

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E  
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE POA**

**SABRINA DA COSTA SILVA**

**VALIDADE COMERCIAL DE SARDINHAS INTEIRAS E REFRIGERADAS  
AVALIADA POR ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, BACTERIOLÓGICAS E  
SENSORIAL**

**NITERÓI/RJ**

**2010**

**SABRINA DA COSTA SILVA**

**VALIDADE COMERCIAL DE SARDINHAS INTEIRAS E REFRIGERADAS  
AVALIADA POR ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, BACTERIOLÓGICAS E  
SENSORIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO**

**Co-orientadores: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO**

**Dr. RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY**

**Niterói**

**2010**

S586

Silva, Sabrina da Costa

Validade comercial de sardinhas inteiras e refrigeradas avaliada por análises físico-químicas, bacteriológicas e sensorial / Sabrina da Costa Silva; orientadora Eliane Teixeira Mársico. – 2010.  
108f.

Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)–Universidade Federal Fluminense, 2010.  
Orientadora: Eliane Teixeira Mársico

1. Conservação de sardinha. 2. Qualidade do pescado. 3. Prazo de validade de produtos. I. Título.

CDD 664.94

**SABRINA DA COSTA SILVA**

**VALIDADE COMERCIAL DE SARDINHAS INTEIRAS E REFRIGERADAS  
AVALIADA POR ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, BACTERIOLÓGICAS E  
SENSORIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO – Orientadora

UFF

---

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO – Co-orientador

UFF

---

Dr. RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY – Co-orientador

EMBRAPA AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS

**Niterói**

**2010**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, simplesmente por ter me dado a vida;

Aos meus queridos pais, Joaquim e Maria Dalva, por todo amor, carinho, dedicação e apoio;

Ao meu esposo Rodrigo por todo amor, dedicação e, sobretudo, por compreender as minhas ausências e sempre me apoiar em todas as decisões;

Aos meus queridos irmãos, Fabrício e Rodrigo, pelo companheirismo e incentivo no decorrer da minha vida acadêmica;

Às minhas queridas amigas Clarissa, Emmanuelle, Érica, Jenif, Juliana, Micheli, Mila e Raquel pelas palavras de confiança e incentivo;

À minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliane Teixeira Mársico pela amizade, dedicação, confiança em meu trabalho e ensinamentos transmitidos;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Robson Maia Franco, pela amizade, incentivo e apoio durante toda minha trajetória acadêmica;

Ao Dr Ronoel Luiz de Oliveira Godoy pela co-orientação e atenção dada durante a realização do experimento;

À Profª Drª Mônica Queiroz de Freitas pela ajuda na análise sensorial e realização da estatística do trabalho;

Aos Médicos Veterinários Waldemar Teixeira Tocantins Junior e Clarisse pela ajuda na obtenção das amostras e confiança em meu trabalho;

Ao técnico de laboratório, Carlos Frederico Guimarães e ao secretário da pós-graduação Drausio de Paiva Ferreira por toda ajuda e atenção;

A todos os colegas de turma, corpo docente e funcionários da Faculdade de Veterinária que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho;

A todos aqueles que me apoiaram, direta ou indiretamente, e me levaram ao crescimento pessoal e profissional.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) são peixes de grande interesse comercial no Estado do Rio de Janeiro, porém altamente susceptíveis à deterioração. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a validade comercial destas espécies capturadas no litoral fluminense e mantidas sob refrigeração em gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). As amostras foram avaliadas físico-quimicamente em biduo através da análise das Bases Voláteis Totais (BVT), trimetilamina (TMA), histamina (HI), putrescina (PU) e cadaverina (CA) e diariamente pela quantificação de hipoxantina (Hx); bacteriologicamente em biduo pela Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicotróficas (CBHAP), contagem de *Enterobacteriaceae* e enumeração de *Enterococcus* e, sensorialmente, pelo Método de Índice de Qualidade (MIQ) através da utilização do protocolo de Índice de Qualidade (IQ) elaborado por uma equipe de seis julgadores treinados. Nas amostras de sardinha verdadeira o teor inicial de BVT e TMA foi  $15,40 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  e  $1,85 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Nas amostras de sardinha boca-torta foi observado um teor inicial de  $14,38 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  para BVT e  $2,51 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  para TMA. Nas duas amostras o limite máximo preconizado na legislação ( $30 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  para BVT e  $4 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  para TMA) foi alcançado após o 14º e 8º dias de estocagem, respectivamente. A produção de Hx variou de  $0,65$  a  $2,62 \mu\text{mol.g}^{-1}$  nas amostras de sardinha verdadeira e de  $1,40$  a  $2,09 \mu\text{mol.g}^{-1}$  nas amostras de sardinha boca torta. O conteúdo de HI foi inferior a  $2,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ , assim como PU e CA mantiveram-se abaixo de  $2\text{mg.}100\text{g}^{-1}$  durante o período de armazenamento nas duas espécies. Apesar da contagem de *Enterobacteriaceae* e a enumeração de *Enterococcus* spp. não serem estabelecidas na legislação, possuíram valores significativos em função do tempo de estocagem. Para a CBHAM e CBHAP o limite de  $7 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  preconizado na legislação internacional foi alcançado após o 12º e 8º dias de estocagem nas amostras de sardinha verdadeira e após o 12º e 6º dias de estocagem, respectivamente e não apresentaram conformidade com o estado de conservação das amostras. O MIQ sugeriu um IQ variando de 0 a 19 para as amostras de sardinha verdadeira, sendo proposto um limite de consumo aceitável inferior a 11 e para as amostras de sardinha boca-torta uma variação de IQ de 0 a 23, com um limite de aceitabilidade menor que 14. Baseando-se nesses resultados conclui-se que o teor de TMA, em comparação ao teor de BVT, apresentou melhor concordância com o grau de frescor do pescado, assim como o conteúdo de hipoxantina, os resultados das análises bacteriológicas e o MIQ tiveram boa correlação com a qualidade do pescado. Foi proposta a validade comercial de dez dias para a sardinha verdadeira e nove dias para a sardinha boca-torta. Porém estudos devem ser realizados concernentes ao

estabelecimento de novos padrões de BVT e conteúdo de hipoxantina para futuras inclusões no Regulamento Técnico.

Palavras chave: sardinhas, validade comercial, MIQ, hipoxantina, aminas biogênicas, contagem de bactérias

## ABSTRACT

Sardines of the species *Sardinella brasiliensis* e *Cetengraulis edentulus* are fish of great commercial interest in the State of Rio de Janeiro, but highly susceptible to deterioration. The objective of this study was to determine the shelf life of these species kept under refrigeration on ice ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Physico-chemical evaluation of the samples were performed at alternated days through analysis of total volatile bases (TVB), trimethylamine (TMA), histamine (HI), putrescine (PU) and cadaverine (CA); and daily by the measurement of hypoxanthine (Hx); bacteriological evaluations were performed at alternated days by Heterotrophic Bacteria Aerobic Mesophilic (CHBAM) and psychrotrophic (CHBAP) count, *Enterobacteriaceae* count and *Enterococcus* enumeration; and sensorial analysis were performed by the quality indices method (QIM) using the protocol Quality Index (QI) prepared by a team of six trained judges. In *S. brasiliensis* samples, the initial content of TVB and TMA was  $15.40 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  and  $1.85 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$ , respectively. For *C. edentulus* samples, it was initially observed a level of  $14.38 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  for TVB and  $2.51 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  for TMA. In both samples the maximum recommended in the legislation ( $30 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  for TVB and  $4 \text{ mg N.}100 \text{ g}^{-1}$  for TMA) was reached after 14 and 8 days of storage, respectively. The production of Hx ranged from  $0.65$  to  $2.62 \mu\text{mol.g}^{-1}$  in samples of *S. brasiliensis* and  $1.40$  to  $2.09 \mu\text{mol.g}^{-1}$  in samples of *C. edentulus*. The content of HI was less than  $2.0 \mu\text{g.g}^{-1}$ , as well as PU and CA remained below  $2 \text{ mg.}100 \text{ g}^{-1}$  during the period of storage in the two samples. Although the count of *Enterobacteriaceae* and enumeration of *Enterococcus* spp. are not under the law, they reached significative values for this storage period. For CHBAM and CHBAP, the limit  $7 \log \text{CFU}^{-1}$  appointed by the international law was reached after 12 and 8 days of storage in samples of *S. brasiliensis* and after 12 and 6 days of storage in samples of *C. edentulus*, respectively, showing no correlation with the conservation status of the samples. The sensorial analysis based on QIM suggested a QI ranging from 0 to 19 for *S. brasiliensis*, and proposed an acceptable limit consumption of less than 11; and a QI between 0 and 23 for *C. edentulus*, with a limit of acceptability below 14. According to these results, it is concluded that the level of TMA compared to the level of TVB, showed better agreement with the of freshness of fish, as well as the content of hypoxanthine, the results of bacteriological analisys and QIM correlated well with the quality of fish. It was proposed a commercial validity of ten days for the *S. brasiliensis* and nine days for the *C. edentulus*. However, studies about the establishment of new patterns of TVB and hypoxanthine contents should be conducted for future additions in Technical Regulations.

