (g/100g)
Ácido Aspártico	5,14	4,58	3,86
Treonina	2,27	1,93	1,53
Serina	2,17	1,60	1,46
Ácido Glutâmico	7,59	6,52	6,25
Prolina	1,32	2,06	1,66
Glicina	2,60	2,19	1,65
Alanina	3,58	2,97	2,55
Cistina	0,19	0,20	0,05
Valina	2,27	2,06	1,70
Metionina	0,69	0,41	0,36
Isoleucina	2,23	1,95	1,52
Leucina	3,89	3,61	3,05
Tirosina	1,77	1,58	1,10
Fenilalanina	1,70	2,00	1,67
Lisina	4,93	4,47	4,23
Amônia	1,62	1,35	1,44
Histidina	1,14	1,10	1,30
Arginina	3,06	2,04	2,21

Com relação aos aminoácidos essenciais (Tabela 33), observa-se que a lisina e a leucina apresentaram os maiores valores para o hidrolisado obtido com o *Lactobacillus plantarum* havendo uma tendência à diminuição para os hidrolisados obtidos com *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* juntos.

De acordo com Borghesi (2004), uma explicação provável para a redução do valor nutricional, pode ser o fato dos aminoácidos livres serem rapidamente desviados da síntese protéica e entrarem na rota catabólica por estarem mais disponíveis para serem utilizados como fonte de energia do que as proteínas intactas.

Borghesi (2004) cita autores como Stone e Hardy (1986), Fagbenro e Bello-Olusoji (1994), Fagbenro e Jauncey (1998), Johnson et al. (1985) que constataram ser os altos níveis de aminoácidos livres na dieta que interferem no mecanismo de absorção de aminoácidos e peptídios de cadeia curta e que

a presença de hidroxilas provenientes do açúcar, entram na reação de Maillard, resultando em diminuição do valor nutricional da silagem.

Tabela 33 – Aminoácidos livres em hidrolisado liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardallis*, Castelnau 1855) obtido com a adição de cepas de *Lactobacillus plantarum* (LP) e *Lactococcus lactis* (LL).

Aminoácidos Livres	LP (mg/100g)	LL (mg/100g)	LL+LP (mg/100g)
Ácido Aspártico	239,51	359,21	217,96
Treonina	194,04	184,70	143,59
Serina	290,23	252,52	201,24
Ácido Glutâmico	82,87	177,73	72,43
Prolina	173,16	290,65	156,38
Glicina	256,89	222,63	201,01
Alanina	830,56	740,27	685,06
Cistina	17,29	13,79	ND*
Valina	273,86	242,21	169,17
Metionina	206,66	170,77	153,02
Isoleucina	147,92	152,31	145,94
Leucina	401,32	365,55	435,04
Tirosina	58,45	53,28	60,71
Fenilalanina	256,78	242,80	167,67
Lisina	380,14	362,77	328,70
Amônia	186,22	178,18	193,23
Histidina	46,77	47,81	15,34
Arginina	93,60	ND	84,04

ND: Não determinado

Os aminoácidos livres encontrados em maior concentração para o hidrolisado obtido com a cepa de *Lactobacillus plantarum* foram serina, treonina, glicina, alanina, cistina, valina, metionina, fenilalanina, lisina, arginina. Para o hidrolisado obtido com *Lactococcus lactis* foram ácido glutâmico, prolina, ácido aspártico, isoleucina, histidina e para o hidrolisado obtido com as duas cepas juntas (LL+LP) foram leucina, tirosina (Tabela 33).

Dentre os aminoácidos essenciais ao homem, observa-se que a treonina, metionina, valina, fenilalanina e lisina são maiores no hidrolisado obtido com *Lactobacillus plantarum*. A isoleucina foi maior no hidrolisado obtido com *Lactococcus lactis* e a leucina no hidrolisado obtido com as duas culturas juntas LL+LP (Tabela 33).

Pérez (1995) cita diversos autores (Backhoff, 1976; Raa e Gildberg 1982; Jackson e Cowey, 1984; Hall e Ledward, 1986) que mencionam ser os aminoácidos relativamente estáveis no que eles chamam de ensilado de peixe (produto hidrolisado após adição de enzimas, ácidos ou de bactérias ácido láctico), uma vez que somente 8% de nitrogênio amino se transforma em amônia. O triptofano tende a se decompor na hidrólise ácida, mas a metionina e histidina são mais estáveis e a tirosina se separa progressivamente da fase aquosa por cristalização.

Em baixas temperaturas as perdas de aminoácidos são menores porém a hidrólise é muito lenta. Há uma parte do teor de aminoácidos que é normalmente retida na fase sólida e se tem observado uma destruição progressiva das vitaminas do complexo B provavelmente por tiaminasas endógenas em ensilados ácidos (Tomé, 1993).

Vidotti (2001) obteve ensilado fermentado com a adição de 5% de *Lactobacillus plantarum* e 15% de melaço (caldo de cana) e comparou os aminoácidos essenciais com silagem ácida. O autor observou que a lisina, histidina, treonina, metionina e fenilalanina e tirosina apresentaram-se em maiores teores, quando comparados ao padrão da FAO, enquanto que os aminoácidos valina e isoleucina estão em deficiência nas silagens ácidas, e o aminoácido arginina, nas silagens fermentadas. A hidrólise das proteínas em aminoácidos livres torna a silagem uma fonte de aminoácidos mais disponíveis para a biossíntese protéica.