Key words: sardines, shelf life, QIM, hypoxanthine, biogenic amines, bacteria count.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1** Representação gráfica do comportamento da balança comercial brasileira de produtos pesqueiros (1996-2007). Fonte: IBAMA (2007), p. 21
- Fig. 2** Formação das aminas biogênicas a partir dos aminoácidos precursores. Fonte: Sánchez-Cascado (2005), p. 37
- Fig. 3 A e B** Amostras de sardinha boca-torta (*C. edentulus*) (A) e sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) (B) estocadas em recipientes isotérmicos de poliestireno expandido com gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), p. 55
- Fig. 4** Titulação da solução do compartimento central da placa de Conway com ácido clorídrico 0,1N para determinação das BVT em amostras de sardinhas mantidas sob refrigeração em gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), p. 57
- Fig. 5** (A) Pesagem da amostra de sardinha, (B) homogeneização da amostra com ácido perclórico 8% em agitador do tipo ultrassom, (C) adição de KOH para neutralização e (D) filtração em filtro Millipore Millex-GV ( $0,22\ \mu\text{m}$ ) diretamente no vial para quantificação de hipoxantina por cromatografia líquida de alta eficiência, p. 59
- A, B, C e D**
- Quadro 1** Soluções padrões de hipoxantina preparada em diferentes concentrações para elaboração da curva de calibração, p. 60
- Fig. 6 A e B** Filtração da solução de uma das amostras analisadas em coluna de troca iônica (A) e registro em fluorímetro da leitura da solução de uma das amostras analisadas (B), p. 62
- Fig. 7** Plano cartesiano contendo a “Curva Padrão” da quantificação de histamina utilizada no método Fluorimétrico. Fonte: Pombo et al. (2009), p. 63
- Fig. 8** Retirada da porção muscular da amostra de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) para realização das análises bacteriológicas, p. 66
- Fig. 9** Colônias características de *Enterobacteriaceae* rodeadas de halo vermelho indicativo da precipitação de sais biliares devido a produção de ácido no meio, p. 67
- Fig. 10** Material utilizado para realização da prova da oxidase: tubo de ensaio com Ágar estoque, fita impregnada com reagente para oxidase e alça de platina, p. 67

- Fig. 11** Viragem da cor do meio “Chromocult Enterococci Broth” para azul esverdeado (microtubo da esquerda) característico do crescimento de *Enterococcus* spp., p. 68
- Fig. 12 A e B** Treinamento da equipe com amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) refrigeradas para elaboração do protocolo IQ, p. 69
- Quadro 2** Protocolo IQ elaborado para avaliação da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) refrigerada em gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), p. 70
- Quadro 3** Protocolo IQ elaborado para avaliação da sardinha boca-torta (*C. edentulus*) refrigerada em gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), p. 71
- Fig. 13** Amostras de sardinha boca-torta (*C. edentulus*) depositadas em bandejas codificadas e ficha para procedimento de análise sensorial pela utilização do protocolo IQ, p. 72
- Fig. 14 A e B** Representação gráfica do teor de BVT e TMA ( $\text{mgN}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em (A) sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e (B) sardinha boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem, p. 76
- Fig. 15** Representação gráfica da concentração de hipoxantina ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem, p. 81
- Fig. 16 A e B** Representação gráfica das Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotróficas (CBHAP) ( $\log\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em (A) sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e (B) sardinhas boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem, p. 88
- Fig. 17 A e B** Representação gráfica das médias dos escores conferidos pelos julgadores na avaliação das amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) (A) e sardinha boca torta (*C. edentulus*) (B) estocadas sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), p. 92
- Fig. 18 A, B, C e D** Sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) apresentando pele com brilho metálico e diferenciação de três cores (A) e brânquias com coloração vermelho vinho (B) no 1º dia de estocagem; brânquia com coloração vermelho claro no 9º dia de estocagem (C); perda do brilho metálico e diferenciação de cores, carne amolecida e ventre rompido no último dia de estocagem (D), p. 93
- Fig. 19 A, B e C** Sardinha boca-torta (*C. edentulus*) apresentando pele com brilho metálico e diferenciação de duas cores (A) e brânquias com coloração vermelho vivo (B) no 1º dia de estocagem; brânquia com coloração pálida no 10º dia de estocagem (C), p. 94

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Resultados referentes às análises de Bases Voláteis Totais (BVT) e Trimetilamina (TMA) ( $\text{mg N.100 g}^{-1}$ ) realizadas em biduo em amostras de sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 18 dias de estocagem, p. 74
- TABELA 2** Modelos de equação de regressão das análises de BVT e TMA (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p), p. 77
- TABELA 3** Resultados referentes aos teores de hipoxantina ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) em sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem, p. 79
- TABELA 4** Modelos de equação de regressão da análise de hipoxantina (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p), p. 82
- TABELA 5** Resultados referentes à análise de histamina (HI) por fluorimetria ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e cadaverina (CA) e putrescina (PU) por CCD – Cromatografia em Camada Delgada ( $\text{mg.100 g}^{-1}$ ) em sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e sardinha boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem, p. 83
- TABELA 6** Resultados referentes à contagem de *Enterobacteriaceae* ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ), enumeração de *Enterococcus* spp. ( $\log \text{NMP.g}^{-1}$ ) e Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotróficas (CBHAP) ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) em sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem, p. 85

- TABELA 7** Resultados referentes à contagem de *Enterobacteriaceae* ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ), enumeração de *Enterococcus* spp. ( $\log \text{NMP.g}^{-1}$ ) e Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotólicas (CBHAP) ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) em sardinhas boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem, p. 86
- TABELA 8** Modelos de equação de regressão das análises bacteriológicas (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p), p. 89
- TABELA 9** Modelos de equação de regressão das análises bacteriológicas (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha boca-torta (*C. edentulus*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p), p. 89
- TABELA 10** Média dos escores resultantes da aplicação do protocolo IQ em amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) estocada sob refrigeração ( $0 \pm 2^\circ\text{C}$ ), p. 91
- TABELA 11** Média dos escores resultantes da aplicação do protocolo IQ em amostras de sardinha boca-torta (*C. edentulus*) estocada sob refrigeração ( $0 \pm 2^\circ\text{C}$ ), p. 91
- TABELA 12** Modelos de regressão da análise sensorial da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p), p. 95

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
°S	Grau ao sul do plano equatorial
Ω-3	Ômega três
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APC	Agar Padrão para Contagem
ATP	Adenosina trifosfato
DMA	Dimetilamina
BVT	Bases Voláteis Totais
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FA	Formaldeído
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drugs Administration
Hx	Hipoxantina
HxR	Inosina
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
ICMF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IMP	Inosina monofosfato
IQ	Índice de Qualidade
MIQ	Método de Índice de Qualidade
Mm	Milímetro
MMA	Monometilamina
N	Nitrogênio
NH <sub>3</sub>	Amônia
OPT	Ortoftaldeído
OTMA	Óxido de trimetilamina
SAN	Segurança Alimentar e Nutricional
TMA	Trimetilamina
U	Ácido úrico
UFC	Unidade Formadora de Colônias
X	Xantina

## SUMÁRIO

**RESUMO, p. 6**

**ABSTRACT, p. 8**

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 10**

**LISTA DE TABELAS, p. 12**

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 14**

**1 INTRODUÇÃO, p. 17**

**2 OBJETIVOS, p. 19**

2.1 OBJETIVO GERAL, p. 19

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 19

**3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 20**

3.1 PRODUÇÃO E COMÉRCIO DE PESCADO, p. 20

3.1.1 Sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), p. 22

3.1.2 Sardinha boca-torta (*Cetengraulis edentulus*), p. 24

3.2 QUALIDADE NUTRICIONAL DO PESCADO, p. 25

3.3 ALTERAÇÕES DO PESCADO REFRIGERADO, p. 26

**3.3.1 Alterações químicas, p. 28**

3.3.1.1 Bases voláteis totais e trimetilamina, p. 29

3.3.1.2 Hipoxantina, p. 34

3.3.1.3 Aminas biogênicas, p. 36

**3.3.2 Alterações bacteriológicas, p. 42**

3.3.2.1 Microrganismos envolvidos na formação de aminas biogênicas, p. 44

3.3.2.1.1 *Enterobacteriaceae*, p. 44

3.3.2.1.2 *Enterococcus* spp., p. 46

**3.3.3 Alterações sensoriais, p. 47**

**4 MATERIAL E MÉTODOS, p. 52**

4.1 MATERIAL PERMANENTE, p. 52

4.2 MATERIAL DE CONSUMO, p. 53

4.3 AMOSTRAS, p. 55

4.4 METODOLOGIA, p. 56

**4.4.1 Análises físico-químicas, p. 56**

4.4.1.1 Quantificação das bases voláteis totais e trimetilamina, p. 57

4.4.1.2 Quantificação de hipoxantina, p. 58

4.4.1.3 Quantificação de histamina por fluorimetria, p. 60

4.4.1.4 Semi-quantificação de putrescina e cadaverina por CCD (Cromatografia em Camada Delgada), p. 63

**4.4.2 Análises bacteriológicas, p. 64**

4.4.2.1 Preparo de material e meios de cultura, p. 64

4.4.2.2 Preparo das amostras, p. 65

4.4.2.3 Contagem de *Enterobacteriaceae*, p. 66

4.4.2.4 Enumeração de *Enterococcus* spp., p. 67

4.4.2.5 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicotróficas (CBHAP), p. 68

**4.4.3 Análise sensorial, p. 69**

**4.4.4 Tratamento estatístico dos resultados, p. 72**

**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 73**

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 73

**5.1.1 BVT e TMA, p. 73**

**5.1.2 Hipoxantina, p. 78**

**5.1.3 Aminas biogênicas, p. 82**

5.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 85

5.3 ANÁLISE SENSORIAL, p. 90

**6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES, p. 96**

**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 98**

## 1 INTRODUÇÃO

A Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) é um tema que atualmente tem despertado grande interesse das indústrias, dos órgãos legisladores e dos consumidores. O objetivo principal da SAN é o direito de acesso regular e permanente de todas as pessoas a alimentos seguros e saudáveis, em quantidade e qualidade adequadas. Neste contexto, o pescado se destaca como uma ótima fonte de alimento para a humanidade, pois é de fácil acesso, com qualidade nutricional apreciável e produzido em grande quantidade.

O pescado é um alimento que pode ser encontrado no mercado consumidor em diferentes formas de apresentação como fresco, congelado, em conserva, salgado entre outros, com uma vasta variação de preço que atende a todas as classes sociais. Além disso, o pescado pode ser adquirido diretamente de seu habitat pelo próprio consumidor através do ato da pesca, seja esta amadora ou de subsistência.

Em muitas regiões do mundo o pescado faz parte, desde épocas remotas, da dieta alimentar e, em alguns países, representa a principal fonte de proteínas de origem animal. Atualmente, um número cada vez maior de pessoas dá preferência ao peixe como uma alternativa saudável à alimentação, pois em comparação com a carne de outros animais, é mais nutritivo, por ser um alimento rico em proteínas de alta qualidade, de rápida digestibilidade e rico em aminoácidos essenciais, sendo fonte importante de vitaminas A, D, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, minerais como ferro, fósforo e cálcio e rico em ácidos graxos poli-insaturados, especialmente os da série ômega 3 ( $\omega$ -3).

Apesar da extensão da costa brasileira a produção de pescado no Brasil ainda é pouco representativa economicamente, porém vem apresentando uma tendência de crescimento nos últimos anos. O Estado do Rio de Janeiro se destaca

como um dos maiores produtores de pescado, sendo as espécies sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e sardinha-boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) as mais comercializadas nesta região seja sob a forma *in natura* ou industrializada (conserva) (IBAMA, 2007).

O pescado é altamente susceptível aos processos de deterioração devido à sua composição química, atividade de água elevada, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo à neutralidade. Essas características aliadas ao tamanho do peixe (peixes pequenos deterioram-se mais rapidamente), ao tipo de microbiota contaminante, ao tipo de pesca a que são submetidos, às práticas inadequadas de preservação e processamento, bem como ao clima tropical da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, contribuem para depreciação do produto com conseqüente aumento das perdas pós-captura.

Diante destes aspectos, fica evidente a necessidade de um controle de qualidade pós-captura que diminua as perdas tanto em relação às suas características nutricionais, que são as mais apreciadas pelos consumidores, quanto em relação à produtividade, que é o grande interesse da indústria, bem como em relação ao frescor do produto, pois, havendo um controle de qualidade efetivo, menor será o risco de contaminação do produto e, conseqüentemente, à saúde humana, que é a grande preocupação dos órgãos legisladores.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a validade comercial de espécies de sardinhas (*Sardinella brasiliensis* e *Cetengraulis edentulus*) de interesse comercial no Estado do Rio de Janeiro capturadas no litoral fluminense e mantidas sob refrigeração através da avaliação dos parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e sensoriais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar em biduo o teor de bases voláteis totais e trimetilamina durante o período de estocagem sob refrigeração até completa deterioração do peixe;
- Determinar diariamente a produção de hipoxantina durante o período de estocagem sob refrigeração até completa deterioração do peixe;
- Avaliar em biduo a produção de aminas biogênicas (histamina, cadaverina e putrescina) durante o período de estocagem sob refrigeração até completa deterioração do peixe;
- Acompanhar, por análises bacteriológicas realizadas em biduo, a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas, a contagem de *Enterobacteriaceae* e a enumeração de *Enterococcus* spp. durante o período de estocagem sob refrigeração até completa deterioração do peixe;
- Caracterizar por análise sensorial a validade comercial destes produtos pela utilização do Método de Índice de Qualidade (MIQ).

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A seguir serão abordadas informações sobre as espécies estudadas, a produção, comercialização e qualidade nutricional do pescado, bem como as alterações que ocorrem no pescado durante o período de estocagem sob refrigeração.

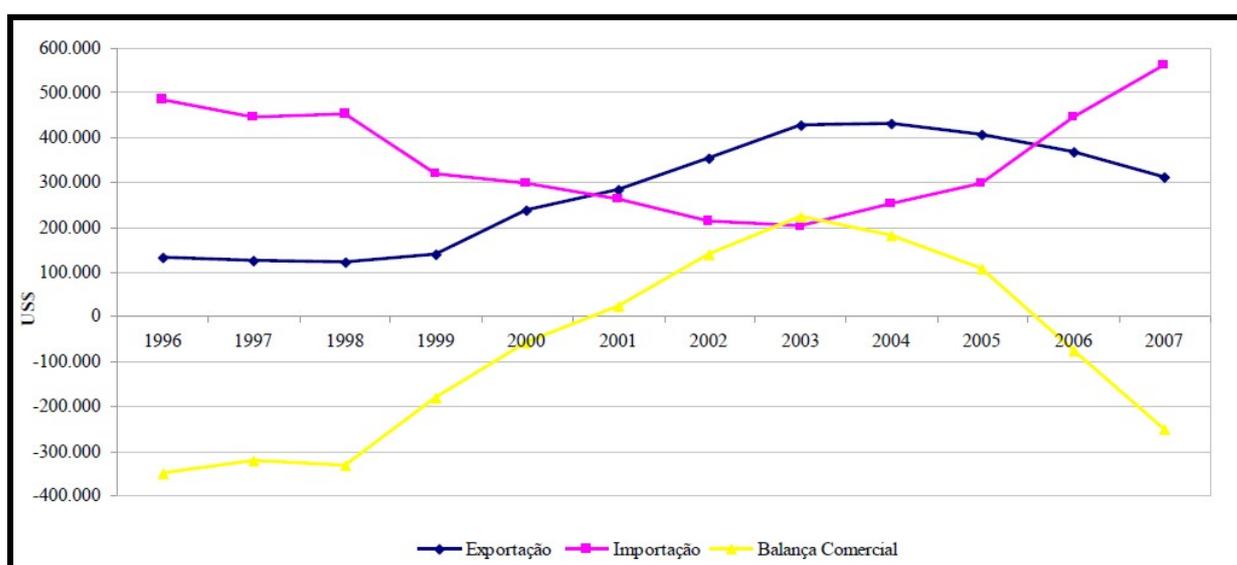
#### **3.1 PRODUÇÃO E COMÉRCIO DE PESCADO**

A produção mundial de pescado no ano de 2006, segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization) (2009), foi estimada em 143,6 milhões de toneladas, sendo que somente a China responsabilizou-se por 51,5 milhões de toneladas desta produção. Neste mesmo ano a produção brasileira apresentou um volume de 1.050.808,0 toneladas e, no ano de 2007, um aumento de 2,0% (1.072.226,0 toneladas), atingindo a colocação 21º na produção mundial. Deste total, 73% são representados pela pesca extrativa marinha e continental (FAO, 2007; IBAMA, 2007).

A região sudeste brasileira é a terceira maior região produtora de pescado por pesca extrativa marinha (137.666,0 toneladas) representada pelo Estado do Rio de Janeiro que registrou, em 2007, um crescimento na produção de 23,3% (82.528,5 toneladas) sendo a corvina, a sardinha-verdadeira, a cavalinha e a tainha as espécies que mais contribuíram para este crescimento. Com relação à pesca extrativa continental, ocorreu um decréscimo de 1% na produção do ano de 2007 em comparação com a de 2006, com uma produção de 22.201,0 toneladas (IBAMA, 2007).

Segundo a FAO (2009), o pescado e seus derivados são objeto de grande comercialização, pois mais de 37% da produção total entra no mercado internacional sob diversas formas de produtos para a alimentação humana e animal. Em 2006, 54 milhões de toneladas de pescado foram exportados, o que representa um decréscimo de 4% em relação ao ano anterior, porém para alimentação humana houve um aumento de 5% em relação ao mesmo ano, que representa mais de 80 bilhões de dólares na balança comercial (ibid).

No Brasil, a partir de 2004 os saldos das exportações apresentaram tendência declinante. Em 2006, 77.139,0 toneladas da produção de pescado foi destinada à exportação e, em 2007, houve um decréscimo de 24,55% sendo exportado apenas 58.198,0 toneladas. Com relação à importação, no ano de 2006 houve um crescimento de 23,6% da taxa de importação (180.374,0 toneladas) e, no ano de 2007, esse crescimento foi ainda maior (209.808,0 toneladas). Essa situação associado a intensificação da política cambial de valorização do real com relação ao dólar, ao decréscimo no valor das exportações, ao crescimento no valor das importações, ao aumento do consumo *per capita* de pescado (de 6,29kg em 2006 para 6,75kg em 2007) e ao crescimento no preço médio das importações, levou a um déficit na balança comercial brasileira no ano de 2007, que tem demonstrado tendência declinante a partir de 2004, conforme apresentado na figura 1 (IBAMA, 2007).



**Figura 1** – Representação gráfica do comportamento da balança comercial brasileira de produtos pesqueiros (1996-2007). Fonte: IBAMA (2007).