Amano (1962) e Tarky (1970) apud Cifuentes *et al.* (1989), destacam que o rendimento em aminoácido que se obtém com a hidrólise ácida é superior a hidrólise enzimática, com o agravante de que esta última se desenvolve sabores amargos bastante acentuados. Embora a hidrólise ácida afete o triptofano, a fenilalanina e a prolina.

O rendimento muito alto em aminoácidos estaria baseado no nível que o pH alcança (2,0) é possível que exista uma ativação de enzimas endógenas, como por exemplo, pepsina (Cifuentes *et al.*, 1989).

Quando comparada à composição em aminoácidos totais dos hidrolisados com a da matéria-prima (Tabela 34), observa-se que de uma maneira geral há uma tendência à diminuição dos teores destes nos hidrolisados, exceto para o aminoácido metionina onde houve um aumento para todos os hidrolisados.

Tabela 34 - Aminoácidos totais em filé e hidrolisado biológico liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtidos com cepas de *Lactobacillus plantarum* (LP) e *Lactococcus lactis* (LL).

Aminoácidos totais	Filé (g/100g)	LP (g/100g)	LL (g/100g)	LL+LP (g/100g)
Ácido Aspártico	9,27	5,14	4,58	3,86
Treonina	4,13	2,27	1,93	1,53
Serina	3,61	2,17	1,60	1,46
Ácido Glutâmico	14,44	7,59	6,52	6,25
Prolina	3,61	1,32	2,06	1,66
Glicina	4,54	2,60	2,19	1,65
Alanina	5,97	3,58	2,97	2,55
Cistina	0,16	0,19	0,20	0,05
Valina	4,52	2,27	2,06	1,70
Metionina	0,33	0,69	0,41	0,36
Isoleucina	3,83	2,23	1,95	1,52
Leucina	7,06	3,89	3,61	3,05
Tirosina	2,62	1,77	1,58	1,10
Fenilalanina	3,53	1,70	2,00	1,67
Lisina	8,37	4,93	4,47	4,23
Amônia	1,37	1,62	1,35	1,44
Histidina	1,78	1,14	1,10	1,30
Arginina	5,39	3,06	2,04	2,21

De acordo com Ogawa e Maia (1999), as perdas de aminoácidos podem ser oriundas de alterações bioquímicas ou devido à atividade bacteriana que promove a descarboxilação, na qual as enzimas reagem com aminoácidos do grupo COOH terminal, formando aminas reativas e CO₂. Quando ocorrem

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista "Acta Amazônica".

rompimentos entre as ligações carbônicas são provocadas alterações irreversíveis nas várias funções da proteína, resultando em alterações na atividade biológica, solubilidade, capacidade de reação em grupos constituintes (resíduos de aminoácidos), alterações no tamanho e na formação de moléculas, ou seja, a desnaturação protéica.

Vidotti (2003) comparou a composição de aminoácidos de silagem ácida e fermentada com *Lactobacillus plantarum* com as matérias-primas peixe marinho, peixe de água doce e resíduo de tilápia e constatou um aumento na histidina, treonina para ambos os processos em relação a todas as matérias-primas e uma diminuição nos níveis de valina, isoleucina e leucina.

Para Johnson *et al.* (1985) a redução no teor de aminoácido pode ocorrer provavelmente devido a reações entre grupos α -aminos e grupos aldeídos e a extensão destas alterações avança com o estágio da reação.

Morales-Ulloa e Oetterer (1997) analisando a composição em aminoácidos de silagens com as matérias-primas, observaram que houve um aumento nos teores dos aminoácidos histidina, treonina e serina nos dois tipos de processamento das três matérias-primas utilizadas. Ocorreu também uma diminuição nos teores dos aminoácidos valina, isoleucina e leucina para todos esses produtos. Essa redução pode ter ocorrido, provavelmente devido à reações entre grupos α aminos e grupos aldeídos dos aminoácidos durante o processo de ensilagem. O ácido glutâmico é o aminoácido encontrado em maior concentração para todas as silagens.

Os maiores teores de aminoácidos determinados por Thiansilakul *et al* (2007) em hidrolisado enzimático foram para alanina, lisina, histidina e leucina, 14%, 13,9%, 11,2% e 10,1%, respectivamente.

De acordo com a Tabela 35, os aminoácidos do hidrolisado biológico são maiores do que o determinado para o ensilado químico exceto para a histidina e a metionina.

Tabela 35 - Aminoácidos em ensilado químico comparado com três hidrolisados biológico liofilizado de acari-bodó (*Liposarcus pardalis*) obtidos com *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactococcus lactis* (LL) e os dois juntos (LL+LP).

Aminoácidos	Ensilado químico (g/100g)*	LP (g/100g)	LL (g/100g)	LL+LP (g/100g)
Treonina	1,02	2,27	1,93	1,53
Valina	1,08	2,27	2,06	1,70
Leucina	1,00	3,89	3,61	3,05
Isoleucina	1,61	2,23	1,95	1,52
Lisina	1,21	4,93	4,47	4,23
Arginina	1,16	3,06	2,04	2,21
Histidina	1,40	1,14	1,10	1,30
Metionina	1,24	0,69	0,41	0,36
Fenilalanina + Tirosina	1,56	3,47	3,58	2,77

* Borgstrom, 1967 *apud* Oetterer,2002

5.2.7 – Avaliação sensorial

Segundo Bertullo (1989), as características da qualidade sensorial do ensilado de pescado se baseiam no aroma, cor, consistência e, eventualmente no sabor.