Em 2007 os principais fornecedores de pescado para o Brasil foram Noruega, Chile, Argentina, Portugal, Uruguai e Marrocos. Neste mesmo ano a importação brasileira de pescado atingiu 209.808,0 toneladas o que equivalia a US\$561,606. O Estado do Rio de Janeiro importou 39.164,0 toneladas de pescado, ficando atrás apenas do Estado de São Paulo, que foi responsável por mais da metade das compras efetuadas pelo Brasil ao exterior (ibid).

### 3.1.1 Sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*)

A sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) pertence à família *Clupeidae* e é uma espécie pelágica de pequeno porte (90 a 270mm de comprimento), subtropical (19-24°C), de hábitos costeiros (15 a 100m de profundidade) endêmica da costa brasileira, geograficamente isolada das demais espécies. Distribui-se desde o Cabo de São Tomé (Rio de Janeiro, RJ - 22°S) até o Cabo de Santa Marta (Santa Catarina, SC - 28°S) (PAES; SOPPA; SOUZA, 2007; PAIVA; MOTA, 2000).

A pesca da sardinha-verdadeira no Brasil teve início, em escala industrial, no final dos anos 60 e se desenvolveu rapidamente até 1973, quando atingiu um montante recorde de 223 mil toneladas anuais. Na década de 80, a captura baixou para um patamar de 100-155 mil toneladas e, no final dos anos 90, atingiu o menor valor da história desta pescaria (aproximadamente 17 mil toneladas anuais). Um dos motivos desse colapso da produção pesqueira foi a redução do cardume de sardinha devido a sobre-pesca. Sendo assim, a sardinha brasileira vem sendo submetida ao controle oficial de produção por intermédio do período de defeso, que tem como objetivo, a recuperação da biomassa da espécie através da proibição da pesca durante 3 a 4 meses (primavera-verão) coincidentes com a época de desova (IBAMA, 2009; PAES; SOPPA; SOUZA, 2007; PEREIRA; TENUTA-FILHO, 2005).

Em virtude do declínio da produção de sardinha e, conseqüente, aumento das pressões de mercado, o Brasil tem importado esta matéria-prima de outros países como Venezuela, Maurítânia, Marrocos e Rússia para suprir as necessidades do parque industrial (IBAMA, 2004). Segundo dados do IBAMA (2007) em 2007, das 209.808,0 toneladas de pescado importado, 56.722,0 toneladas foram de sardinha em diferentes formas de apresentação (congelada, filé).

Na Região Sudeste-Sul, a sardinha verdadeira é o mais tradicional recurso pesqueiro e sua pesca é realizada tanto em escala artesanal como industrial. Em 2007, somente nesta região, houve um crescimento de 3,2% na produção de sardinha, atingindo um montante de 59.939,5 toneladas e no Rio de Janeiro a produção teve um aumento de 74,6%. Neste Estado o alargamento da plataforma continental e a marcante influência de águas subtropicais, mais frias e mais ricas em nutrientes, permite a sustentação de grandes populações de peixes pelágicos, entre os quais se destaca a sardinha-verdadeira (IBAMA, 2004; 2009; JABLONSKI; DU MONT; OLIVEIRA, 1997). Paiva; Motta (2000) ao estudarem a ocorrência de cardumes de sardinha-verdadeira em águas costeiras do estado do Rio de Janeiro observaram que os cardumes eram mais frequentes e de maior peso na área de Ilha Grande (Angra dos Reis) e nos arredores de Cabo Frio, locais sob influência da ressurgência. Observaram também que o período de maior produção e produtividade das pescarias correspondeu aos meses de abril-junho (outono), logo após a época de reprodução, que o período de menor produção e produtividade das pescarias ficou restrito aos meses de julho-setembro (inverno) e, que em outubro, houve um aumento da produção e da produtividade, sendo que aquela caiu nos dois meses finais e esta cresceu até dezembro (primavera), quando o estoque já se encontrava em época de desova.

O Estado do Rio de Janeiro no passado foi considerado um importante parque industrial que correspondeu, em termos de capacidade instalada, ao maior centro de enlatamento de pescado da América Latina. Porém, em virtude do declínio do estoque da sardinha verdadeira, matéria prima básica para a indústria, houve uma retração das atividades (IBAMA, 2004; JABLONSKI; DU MONT; OLIVEIRA, 1997).

Em 2004, em Santa Catarina, o quilo da sardinha fresca caiu em média de R\$1,80 para R\$0,50, situação que ocorreu devido a uma falsa impressão de boa safra associado ao surgimento de cardumes concentrados nas áreas de atuação da frota. Porém devido ao valor pago não cobrir os gastos da viagem, a frota pesqueira de cerco dos municípios de Itajaí e Navegantes, que correspondia a 57% da produção nacional de sardinha, paralisou suas atividades como forma de protesto, o que resultou num acordo que fixou o valor mínimo/quilo em R\$1,10 já contabilizando os impostos. No Estado do Rio de Janeiro o preço médio pago na primeira comercialização da sardinha era R\$1,30 (IBAMA, 2004; 2007).

### 3.1.2 Sardinha boca-torta (*Cetengraulis edentulus*)

A sardinha boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) é uma espécie pelágica que pertence à família *Engraulidae* da qual fazem parte peixes que ocorrem com maior abundância em águas marinhas tropicais (FISHBASE, 2009). Esta espécie possui ampla distribuição (do Caribe e Panamá à costa do estado de Santa Catarina) (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978) e é encontrada predominantemente em águas de baixa salinidade, turvas e pouco profundas com características de fundo lodoso, como baías e estuários próximos de áreas de manguezais (VIVATERRA, 2009) conforme constatado por Gay; Sergipense e Rocha (2000) e Silva et al. (2003) ao estudarem a distribuição espaço-temporal desta espécie em diferentes áreas do sistema lagunar de Itaipu e na Baía de Sepetiba, respectivamente.

A sardinha boca torta vem sofrendo intensiva pesca nos últimos anos devido ao incentivo do Governo Federal para captura de exemplares que são industrializados e comercializados no Nordeste do Brasil, visando suprir as deficiências da pesca da sardinha (SILVA et al., 2003).

No Estado do Rio de Janeiro a pesca artesanal da sardinha boca torta representa fonte de renda para muitos pescadores além de ser uma das principais espécies desembarcadas na Baía de Guanabara. Somente em 2007, segundo dados do IBAMA (2009) o volume de pesca no Estado atingiu 3.670,0 toneladas, sendo 3.499,5 toneladas representadas pela pesca artesanal. Esse total colocou esta espécie como a 5ª mais pescada nesta região.

A sardinha boca torta possui grande interesse comercial para as indústrias de pescado em conserva do Estado do Rio de Janeiro, pois são peixes que apresentam um preço baixo para primeira comercialização (em torno de R\$ 0,30), o que torna o custo para industrialização deste produto também baixo, havendo desta forma uma agregação de valor e, conseqüentemente, uma comercialização lucrativa do produto final (ibid).

### 3.2 QUALIDADE NUTRICIONAL DO PESCADO

O pescado é muito nutritivo, rico em micronutrientes, minerais, ácidos graxos essenciais e proteínas e representa um valioso complemento nas dietas pobres em vitaminas e minerais essenciais (FAO, 2007).

A composição química varia consideravelmente entre as diferentes espécies assim como entre indivíduos de uma mesma espécie, dependendo da idade, sexo, meio ambiente, estação do ano, comportamento migratório, maturação sexual e ciclos alimentícios (HUSS, 1999).

O teor de proteínas no peixe é bastante constante na maioria das espécies, variando de 16 a 21%. Essas proteínas apresentam alto valor biológico e, conseqüentemente, nutricional, com um balanceamento de aminoácidos essenciais, comparável à proteína padrão da FAO, sendo especialmente rico em lisina (OGAWA; MAIA, 1999). Na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (LIMA et al., 2006), o conteúdo de proteínas em sardinhas inteiras cruas é de 21,1g.100g<sup>-1</sup> de parte comestível. Uma variação de 18,9% e 19,0% de proteína foi encontrada por Bruschi (2001) e Santo (2003), respectivamente, ao analisarem filés de sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*).

A fração lipídica é o conteúdo que mais apresenta variação entre as espécies de pescado (0,2-25%) (HUSS, 1999). Em sardinhas inteiras cruas o conteúdo de lipídeos, segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (LIMA et al., 2006), é de 2,7g/100g de parte comestível. Conteúdo semelhante foi encontrado por Santo (2003) ao avaliar filés de sardinha verdadeira (3,1%), porém Bruschi (2001) e Guttierrez e Silva (1993) detectaram valores mais elevados (7,8% e 7,7%, respectivamente) o que pode ter ocorrido em função da alimentação, época do ano, fase de vida entre outros fatores que interferem no conteúdo deste componente.

Os lipídeos, além de fonte energética, são ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série  $\omega$ -3, especialmente EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico) que apresentam efeitos redutores sobre os teores de triglicerídeos e colesterol sanguíneo, reduzindo conseqüentemente os riscos de incidência de doenças cardiovasculares como arteriosclerose, enfarto do miocárdio, trombose cerebral e outras (OGAWA; MAIA, 1999). Guttierrez e Silva (1993) ao avaliarem o conteúdo lipídico da sardinha verdadeira observaram um valor médio de

EPA ( $1,52 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) 3 a 4 vezes maiores que os da DHA ( $0,41 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) enquanto que Visentainer et al. (2000) objetivando estudar a composição quantitativa do EPA e do DHA em diferentes partes do corpo de espécies de peixes marinhos da costa brasileira observaram valores médios de 14,81% de DHA e 13,77% de EPA nas amostras de olho de sardinha e 20,16% de DHA e 18,68% de EPA nas amostras de filé de sardinha. Esses autores observaram ainda que a sardinha e o bonito apresentaram os maiores somatórios para os níveis desses ácidos graxos em filés, mostrando ser uma boa fonte alimentar destes ácidos, especialmente a sardinha pelo preço acessível de comercialização no Brasil.

O conteúdo de carboidratos no músculo do pescado é muito baixo, geralmente inferior a 0,5%. Em sardinhas inteiras cruas, Lima et al. (2006) não detectaram a presença deste componente.

O pescado pode ser ainda uma excelente fonte de minerais fisiologicamente importantes, tais como magnésio, manganês, zinco, cobre, cálcio, fósforo, ferro e iodo. É também rico em vitaminas hidrossolúveis do complexo B, porém, destacando-se como majoritárias as vitaminas lipossolúveis A e D (HUSS, 1999; LUDORFF; MEYER, 1978; OGAWA; MAIA, 1999; SANTOS, 2006).

### 3.3 ALTERAÇÕES DO PESCADO REFRIGERADO

Como consequência de sua composição química e do pH pouco ácido de sua carne, o pescado se degrada com facilidade (SANCHEZ-CASCADO, 2005).

Logo após a captura do peixe iniciam-se os processos de alteração. Huss (1997) afirma que o desenvolvimento desses sinais ocorre devido a um conjunto de fenômenos microbiológicos, oxidativos e autolíticos. Ainda segundo o mesmo autor a deterioração ou as alterações autolíticas são responsáveis pela perda inicial da qualidade do peixe fresco, mas contribuem muito pouco para a deterioração do peixe refrigerado que ocorre, principalmente, devido à ação das bactérias. Para Contreras-Guzmán (1994) na primeira etapa a formação de compostos pela ação autolítica não pode ser evitada, porém regulada; já na segunda etapa, a formação de compostos por atividade microbiana pode ser controlada até certo limite pelo emprego de processos tecnológicos.

A alteração do pescado depende de fatores distintos tais como a espécie, pois os peixes chatos se alteram mais rapidamente que os redondos; o tamanho, já que os maiores se deterioram mais lentamente; as condições do pescado no momento da captura, uma vez que a agonia prolongada provoca maior consumo de glicogênio, cuja falta acelera o aparecimento de fenômenos de alteração; o tipo de microbiota contaminante, visto que se a contaminação corporal e intestinal do pescado é alta e a que se instaura após captura também é elevada, a alteração será maior e mais rápida (SANCHEZ-CASCADO, 2005) e ainda o teor de gordura do pescado, a época de captura e o tipo de alimentação (ABABOUCHE et al., 1996).

Vários são os fatores que contribuem para a perda da qualidade e aceleração do processo de deterioração do pescado tais como as más condições de manipulação com conseqüentes traumas mecânicos, o uso de refrigeração deficiente que pode ocorrer em etapas que antecedem ao consumo, tanto a bordo das embarcações pesqueiras, logo após a captura, como em terra, durante o transporte rodoviário (LUDORFF; MEYER, 1978; PEREIRA; TENUTA-FILHO, 2005; SANTOS, 2006). No Estado do Rio de Janeiro fatores tais como o caráter precário do controle da pesca e desembarques artesanais na região da baía da Guanabara, bem como o clima da Região Metropolitana com características tropicais, contribuem ainda mais para a depreciação do produto com conseqüente aumento das perdas pós-captura (JABLONSKI; DU MONT; OLIVEIRA, 1997).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2008), para o pescado ser considerado deteriorado e, portanto, impróprio para o consumo, deve apresentar teor de bases voláteis superior ou igual a  $30 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ , teor de bases voláteis terciárias, superior ou igual a  $4 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ , pH da carne externa superior ou igual a 6,8, e da carne interna superior ou igual a 6,5 e reação positiva de gás sulfídrico e, segundo a Portaria nº185 (BRASIL, 1997), teor de histamina acima ou igual a  $10 \text{ mg.100 g}^{-1}$  para as espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombresocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae*. Entretanto na legislação nacional não consta a determinação de hipoxantina que é um produto do metabolismo do ATP importante na determinação do grau de frescor do pescado.

Com relação aos padrões bacteriológicos, na legislação brasileira (BRASIL, 2001) para que o pescado resfriado seja considerado impróprio para consumo deve apresentar uma contagem de estafilococos coagulase positivo superior a  $10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$  e a presença de *Salmonella* spp. em 25g de amostra. A legislação nacional não

prevê limites para *Enterococcus* spp. e *Enterobacteriaceae* em pescado, porém essas análises são importantes por indicarem o estado higiênico-sanitário das amostras além, desses microrganismos estarem diretamente envolvidos com a produção de histamina. Na legislação também não consta a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicotróficas, importantes por avaliarem a qualidade sanitária e o grau de deterioração das amostras, respectivamente, sendo assim, usa-se como referência o estabelecido na legislação internacional ( $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>) (ICMSF, 1974).

Segundo Ogawa e Maia (1999) para se evitar a deterioração do pescado é necessário conservá-lo em condições desfavoráveis ao desenvolvimento e proliferação de microrganismos com o uso de baixa temperatura, processá-lo objetivando a criação de um estado inconveniente para o desenvolvimento de microrganismos ou eliminar os microrganismos contaminantes do pescado.

Diversos trabalhos (ABABOUC et al., 1996; KODAIRA; TOMÉ; PÉREZ, 2001; SURTI; TAYLOR; MA'RUF, 2001; TOMÉ et al., 2001; VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997) comprovaram que o uso correto de baixa temperatura na conservação do pescado aumenta a validade comercial desses produtos.

### **3.3.1 Alterações químicas**

A perda da qualidade inicial do pescado é primariamente causada por mudanças autolíticas que ocorrem pela ação de enzimas endógenas dos músculos ou que extravasam das vísceras e não por atividade microbiana. Traumas mecânicos originados na captura, que variam segundo a tecnologia empregada no manuseio, estocagem a bordo, descarga em terra e distribuição do pescado, contribuem para que as enzimas contidas nas vísceras tenham acesso ao músculo agindo autoliticamente. De especial importância neste contexto é a degradação dos nucleotídeos que é causada por enzimas autolíticas. As mudanças autolíticas contribuem para a deterioração, principalmente pela formação de catabólitos disponíveis para o crescimento bacteriano (GRAM; HUSS, 1996; PEREIRA; TENUTA-FILHO, 2005).

A atividade autolítica ocorre porque, após a morte, com a paralisação da corrente sanguínea e, conseqüentemente, do aporte de glicose e outras matérias-primas para a produção de adenosina trifosfato (ATP), os tecidos ficam privados da principal fonte energética para os processos metabólicos e as células gradualmente perdem a capacidade de manter a integridade (PEREIRA; TENUTA-FILHO, 2005).

Contudo, esses autores destacam ainda que fatores tais como temperatura e tempo de estocagem, estado nutricional da espécie na captura, composição química da espécie e estágio do ciclo reprodutivo afetam o processo de autólise.

Outro tipo de alteração química que merece destaque é a deterioração oxidativa lipídica que afeta diretamente os ácidos graxos poliinsaturados como EPA e o DHA, anulando o seu valor nutricional e funcional, além da produção de compostos tóxicos. Neste caso, os lipídeos reagem com o oxigênio, radicais livres ou enzimas formando hidroperóxidos, instáveis, que se decompõem em radicais peróxido ou alcóxi. Os peróxidos oxidam as substâncias lipídicas ou se convertem a compostos carbonílicos mais estáveis, sendo o principal deles o aldeído malônico que está envolvido no envelhecimento, mutagênese e carcinogênese (ibid).

Segundo Gram e Dalgaard (2002) alguns metabólitos da deterioração podem ser utilizados como índices de qualidade. Esses autores citam ainda que os produtos da degradação do ATP e a presença de aminas biogênicas têm sido utilizados durante algum tempo como índices de qualidade para o pescado.

### 3.3.1.1 Bases voláteis totais e trimetilamina

As Bases Voláteis Totais (BVT) constituem-se no conjunto das bases nitrogenadas trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA), monometilamina (MMA) e amônia, presentes no músculo do pescado em proporções variáveis segundo a espécie e o estado de deterioração da amostra (GIANNINI, 2003).

A determinação das BVT é um dos métodos mais amplamente utilizados para avaliar a qualidade do pescado, o qual inclui a medida de TMA (produzida por bactérias deteriorantes), DMA (produzida por enzimas autolíticas durante a estocagem em congelamento), amônia (produzida por desaminação de aminoácidos e catabólitos de nucleotídeos) e outros compostos nitrogenados básicos voláteis associados à deterioração do pescado (HUSS, 1999). Segundo Pereira e Tenuta-

Filho (2005) esta é a técnica não sensorial mais usada na garantia de qualidade industrial.

Do mesmo modo, também são utilizados os níveis de TMA e DMA para esta finalidade (TIMM; JORGENSEN, 2002). Segundo Contreras-Guzmán (1994), nos peixes armazenados em gelo sob condições de aerobiose há o favorecimento da formação de TMA, enquanto que o armazenamento em condições anaeróbicas ou parcialmente aeróbicas favorece a formação de DMA e formaldeído (FA). O autor ainda destaca que os peixes de carne escura formam TMA no músculo ordinário em condições aeróbicas, tanto a 0°C quanto sob congelamento.