Durante as primeiras 24 horas a mistura peixe, açúcar e bactérias ácido láctico apresentou cor rosada, textura viscosa e um odor natural de peixe. Após o segundo dia a cor foi escurecendo e sua consistência foi mudando.

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista “Acta Amazônica”.

Estas características foram mudando de acordo com a ação das bactérias produtoras de ácido láctico, resultando no abaixamento do pH e em um aumento de acidez. As variações de pH e do teor de acidez beneficiaram a hidrólise das proteínas. Com cinco dias o hidrolisado apresentou uma cor castanha escuro. A textura apresentava-se cremosa quase líquida.

O sabor é um fator importante para a aceitação de hidrolisados como aditivos em alimentos. Vários autores têm informado como características de hidrolisados protéicos enzimáticos um sabor amargo e demonstraram estar condicionado a cadeias longas dos polipeptídios e a proporção de aminoácidos hidrofóbicos (Martone *et al.*, 2003).

a) Biscoito doce

O grau de aceitabilidade de um alimento por parte dos consumidores é afetado por fatores inerentes ao próprio indivíduo e ao ambiente que o circunda. A preferência por um produto está ligada aos hábitos e padrões culturais, além da sensibilidade individual, idade, a fidelidade a determinadas marcas, a higiene e o local de consumo, o tipo e o número de acompanhantes, entre outros aspectos (Dasso, 1999).

A partir do teste sensorial de aceitação (anexo 1), encontrou-se o valor de 60% para o biscoito preparado com adição de 2,5% de hidrolisado protéico de peixe. Sendo, portanto, considerado melhor, segundo os julgadores. Assim, foram eliminados os biscoitos adicionados de 5,0%, 7,5% e 10,0% por serem os menos aceitos devido ao forte gosto de pescado.

Apenas um julgador “desgostou extremamente” dos biscoitos adicionados com hidrolisado, no que se refere aos atributos sabor e textura.

O biscoito adicionado do hidrolisado LL+LP foi o preferido pelos julgadores. O percentual de julgadores que disseram “gostei muito” foi de 32,14%; 39,29%; 28,57%; 50% e 32,14% para os atributos aparência, cor, odor, sabor e textura, respectivamente.

6- CONCLUSÕES

De acordo com as condições desta pesquisa, pode-se concluir:

O filé de branquinha apresentou uma carga microbiana inicial elevada para coliformes total e termotolerante. Conseqüentemente os hidrolisados obtidos de branquinha apresentaram contaminação microbiana elevada para esses microrganismos.

O filé de acari-bodó apresentou ausência de coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e baixa contagem de coliformes totais.

Não houve diferença significativa entre as duas bactérias em estudo no que se refere à flora deteriorante e patogênica, uma vez que a aplicação de *Lactobacillus plantarum* isoladamente ou associado ao *Lactococcus lactis* no músculo de acari-bodó diminui a população de bactérias mesófilas, coliformes total e termotolerante.

Tanto o *Lactobacillus plantarum* quanto o *Lactococcus lactis* podem ser empregados para a obtenção de hidrolisado biológico de pescado.

Para os três hidrolisados os valores de pH e acidez determinados são satisfatórios para a conservação e manutenção do produto não havendo diferença significativa entre eles.

O hidrolisado obtido com o *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* juntos foi o que apresentou o menor resultado para umidade, lipídios, proteínas e o maior teor de carboidratos.

O hidrolisado obtido com o *Lactobacillus plantarum* apresentou os maiores valores para os aminoácidos analisados, assim como para os aminoácidos essenciais leucina, treonina, metionina, valina, fenilalanina e lisina.

O ácido glutâmico é o aminoácido encontrado em maior concentração para os três hidrolisados.

Na análise sensorial, observou-se que aos 5 dias de fermentação os hidrolisados apresentaram características satisfatórias.

Os biscoitos doces adicionados de hidrolisado biológico de acari-bodó foram bem aceitos, sendo o biscoito obtido com o hidrolisado LL+LP o preferido pelos julgadores.

O hidrolisado de pescado de acari-bodó é um produto de adequada qualidade do ponto de vista físico-químico, microbiológico e sensorial, portanto se poderia utilizar como um suplemento protéico para a alimentação humana.

É possível dispor a tecnologia gerada no presente experimento ao setor produtivo de pescado, visando à elaboração de novos produtos, utilizando o acari-bodó como matéria-prima.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi, S; Kimura, Y; Murakami, K; Matsuno, R; Yokogoshi, H. 1991. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55(4):925-932.

Adams, M.R; Cooke, R.D; Twiddy, D.R. 1987. Fermentation parameters involved in the production of lactic-acid preserved fish-glucose substrates. *Journal Food Science Technology*, 22:105-114.

Aldrigue, M.L; Madruga, M.S; Fioreze, R; Lima, A.W.O; Sousa, C.P. 2002. *Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos*. v. 1, ed. UFPB. João Pessoa, Paraíba. 198pp.