Como as BVT também incluem a amônia, que está presente no pescado fresco, os valores iniciais são bem acima de zero. O músculo branco do pescado magro, por exemplo, apresenta BVT ao redor de 20 mg N.100g<sup>-1</sup>. À medida que o pescado se degrada, há um aumento exponencial no valor de BVT e da contagem bacteriana (PEREIRA; TENUTA-FILHO; 2005).

Huss (1999) destaca que, apesar da análise de BVT ser de fácil realização, revela apenas estágios mais avançados da deterioração, além de não refletir o modo inicial deste processo (bacteriano ou autolítico). A TMA, ainda segundo o mesmo autor, também não indica estágio inicial da deterioração, porém a vantagem de utilizar este método em vez da contagem bacteriana é a rapidez do teste e a maior exatidão que é proporcionada em relação ao estágio de deterioração. Entretanto, existem controvérsias sobre a efetividade destes parâmetros uma vez que em algumas espécies de pescado, alterações significativas nos teores destes compostos somente ocorrem quando os sinais de deterioração já são perceptíveis sensorialmente (LAPA-GUIMARÃES; PICKOVA, 2004).

Ababouch et al. (1996) afirmaram que devido as diferenças observadas nos resultados entre várias espécies de peixes, a produção de TMA e de BVT não pode ser utilizada como um padrão específico para todas as espécies, visto que há diferentes concentrações de óxido de trimetilamina (OTMA) em cada uma delas, principalmente, entre os elasmobrânquios e os teleósteos.

O OTMA constitui uma parte da fração do nitrogênio não protéico e é utilizado por algumas bactérias tais como *Aeromonas* spp., *Enterobacteriaceae* psicotolerantes, *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens* e *Vibrio* spp. como acceptor de elétrons na respiração anaeróbica para produzirem

trimetilamina (TMA) no decorrer do período de estocagem (GRAM; DALGAARD, 2002; HUSS, 1999; JAY, 2005; LUDORFF; MEYER, 1978; OGAWA; LIMA, 1999).

A deterioração do peixe fresco é certamente influenciada pela presença de OTMA, especialmente nas condições em que oxigênio é excluído e pela presença de bactérias “específicas da deterioração” (GRAM; HUSS, 1996; HUSS, 1999).

O OTMA pode ser encontrado em quantidade de 1 a 5% no tecido muscular, porém esse valor depende da espécie do pescado, estação do ano, área da pesca entre outros fatores. As maiores quantidades se encontram nos elasmobrânquios e lulas (75-250 mg N.100 g<sup>-1</sup>), o bacalhau possui em torno de 60-120 mg N.100 g<sup>-1</sup>, enquanto que as espécies planas e pelágicas possuem o mínimo (HUSS; 1999). Há ainda espécies que não possuem OTMA (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

Shakila, Vijayalakshmi e Jeyasekaran (2003) avaliaram seis importantes espécies de peixe (*Rastrelliger kanagurta*, *Sardinella fimbriata*, *Lethrinus miniatus*, *Nemipterus japonicus*, *Carangoides armatus* e *Sphyraena barracuda*) comercializadas na Índia mantidas armazenadas em temperatura ambiente e observaram uma grande variação no teor BVT e TMA entre as espécies para o mesmo período de estocagem. Concluíram que a produção desses compostos não pode ser utilizada como indicadores universais de qualidade, como um padrão específico para todas as espécies, como Ababouch et al. (1996) já haviam mencionado. Na sardinha (*Sardinella fimbriata*), esses autores detectaram que o nível permitido de BVT (30 mg N.100 g<sup>-1</sup>) e de TMA (10 mg N.100 g<sup>-1</sup>) foi atingido após 18 e 15 horas, respectivamente .

Marrakchi et al. (1990), trabalhando com sardinhas europeias (*Sardina pilchardus*) estocadas em gelo verificaram uma validade comercial de nove dias, levando de 10 a 15 dias para atingir o valor de 30 mg N.100 g<sup>-1</sup> preconizado na legislação brasileira (BRASIL, 2008). Ababouch et al. (1996), ao avaliarem sardinhas desta mesma espécie estocadas em gelo, registraram dois padrões diferentes de evolução das BVT devido a microbiotas distintas – um que atingiu 45 mg N.100 g<sup>-1</sup> em 200 horas, devido ao crescimento de *Shewanella putrefaciens*, e outro que chegou a 30 mg N.100 g<sup>-1</sup> em 400 horas, em função da presença de *Pseudomonas* spp. evidenciando assim a influência microbiológica sobre a produção de bases voláteis. Erkan e Özden (2008) também estudando sardinhas europeias inteiras e evisceradas estocadas a 4°C observaram inicialmente um valor médio de BVT de 11,11 e 10,18 mg N.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente, atingindo ao final de nove dias uma

média de 29,03 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas sardinhas inteiras e 15,03 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas sardinhas evisceradas. Com relação ao teor de TMA esses autores detectaram inicialmente 2,5 e 2,6 mg N.100 g<sup>-1</sup> e, ao final do estudo, 4,16 e 2,36 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas amostras de sardinhas inteiras e evisceradas, respectivamente, concluindo, portanto, que a atividade enzimática e bacteriana que ocorre nos órgãos internos das sardinhas, influencia diretamente no teor das BVT.

Aubourg, Sotela e Pérez-Martín (1998) avaliaram sardinhas européias congeladas estocadas a -10°C e a -18°C e observaram que a produção de BVT ocorreu num ritmo mais lento nas sardinhas estocadas a -18°C. Destacaram ainda que em peixes congelados a quebra de trimetilamina ou aminoácidos leva ao acúmulo de dimetilamina e NH<sub>3</sub>, respectivamente e que em sardinhas congeladas a principal via de formação de BVT parece ocorrer por desaminação de aminoácidos.

Oetterer et al. (2003) observaram que na fermentação de sardinhas em diferentes condições (inteiras e evisceradas, com ou sem condimentos e 20% de sal) o conteúdo médio inicial de BVT foi de 19,32 mg N.100 g<sup>-1</sup> e que após 60 dias de armazenamento os menores valores foram observados nas amostras evisceradas com condimentos e sal, enquanto os maiores valores foram detectados nas amostras de sardinhas inteiras sem tratamento. Esses autores enfatizaram que apesar de no processamento do pescado com vísceras, terem sido encontrados os maiores valores para BVT, não ocorreu interferência na segurança microbiológica sendo este processamento o que propiciou os melhores resultados para cor, aroma, sabor e textura do produto final.

Kilinc e Cakli (2004) observaram que em sardinhas em processo de marinação o teor médio inicial de BVT e TMA na matéria-prima crua descongelada foi de 10,3 e 0,88 mg N.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente e que, após terem sido colocadas em barris com solução de 7% de ácido acético e 14% de cloreto de sódio, foi observado um teor de BVT de 6,53 mg N.100 g<sup>-1</sup> e TMA de 1,07 mg N.100 g<sup>-1</sup>, atingindo 11,2 e 1,48 mg N.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente ao final de 22 dias de processo. Esses autores não observaram diferenças significativas nesses valores durante todo o processo, porém justificaram o declínio do teor das BVT no início da marinação devido ao efeito do ácido acético e sal usados no processamento, assim como pela lixiviação dos componentes das BVT.

Pereira e Tenuta-Filho (2005) avaliaram as condições de comercialização da sardinha verdadeira fresca, descongelada e processada no município de São Paulo

(SP) e observaram um valor médio de BVT de 15,75 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas amostras de sardinha fresca comercializada no mercado atacadista e um valor médio de 27,06 e 27,69 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas amostras de sardinha fresca e sardinha descongelada, respectivamente comercializadas em feiras livres sugerindo portanto que a evolução das BVT nas sardinhas comercializadas em feiras livres pode ter ocorrido devido as condições de manuseio e estocagem deficientes. Nas sardinhas anchovadas um valor médio de BVT de 62,96 mg N.100 g<sup>-1</sup> foi encontrado o que pode estar relacionado com o processo de cura no qual ocorre intensa atividade de enzimas bacterianas formando grandes quantidades de produtos nitrogenados de degradação.

Ndaw et al. (2008) estudaram o efeito de cepas de bactérias ácido láctica na conservação de sardinhas fermentadas com 5% de NaCl e 4% de glicose e observaram um teor médio de BVT inicial de 11,25 mg N.100 g<sup>-1</sup> que passou para 36,31 mg N.100 g<sup>-1</sup> após três semanas de armazenamento, sendo que na amostra controle foi observado um conteúdo de 118,74 mg N.100 g<sup>-1</sup>. Para TMA esses autores detectaram inicialmente 0,81 mg N.100 g<sup>-1</sup> atingindo 11,26 e 19,56 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas amostras tratadas e controle, respectivamente. Concluíram, portanto que esse processo biotecnológico pode ser conveniente na conservação de sardinhas fermentadas.

Pombo et al. (2009) ao avaliarem sardinhas anchovadas de diferentes marcas comerciais encontraram uma variação de BVT entre 42,8 e 124,7 mg N.100 g<sup>-1</sup>. Esses autores ainda avaliando três tipos de processamento tecnológico da sardinha anchovada observaram que naqueles em que a evisceração não era realizada os valores de BVT eram mais elevados, atribuindo este fato a presença das vísceras, que tem uma microbiota que influi na decomposição do pescado.

Teodoro, Andrade e Mano (2007) objetivando avaliar o efeito da embalagem de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) em atmosfera modificada mantidas sob refrigeração, observaram que a partir do 10º dia a amostra controle (sem tratamento) apresentou valores acima do permitido na legislação (30 mg N.100 g<sup>-1</sup>) e a amostra embalada a vácuo apresentou-se imprópria a partir do 13º dia. Contudo, nas amostras embaladas com CO<sub>2</sub> a presença de BVT acima do limite estabelecido somente foi detectada no 20º dia de armazenamento. Concluíram portanto que a embalagem em atmosfera modificada pode ter influenciado no número de bactérias

presentes e/ou na habilidade dessas bactérias para agir na desaminação dos compostos nitrogenados não protéicos.

### 3.3.1.2 Hipoxantina

A degradação do ATP pode refletir as primeiras alterações no pescado antes do crescimento bacteriano (VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997). Este processo inicia-se logo após a morte do pescado por ação de enzimas presentes no músculo originando, em sequência, os seguintes compostos (VENUGOPAL, 2002):



Sendo ATP – adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; AMP – adenosina monofosfato; IMP – inosina monofosfato; HxR – inosina; Hx – hipoxantina; X – xantina; U – ácido úrico.

A passagem de ATP a IMP é rápida e se processa desta forma até quando o pH se torna mais ou menos constante. Contudo, a transformação de IMP em Hx é mais demorada. Sendo assim, o IMP é acumulado na etapa inicial, fato que contribui para a definição do paladar do peixe, uma vez que este nucleotídeo é um importante componente relacionado ao sabor. Com o tempo, quando a qualidade do peixe decresce, verifica-se aumento dos níveis de Hx e HxR. Apenas Hx tem um efeito direto sobre o sabor amargo dos peixes em deterioração, portanto, seu conteúdo constitui um bom indicador do grau de frescor do peixe (GRAM; HUSS, 1996; HUSS, 1999; OGAWA; MAIA, 1999).

Segundo Gram e Huss (1996) a hipoxantina pode ser formada pela decomposição autolítica de nucleotídeos, mas também pode ser formada por bactérias, sendo a taxa de formação por bactérias superior à autolítica.

A degradação do ATP procede da mesma forma na maioria dos peixes, porém a velocidade de cada reação varia enormemente entre uma espécie e outra (HUSS, 1999).

Veciana-Nogués, Marine-Font e Vidal Carou (1997) analisaram atuns estocados a 0, 8 e 20°C e observaram que durante todo o tempo de

armazenamento, IMP diminuiu, atingindo valores muito baixos no final do estudo nas três temperaturas. Contudo, o conteúdo de HxR e Hx aumentou, sendo que a partir de um certo momento, em conformidade com o tempo e temperatura de armazenamento, o conteúdo de HxR declinou enquanto o de Hx continuou aumentando. A 0°C, os conteúdos de HxR foram superiores aos dos Hx. Como no mesmo estudo os autores observaram que o crescimento bacteriano foi maior nas temperaturas de armazenamento a 8 e 20°C concluíram haver uma relação entre o crescimento bacteriano e o aumento de HxR e Hx.

Lakshamanan, Antony e Gopakumar (1996) ao avaliarem a degradação de nucleotídeos em duas espécies de peixe (*Liza corsula* e *Etroplus suratensis*) detectaram, imediatamente após a captura, um teor de Hx de  $0,175\mu\text{mol.g}^{-1}$  e  $0,16\mu\text{mol.g}^{-1}$  na 1ª e 2ª espécie, respectivamente. Após 15 dias de estocagem em gelo, observaram que na primeira espécie o conteúdo de Hx aumentou para  $1,913\mu\text{mol.g}^{-1}$  e na segunda espécie aumentou para  $1,14\mu\text{mol.g}^{-1}$ .

Kodaira, Tomé e Pérez (2001) ao analisarem híbridos de Cachama (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) cultivados armazenados em temperatura de 0, 10 e  $27\pm 3^\circ\text{C}$  e por Özoğul e Özoğul (2002) ao avaliarem trutas (*Oncorhynchus mykiss*) armazenadas em gelo e atmosfera modificada, encontraram resultados semelhantes aos observados por Veciana-Nogués, Marine-Font e Vidal Carou (1997). Özoğul e Özoğul (2002) constataram ainda que os valores de Hx foram maiores nas amostras embaladas sob aerobiose quando comparados com as embaladas em CO<sub>2</sub>, concluindo, desta forma, que este composto tem efeito inibitório sobre o nível de Hx.

Özoğul, Özoğul e Kuley (2007) em estudo com sardinhas da espécie *S. pilchardus* armazenadas sem gelo a 4°C, em embalagem a vácuo e em embalagem sob atmosfera modificada constataram que a degradação dos nucleotídeos foi mais rápida nas amostras estocadas a 4°C e que o nível de Hx aumentou linearmente com o tempo de armazenamento, apresentando um ligeiro aumento nas amostras embaladas em atmosfera modificada quando comparadas com as embaladas a vácuo, atingindo ao final de 15 dias uma concentração de  $0,79\mu\text{mol.g}^{-1}$  e  $0,76\mu\text{mol.g}^{-1}$ , respectivamente. Nas sardinhas armazenadas sem gelo foi observado um aumento de Hx até 10 dias e depois uma queda. Com esses resultados, concluíram portanto, que o CO<sub>2</sub> pode realmente ter um efeito inibitório sobre os nucleotídeos.

Sallam (2007) ao avaliar a validade comercial de filés de salmão tratados por imersão em 2,5% solução aquosa de acetato de sódio, lactato de sódio ou o citrato de sódio durante o armazenamento refrigerado a 1°C, observou que o conteúdo de Hx aumentou significativamente principalmente na amostra controle (sem tratamento) e constatou também que a concentração de Hx é influenciada pela presença de diferentes sais que possuem efeito inibitório sobre o crescimento de grupos bacterianos.

Özyurt et al. (2007) estudaram o efeito de três métodos de captura (rede de emalhar, espinhel e arpão) na qualidade físico-química, microbiológica e sensorial da espécie de peixe *Sander lucioperca* estocada em gelo durante 25 dias e observaram que a concentração inicial de IMP nos peixes capturados por rede de emalhar foi de 2,4  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  sendo esse valor inferior ao obtido nos peixes capturados por espinhel (4,1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) e arpão (16,7  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) atribuindo esta diferença ao estresse de acordo com o método de captura. O teor de IMP nos peixes capturados por redes de emalhar, espinhel e arpão declinou para menos de 1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  no dia 4, 8 e 11, respectivamente. A concentração de inosina em todos os grupos aumentou durante a fase inicial de armazenamento, diminuindo em seguida e a concentração de Hx aumentou durante todo o período de armazenamento.

Vázquez-Ortiz et al. (1997) ao avaliarem três diferentes marcas comerciais de conservas de sardinha detectaram a presença de hipoxantina em baixas concentrações (0,117 a 0,288  $\mu\text{mol.10}\mu\text{L}^{-1}$ ) e concluíram que a matéria-prima foi manipulada e conservada de forma adequada, visto que, como os nucleotídeos são bastante estáveis ao processamento térmico e as enzimas endógenas são desnaturadas e inativas durante o aquecimento, os produtos da degradação do ATP são bons indicadores do estado sanitário de produtos processados.

### 3.3.1.3 Aminas biogênicas

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular produzidas pelo metabolismo de plantas, animais ou microrganismos (BRINK et al., 1990). São formadas por descarboxilação de aminoácidos livres ou por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas. O nome das diferentes aminas biogênicas corresponde ao nome dos seus aminoácidos originários. A histamina, a putrescina, a

cadaverina e a tiramina são produzidas a partir da descarboxilação da histidina, ornitina, lisina e tirosina, respectivamente (HUSS, 1999; SILLAS-SANTOS, 1996;). Na figura 2 visualiza-se a via biossintética das aminas biogênicas com os respectivos aminoácidos que as originam.