Alencar, F.H. *et al.*,1991. Diagnóstico e perspectivas nutricionais na região amazônica. *In: Val, A.L; Figliuolo, R; Feldberg, E. Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Vol. 1. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 145-151.

Almás, K.A. 1981. *Chemistry and Microbiology of Fish and Fish Processing*. Norway. University of Trendheim, USA. 123pp.

Araújo-Lima, C; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tabaqui: Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Tefé, Amazonas. Sociedade Civil Mamirauá.

Areche, N.T; Berenz, Z.V; Leon, G.O. 1989. Desarrollo de ensilado de resíduo de pescado utilizando bactérias lácticas del yogur. *In: Consulta de Expertos sobre Tecnologia de Productos Pesqueros em América Latina*. Montevideo. Roma. 14p.

Arruda, L.F. 2004. *Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 78pp.

Arthur, L.M.S.R. 1991. Utilização de ensilado biológico de peixe na elaboração de uma ração para desenvolvimento de pós-larvas de camarão de água doce, *Macrobrachium rosenbergui*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 138p.

Arthur, L. 1990. Manual de congelação de pescado. FAO/DANIDA. PRAIA – Cabo Verde. 54pp.

Atayde, H.M; Silva, A.J.I; Teixeira, M.F.S. 2005. Microbiota presente em pescado processado, comercializado na cidade de Manaus, Amazonas. *Higiene Alimentar*, v.19, n.134, p.89-93.

Batista, G.M. 2002. *Alterações bioquímicas post-mortem de matrinxã Brycon cephalus (GUNTHER, 1869) procedente da piscicultura, mantido em gelo*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. Amazonas, 111pp.

Batista, V.S. 1998. *Distribuição, dinâmica da frota e dos recursos pesqueiros da Amazônia Central*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 291pp.

Barthem, B.R. 1995. Development of commercial fisheries i the Amazon Basin and consequences for fish stocks and subsistence fishing. *In: Clusener-godt, M; Sachs, I. (Eds). Brazilian perspectives on sustainable development of the Amazon region*. Vol. 15. UNESCO, Man and the biosphere series. 175-204.

Bautista, J; Hernandez-Pinzon, I; Alaiz, M; Parrado, J; Millan, F. 1996. Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids. *Journal Agric. Food Chem.* 4:967-971.

Bello, R.A. 1994. Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimentício em la alimentación animal. *In: Experiências com ensilado de pescado em Venezuela*. FAO. 134:1-12.

Bello, R.A. *et al.*, 1989. Estúdio sobre la elaboracion de ensilado de pescado por via microbiana em Venezuela. FAO. *2DA Consulta de expertos sobre Tecnologia de Productos Pesqueros em América Latina*. Montevideo, Uruguay. 1-22.

Bertullo, E. 1989. Desarrollo del ensilado de pescado em América Latina. FAO. *2DA Consulta de Expertos Sobre Tecnologia de Productos Pesqueros em América Latina*.

Borghesi, R. 2004. *Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 83pp.

Brasil. 2008. *Estatística da pesca 2006*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis/IBAMA. Brasília, Distrito Federal. 181pp.

Brasil. 2004. Ministério da Saúde. Portaria 518 de 25 de março de 2004. *Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências*.

Brasil. 2001. Ministério da Saúde. Resolução n° 12, de 02 de janeiro de 2001. *Aprova padrões microbiológicos para alimentos*.

Brito, C.A.S. 1991. *Ensilagem de pescado*. Monografia de Especialização, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 30pp.

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista “Acta Amazônica”.

Brito, A.L. 1981. *Aspectos anatômicos e considerações sobre os hábitos do Pterygoplichtys multiradiatus, Hancock, 1828 do bolsão do Janauacá*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade do Amazonas. Manaus. Amazonas. 93p.

Burgess, G.H. 1987. *El pescado y las industrias derivadas de la pesca*. Zaragoza: Acribia. 392p.

Cândido, L.M.B. 1998. *Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (Oreochromus niloticus): composição, propriedades nutritivas e funcionais*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 206pp.

Canonizado, S. 1980. The status of fish silage research in the Philippines. *In: Fish silage production and its use*. FAO. Roma, 230:24-26.

Carneiro, A.R.X. 1991. *Elaboração e uso de ensilado biológico de pescado na alimentação de alevinos de tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 81pp.

Carvalho, N.L.A. 2003. *Efeitos de fatores físicos e químicos sobre a formação de géis em surimi de duas espécies de peixes comerciais da Amazônia*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 145pp.

Castro, F.C.P. 1999. *Produção e estabilidade durante estocagem de concentrado protéico de peixe (piracuí) de acari-bodó, Pterygoplichthys multiradiatus (Hancock, 1928) e aruanã, Osteoglossum bicirrhosum (Vandelli, 1829)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 105pp.

Centenaro, G.S; Feddern, V; Bonow. E.T; Salas-Mellado, M. 2007. Enriquecimento de pão com proteínas de pescado. *Cienc. Tecnol. Alimentos*. Campinas, 27(3): 663-668.

Chaves, J.B.P. 1998. *Análise sensorial: histórico e desenvolvimento*. Cadernos didáticos 32. UFV, editor. Viçosa. 31pp.

Cifuentes, A.T; Dondero, M.C; Cabello, J.H.P; Carter, C.G.B; Quiroz, P.C. 1989. Estudos preliminares de aplicación de hidrolizados ácidos para la formulacion de pulpa de jurel, *Trachurus murphys*, de humedad intermédia. *In: Consulta de expertos sobre tecnologia de productos pesqueros em América Latina*. 2. Montevideo, Roma, FAO, 28p.

Clement, C.R; Val, A.L. 2003. O desafio do desenvolvimento sustentável na Amazônia. *T&C Amazônia*, 1(3):21-32.

Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*. 11: 254-262.

Costa, C.G. 2006. *Conservação de filés de acará-açu (Astronotus ocellatus, Cuvier 1829) Suvainson 1839, minimamente processado*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 56pp.

Dasso, I. 1999. Qué ponemos em juego al degustar um alimento? *La Alimentación Latinoamericana*, (33): 34-36.

Diniz, F.M; Martin, A.M. 1999. Hidrolisado protéico de pescado. *In: Ogawa, M; Maia, F.I. Manual de Pesca*. São Paulo:Varela.

Disney, J.G; Hoffman, A. 1978. Development of a fish silage/carbohydrate animal feed for use in the tropics. *Tropical Science*. 20(2):129-144.

FAO 2008a. <http://www.fao.org/fishery/topic/424>. Consulta no dia 08/04/08.

FAO 2008b. <http://www.fao/fishery/topic/736>. Consulta no dia 08/04/2008.

Fearnside, P.M. 2003. A floresta amazônica as mudanças globais. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonas. Manaus. Amazonas. 134pp.

Fepesca. 2000. Federação dos Pescadores do Amazonas e Roraima. *Perfil econômico do setor pesqueiro do Estado do Amazonas*. Manaus. 15pp.

Ferreira, M.G.A.B; Lessi, E. 2008. Avaliação Microbiológica e Sensorial de branquinha (*Potamorhina latior*) e jaraqui (*Semaprochilodus sp*) Comercializados na CEASA em Manaus/AM. Resumo de anais da CONFERÊNCIA CIENTÍFICA INTERNACIONAL: Amazônia em Perspectiva Ciência Integrada paa um Futuro Sustentável. 17 a 20 de novembro de 2008. Manaus/AM.

Ferreira, M.G.A.B. 1994. *Efeito de conservadores químicos na estabilidade microbiológica de tilápia (*Tilapia rendalli*) defumada a quente e armazenada sob refrigeração (10C ± 1C)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 90pp.

Ferreira, E.J.G; Zuanon, J. A. S; Santos, G.M. 1998. *Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Manaus, Amazonas. 201pp.

Filgueiras, L.A.,. 2002. *Determinação da vida de prateleira de filés congelados de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*, Valenciennes, 1840)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 56pp.

Fischer, C.F.A; Chagas, A.L.A; Dorneles, L.D.C. 1992. *Pesca de águas interiores*. Coleção Meio Ambiente. Série Estudos: Pesca, IBAMA. Brasília, Distrito Federal. n. 2. 32pp.

Fishbase, 2005. (www.fishbase.org). Acesso em 25/11/2005.

Franco, B.D.G.; Landgraf, M. 2004. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Ateneu. 182 pp.

Frazier, W.C; Westhoff, D.C. 1993. *Microbiologia de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza.

Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technology*. 48(10):86-88.

Furlan, E.F; Oetterer, M. 2002. Fish protein hydrolysed. *Revista de Ciência e Tecnologia*. 10(19):79-89.

Gava, A.J. 2007. *Princípios de tecnologia de alimentos*. Nobel. São Paulo. São Paulo. 284pp.

Gill, I; López-Fandiño, R; Jorba, X; Vulfson, E.N. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enz. Microbiology Technology*. 18:162-183.

González-Tello, P; Camacho, F; Jurado, E; Paez, M.P; Guadix, E.M. 1994. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 523-528.

Gurgel, M.P.O.S. 1995. *Hidrolisado protéico de pescado para enriquecimento alimentar*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 146pp.

Han-Ching, L; In, T; Mauguin, S; Mescle, J-F. 1995. Application of lactic acid fermentations. *In: Hall GH (editor). Fish Processing and Technology*. New York: Blackie Academic Professional: 193 - 209.

Hanna, J. 1995. Rapid microbial methods and fresh fish quality assessment. *In: Hall GH (editor). Fish Processing and Technology*. New York: Blackie Academic Professional: 275 - 305.

Hercules, J.V.W; Heydenrych, C.M.S. 1985. The production of naturally fermented fish silage using various *Lactobacilli* and different carbohydrate sources. *J. Sci. Food Agric*. 36:1093-1103.

Holanda, H.D. 2004. *Recuperação e caracterização dos componentes do camarão sete-barbas por hidrólise enzimática*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. São Paulo. 107pp.

Honda, E.M.S. *et al.* 1975. Aspectos gerais do pescado no Amazonas. *Acta Amazônica*, 5(1): 87-94.

Huss, H.H. 1998. *El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*. FAO Doc. Tec. de Pesca. Roma. n. 348, 202p.

ICMSF. 1983. *Microrganismos de los alimentos*. Técnicas de Analisis Microbiológicos. Zaragoza. Ed. Acribia, v. 1, 533pp.

Jay, J.M. 1996. *Modern food microbiology*. 5ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 491p.

Jesus, R.S; Tenuta-Filho, A; Torres, R.P; Fávoro, I.T. 2006. Valor nutricional del pescado amazônico. *Infopesca Internacional*. 28:22-26.

Jesus, R.S; Lessi, E; Tenuta Filho, A. 2002. Estabilidade química e microbiológica de "minced fish" de peixes amazônicos durante o congelamento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1-10.

Jesus R.S. 1999. *Estabilidade de "minced fish" de peixes amazonicos durante o congelamento*. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 107pp.

Jesus, R.S; Falcão, P.T; Lessi, E. 1990. Deterioração do pescado de água doce da Amazônia. Qualidade dos jaraquis (*Semaprochilodus spp*) comercializados em Manaus/AM. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 10, n. 2, p. 216-230.

Johnson, R.J; Brown, N; Eason, P; Sumner, J. 1985. The nutritional quality of two types of fish silage for broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 36(11):1051-1056.

Jung, C.F. 2004. *Metodologia para pesquisa & Desenvolvimento: Aplicada a novas Tecnologias, Produtos e Processos*. 1 edição. Axcel Books do Brasil Editora. Rio de Janeiro. ISBN: 85-7323-2333-1. 312pp.

Junk, W.J. 1985. Temporary fat storage, an adaptation of some species to the waterlevel fluctuations and related environmental changes of the Amazon river. *Amazoniana*, 9(3):315-351.

Junk, W.J; Honda, E.M.S. 1976. A pesca na Amazônia: Aspectos ecológicos e econômicos. *In: Anais do I Encontro Nacional sobre limnologia, piscicultura e pesca continental*. Belo Horizonte, Fundação João Pinheiro, p.211-226.

Kompiang, I; Yushadi, P; Creswell, D. 1980. Nutritional value of fish silage. FAO, 235. 38pp.

Leitão, M.F.F. 1988a. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. *In: Seminário Sobre Controle de Qualidade do Pescado*. Santos/SP. ITAL, p.13.

De acordo com o Artigo 62 do Regimento da Pós-Graduação/2002 do INPA, as referências bibliográficas citadas nessa tese obedecem às normas da Revista "Acta Amazônica".

Leitão, M.F.F. 1988b. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. *In: Seminário Sobre Controle de Qualidade do Pescado*. Santos/SP. ITAL, p.40-58.

Lessi, E. 1999. Câmbios post-mortem del matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869), cultivado em Manaus, Brasil. *In: II Congresso Venezolano de Ciência y Tecnología de Alimentos "Dr. Asher Ludín"*. Caracas. Resumos. Caracas: UCV, p.114.

Lessi, E; Carneiro, A.R.X; Lupín, H.M. 1989. Obtencion de ensilado biológico de pescado. *In: Consulta de Expertos Sobre Tecnología de Products Pesqueros em América Latina, 2*. Montevideo. Roma, FAO. 8p.

Lindgren, S; Pleje, M. 1983. Silage fermentation of fish or fish waste products with lactic acid bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 34:1057-1067.

Love, M.R. 1992. Biochemical dynamics and quality os flresh and frozen fish. *In: George M Hall (editor). Fish processing technology*. Blackie Academic & Professional, 1-26p.

Lovejoy, T. 2005. *Uma perspectiva científica*. Política Externa. 14(1):15-25.

Lupín, H.M. 1983. Ensilado biológico de pescado. Uma propuesta para la utilización de resíduos de la pesca continental em América Latina. FAO. COPESCAL/83/10.

Mackie, I.M; Hardy, R; Hobbs,G. 1971. *Fermented fish products*. Roma. FAO. 100:54pp.

Maia, E.L; Ogawa, M. 2000. Composição de aminoácidos de peixes de água doce. *IN: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnología de Alimentos*. 17, Fortaleza. **Resumos**. SBCTA, v.2, 5-37p.

Marable, N.L; Sanzone, G. 1989. Solubilization of fish proteins proteins using immobilized microbial cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 33:1098-1103.

Mahmoud, M.I; 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology*. 48(10):89-95.

Martins, E.C.P; Franco, B.D.G.M. 1997. Inhibition of Foodborne Pathogens by Bacteriocin-Producing *Leuconostoc* sp and *Lactobacillus sake* Isolated from "Lingüiça Frescal". *Revista de Microbiologia*, 28:284-287.

Martone, C.B; Petruzzelo, M; Cássia, R.O; Peres Borla, O; buscon, L; Folco, E.J.E; Sánchez, J.J. 2003. *Obtenção e usos de hidrolisados protéicos de resíduos de pescado*. I workshop Brasileiro em Aproveitamento de Subprodutos do Pescado. 8pp.

Mira, N.V.M. 2001. *Utilização de surimi para obtenção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina*. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 146pp.

Morales-Ulloa, D.F; Oetterer, M. 1997. Composição em aminoácidos de silagens químicas, biológicas e enzimáticas preparadas com resíduos de sardinha. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 17(3):252-258.

Morais, C; Martins, J.F.P. 1981. Considerações sobre o aproveitamento de sobras da industrialização de pescado na elaboração de produtos alimentícios. *Bol. ITAL*, 18(3): 253-281.

Mori, E.E.M. 1988. Análise sensorial no Instituto de Tecnologia de Alimentos. In: *Controle de Qualidade de Pescados. Seminário sobre controle de qualidade na Indústria de Pescados*. Edições Loyola, Santos, São Paulo, 25 a 27 de julho, 303p.

Moroni, F.T. 2005. *Alterações postmortem do músculo de acari-bodó, Liposarcus pardalis (Castelnau, 1855) conservado em gelo ou congelado e seu aproveitamento tecnológico*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 168pp.

Neto, A.D.C. 2004. *Cooperativa de beneficiamento de pescado: um instrumento para o desenvolvimento regional*. Monografia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 64pp.

Neves, R.A.M; Campos, T; Márquez, U.M.L. 2006. Modulação da pressão arterial por hidrolisados protéicos. *Braz. J. Food Technology*. janeiro, 81-86.

Neves, R.A.M; Mira, N.V.M; Marquez, U.M.L. 2004. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 24(1):101-108.

Oetterer, M. 1999. *Agroindústrias beneficiadoras de pescado cultivado: unidades modulares e polivalentes para implantação, com enfoque nos pontos críticos e higiênicos e nutricionais*. Tese de livre docente, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba/SP.

Oetterer, M.A. 1991. Projeto integrado de pesquisa: aproveitamento integral dos recursos do pescado. I- Silagem de pescado para consumo humano e animal. Universidade de São Paulo. Piracicaba. São Paulo. 46pp.

Oliveira, P.R. 2007. Qualidade do pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz 1822) procedente de piscicultura, estocado em gelo, congelado e de seus produtos derivados. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Manaus. 134pp.

Ogawa, M; Maia, E.L. 1999. Manual da pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado. São Paulo: Varela. v. 1, 430pp.

Ordanez, J.A. *et al.* 2005. *Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal*. Ed. Artmed. São Paulo. v. 2. 279pp. p. 219-229.

Parente, V.M; Batista, V.S. 2005. A organização do desembarque e o comércio de pescado na década de 1990 em Manaus, Amazonas. *Acta Amazônica*, 35(3): 375-382.

Petrere, M.Jr. *et al.* 1992. A pesca na Amazônia: Problemas e perspectivas para o seu manejo. *Workshop manejo da vida silvestre para a conservação na América Latina*. Belém, Pa. 3 a 5 fev.

Pérez, P.P.P. 1995. *Influência do ensilado biológico de peixe e do peixe cozido no crescimento e composição corporal de alevinos de tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 76pp.

Pihlanto-Leppala, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins:opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Science Technology*. 11:347-356.

Pinto, M.F; Ponsano, E.H.G; Castrogomez, R.J. 1996. Antibiose relacionada a cultivo de *Lactobacillus acidophilus*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 39(2): 259-270.

Raa,J; Gildberg, A. 1982. Fish silage. A review. *Food Science and Nutrition*, 16(4):383-419.

Ricks,E; Ridling,B; Iacobucci, G.A; Myers, D.V. 1978. Approaches to analysis and optimize protein hydrolysates. p.119-127.

Rocha, Y.R; Yuyuama. L.K.O; Nascimento, O.P. 1993. Perfil nutricional e pré-escolares e escolares residentes em Palmeiras de Javari, AM. *Acta Amazônica*, 23(1):9-14.

Ruffino, M.L. 2002. Estatística pesqueira do Amazonas e Pará -2001. Manaus: Ibama; Provárzea.

Ruffino, M.L; Isaac, V.J. 1994. Las pesquerias del bajo Amazonas: Problemas de manejo y desarrollo. *Acta Biológica Venezuelana*, 15(2): 37-46.

Santos, G.M; Ferreira, E.J.G; Zuanon, J. A. S; 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Manaus, Amazonas. 141pp.

Santos, G.M; Ferreira, E.J.G; Zuanon, J. A. S; 1991. Ecologia de peixes na Amazônia. *In: Val, A.L; Figliuolo, R; Feldberg, E. (Eds). Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. p. 263-277.

São Paulo, Instituto Adolfo Lutz. 2005. Normas Analíticas. *In: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimento*. São Paulo: Governo de São Paulo, 352p.

São Paulo, Instituto Adolfo Lutz. 1985. Normas Analíticas. *In: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimento*. São Paulo: Governo de São Paulo, 317p. v.1.

Schmidl, M.K; Taylor, S.L; Nordlee, J.A. 1994. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technology*. 48(10):77-85.

Sgarbieri, V.C. 1996. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela.

Shrimpton, R; Giugliano, R. 1979. Consumo de alimentos e alguns nutrientes em Manaus – AM, 1973-1974. *Acta Amazônica*. Manaus, 9(1):117-141.

Siemensma, A.D; Weijer, W.J; Bak, H.J. 1993. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Foods Science and Technology*. 4:16-21.

Sigurgisladottir, S.; Parrish, C.C.; Lall, S.P.; Ackman, R.G. 1994. Effects of Feeding Natural Tocopherols and Astaxanthin on Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Fillet Quality. *Food Research International*, 27(1):23-32.

Sikorski, Z. E.; Kolakowska, A.; Burt, J. R. 1990. Cambios bioquímicos y microbianos subsiguientes a la captura *In: Z. E. Sikorski (Ed.), Tecnología de los Productos del Mar: Recursos, Composición nutritiva y conservación..* Acibia, Zaragoza, Espanha, p. 73–102.

Silva, C.M.A; 2001. *Bactérias Gram-negativas isoladas do tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) criado em cativeiro, Amazonas – Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Manaus, Amazonas. 66p.

Soccol, M.C.H. 2002. Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*), minimamente processada e armazenada sob refrigeração. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 124p.

Southgate, D.A.T. 1991. Determination of food carbohydrates. London, Elsevier Applied Science, 231p.

Souza, L.C; Moroni,F.T; Lessi,E; Jesus,R.S. 2003. Avaliação do rigor e determinação da composição centesimal em acari-bodó *Liposarcus pardalis*, (CASTELNAU, 1855). *In.: Resumos XIII Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca*, Porto Seguro, Bahia, p. 316.

Souza, N.J. 1997. Desenvolvimento econômico. 3 edição. Editora Atlas. São Paulo. 415pp.

Spackman, D.C; Stein, W.H; Moore, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Biochemistry*, New York, (30):1190-1206.

Stansby, M.E. 1962. Proximate composition of fish. *In: Hee,E.; Kreueer,R (ed). Fish in Nutrition*. London, Fishing News (Books) Ltda., 447p.

Suframa. 2000. Relatório elaborado pela câmara setorial da agroindústria da zona franca de Manaus. Superintendência da Zona Franca de Manaus.

Tanimoto, S-Y; Tanabe, S; Watanabe, M; Arai, S. 1991. Enzymatic modification of zein to produce a non-bitter peptide fraction with a very high fischer ratio for patients with hepatic encephalopathy. *Agric. Biol. Chem.* 55(4):1119-1123.

Teixeira, E.; Meiner, E.M.; Barbeta, P.A. 1987. *Análise Sensorial de Alimentos*. UFSC Ed, editor. Florianopolis. 180 pp.

Thiansilakul, Y; Benjakul, S; Shahidi, F. 2007. Composition, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruads*). *Food Chemistry*. (103): 1385-1394.

Tomé, E. 1993. *Control de la actividad proteolítica em ensilado de pescado*. Dissertação de Mestrado, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 118pp.

Tristão, M.E.B. 1997. *Avaliação biológica de ensilado de peixe em ratos da linhagem wistar*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 83pp.

Van Wyk, H; Heydenrich, C. 1985. The production of naturally fermented fish silage using lactobacilli and different carbohydrate sources. *J. Sci. Food and Agric.* 36(11):1093-1103.

Velizek,J. 1991. 3-cloro 1,2-propanodiol derived amino alcohol in proteinhydrolysates. *Journal of Food Science*. 56:136-138

Venugopal, V. 1994. Production of fish protein hydrolysates by microorganisms. *In: Martin, A.M. Fisheries processing biotechnological applications*. Londres: Chapman & Hall.

Verreschi, D.C. 2005. *Hidrolisado protéico de resíduo de peixe*. Tese de Doutorado, Centro de Aqüicultura da Unesp/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 106pp.

Vidotti, R.M; Viegas, E.M.M; Carneiro, D.J. 2003. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*. 105: 199-204.

Vidotti, R.M. 2001. *Produção e utilização de silagens de peixe na nutrição do pacu*. Tese de Doutorado, Centro de Aqüicultura da Unesp/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. 74pp.

Vieira, R.H.S.F. *et al.* 2004. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado*. Ed. Varela. São Paulo. 380pp.

Wignall, J; Tatterson, I. 1977. Fish silage. *Process Biochemistry*. 15(1):32-41.

Windsor, M.L. 1969. Fish protein. *Torry advisory ministry of technology*. 3:3-10.

Yuyuama, L.K.O. *et al.* 1997. Perfil nutricional de pré-escolares do Município de Nhamundá, AM. *In: Congresso Brasileiro de Ciências de Alimentos. Anais*. 16:685-687.

Yuyuama, L.K.O; Rocha, Y.R; Cossolino, S.M.F. 1992. Composição química e percentual de adequação da dieta regional de Manaus-AM. *Acta Amazônica*, Manaus, 22(4):587-593.

Zelder, O; Hauer, B. 2000. Environmentally directed mutations and their impact on industrial biotransformation and fermentation processes. *Ecology and industrial microbiology. Current Opinion in Microbiology*. 3: 248-251.

ANEXOS

ANEXO 1

Ficha de Avaliação Sensorial

Provedor:

Produto: Biscoito

Data:

Idade:

Instruções:

Você está recebendo amostras de biscoito de maisena. Experimente cuidadosamente cada uma delas e ordene-as de acordo com a sua preferência ao sabor.

Código da amostras	Ordenação
545	
127	
372	
231	

Observações: _____

ANEXO 2

Ficha de Avaliação Sensorial

Provedor:

Produto: Biscoito

Data:

Idade:

Instruções:

Você está recebendo amostras de biscoito de maisena que serão servidas individualmente. Experimente cuidadosamente cada uma delas e avalie. Represente o quanto gostou ou desgostou de cada amostra, de acordo com a seguinte escala:

Qualidade	Valor atribuído
Desgostei extremamente	1
Desgostei muito	2
Desgostei	3
Não gostei, nem desgostei	4
Gostei	5
Gostei muito	6
Gostei extremamente	7

Código das amostras	Aparência geral	Cor	Odor	Sabor	Textura
321					
712					
433					
124					

Observações: _____