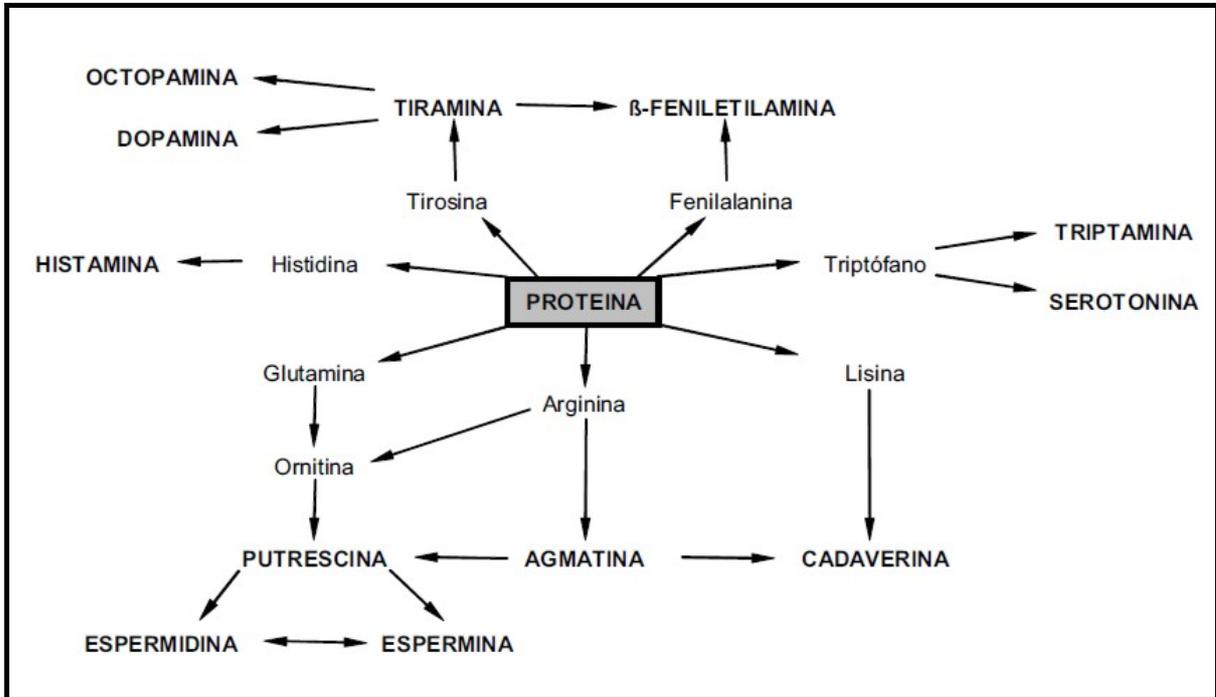


Figura 2: Formação das aminas biogênicas a partir dos aminoácidos precursores. Fonte: Sánchez-Cascado (2005).

A classificação das aminas biogênicas pode ser feita de acordo com sua estrutura química em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina,  $\beta$ -feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina) (SILLA-SANTOS, 1996).

Em praticamente todos os alimentos que contêm proteínas ou aminoácidos livres e estão sujeitos a condições que permitam atividade microbiana ou bioquímica, as aminas biogênicas podem ser produzidas. A quantidade e o tipo de amina biogênica formada dependerão da composição do alimento e do tipo de microrganismo presente (SHALABY, 1996; SILLAS-SANTOS, 1996). Para Lapa-Guimarães e Pickova (2004) em pescado, as aminas biogênicas são produzidas devido à atividade de bactérias deterioradoras que somente estão presentes em número elevado no músculo, quando já podem ser detectados sinais de deterioração.

Segundo Ogawa e Maia (1999) a histamina é a amina mais importante por ser causadora de intoxicação alimentar. Os peixes, principalmente os pertencentes à família *Scombridae*, como atum e bonito e os pertencentes à família *Clupeidae* como as sardinhas, bem como os das famílias *Scombresocidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae* são altamente susceptíveis à formação de histamina, devido ao fato dessas espécies conterem naturalmente altos níveis de histidina livre em seus tecidos, cuja conversão em histamina é realizada por microrganismos capazes de sintetizar histidina-descarboxilase (BRASIL, 1997; OLIVEIRA et al., 2004).

As bactérias mais freqüentemente associadas à intoxicação histamínica são a *Morganella* spp., especialmente a *M. morganii*, a *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio alginolyticus* e *Proteus* spp. (JAY, 2005). Silveira et al. (2001) avaliando o potencial das bactérias formadoras de histamina constataram que a *Morganella morganii* foi o microrganismo que apresentou maior potencial de descarboxilação dos aminoácidos arginina, lisina e tirosina, bem como produziu histamina em níveis considerados tóxicos.

A intoxicação histamínica é caracterizada pelo aparecimento dos sintomas dentro de minutos até três horas após ingestão de alimentos tóxicos, com a maioria dos casos ocorrendo em até uma hora após consumo. Os sintomas típicos consistem numa diminuição da pressão sanguínea em consequência da vasodilatação, urticária, cefaléia, palpitações cardíacas, rubor da face e do pescoço acompanhadas de uma sensação de calor intenso, desconforto geral e diarreia. Outros sintomas incluem tonturas, desmaios, secura da boca e da garganta, podendo ocorrer choque anafilático (LEHANE; OLLEY, 2000; JAY, 2005; SHALABY, 1996).

Como as aminas biogênicas são componentes naturais dos alimentos, geralmente não representam risco à saúde humana, pois são rapidamente metabolizadas através de reações de acetilação e oxidação mediadas por enzimas monoamino-oxidase, diamino-oxidase, poliamino-oxidase e histamina N-metiltransferase (BARDÓCZ, 1995; HUSS, 1997; LEHANE; OLLEY, 2000). As intoxicações por aminas biogênicas ocorrem quando são ingeridas em grande quantidade, quando o mecanismo natural de catabolismo do indivíduo é geneticamente deficiente ou inibido por agentes farmacológicos ou, quando substâncias potencializadoras estão presentes, como no caso da presença de outras

aminas biogênicas como cadaverina e putrescina que inibem o sistema de detoxificação e aumentam a absorção intestinal da histamina (LEHANE; OLLEY, 2000; ÖNAL, 2007; SHALABY, 1996). A cadaverina e putrescina podem ainda agir como precursores de nitrosaminas formando compostos carcinogênicos (OLIVEIRA et al., 1995) e indicam perda da qualidade nutricional do alimento, pois são formadas a partir da degradação dos aminoácidos ornitina e lisina.

Em função da dependência da eficiência do sistema de desintoxicação do indivíduo e da presença de outras aminas biogênicas que potencializam a ação da histamina, a dose tóxica desta amina é extremamente difícil de ser estipulada. No Brasil, o limite máximo permitido, segundo a Portaria nº185 (BRASIL, 1997) é de até 10 mg.100 g<sup>-1</sup> (100 ppm) para as espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombrosocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae*. O FDA (Food and Drug Administration) (2001) estabelece o limite máximo de 50 ppm, enquanto que para a Comunidade Européia (2005) o limite de até 200 ppm é permitido para as espécies de peixe com potencial para formação de histamina.

As aminas biogênicas têm sido frequentemente utilizadas para avaliar o grau de frescor de pescado. Segundo Sillas-Santos (1996), nos alimentos não-fermentados, a presença de aminas biogênicas acima de um determinado nível é considerada como indicativo de atividade microbiana indesejável, podendo, portanto, ser utilizado como indicador de deterioração microbiana.

Mietz e Karmas<sup>1</sup> (1977) apud Huss (1999) observaram que os níveis de putrescina, cadaverina e histamina aumentavam, enquanto os de espermina e espermidina diminuíam nas amostras deterioradas em comparação com as amostras de boa qualidade. Sendo assim, propuseram um índice de qualidade química baseado nas aminas biogênicas, indicadoras da perda de qualidade em atum enlatado, onde:

$$\text{Índice de qualidade} = \frac{\text{ppm histamina} + \text{ppm putrescina} + \text{ppm cadaverina}}{1 + \text{ppm espermina} + \text{ppm espermina}}$$

---

<sup>1</sup> Mietz, J. L.; Karmas, E.. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, v. 42, p. 155-158, 1977.

Esses autores concluíram que, conforme o aumento do índice de qualidade, menor seria a pontuação sensorial do produto enlatado, portanto um produto com IQ inferior a 1 seria considerado de primeira qualidade, enquanto que aqueles com valores acima de 10 indicariam uma qualidade microbiológica muito ruim.

O armazenamento de peixes em baixa temperatura reduz a taxa de formação das aminas biogênicas (SHALABY, 1996). Nos alimentos mantidos a 10°C a formação de histamina é diminuída, sendo controlada em armazenamento a 5°C, devido ao lento crescimento dos microrganismos produtores de histamina a baixa temperatura (HALÁSZ et al., 1994).

Ababouch et al. (1996) avaliaram as alterações na qualidade de sardinhas européias (*S. pilchardus*) estocadas em temperatura ambiente e sob refrigeração em gelo e observaram que, amostras estocadas em temperatura ambiente apresentam a taxa de produção de histamina muito maior quando comparada com a estocada em gelo que apresentou uma taxa significativamente reduzida ou totalmente inibida. O conteúdo médio de histamina foi de 25,9 e 86,7 mg.100 g<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente, após 16 e 32 horas de armazenamento à temperatura ambiente. No gelo, a síntese de histamina foi totalmente inibida a 0°C ou lenta atingindo níveis de 14,74 e 21,05 mg.100 g<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente, após 11 e 13 dias de armazenamento.

Veciana-Nogués, Marine-Font e Vidal-Carou (1997) comprovaram que a histamina foi a amina biogênica predominante durante o armazenamento de atum a 0, 8 e 20°C e que sua concentração aumentou em conformidade com a elevação da temperatura e do tempo de armazenamento, o que comprova ainda mais a relação da produção desta amina com a temperatura de estocagem do produto.

Pacheco-Aguilar, Lugo-Sánchez e Villegas-Ozuna (1998) avaliaram sardinhas (*Sardinops sagax caerulea*) armazenadas em gelo durante um período de 15 dias e observaram que a formação de histamina foi muito baixa (0,0018 mg.100 g<sup>-1</sup>) atribuindo este fato ao tratamento adequado pós-captura que garantiu uma baixa população microbiana na superfície do peixe antes do armazenamento a 0°C. No mesmo estudo analisaram três diferentes marcas comerciais de sardinha em conserva e, nessas amostras, foi observada uma variação de 0,05 a 7,03 mg.100 g<sup>-1</sup> sugerindo um controle de qualidade inconsistente na qualidade da matéria-prima antes do processamento, necessitando, portanto, de um controle mais rigoroso na relação tempo/temperatura no manuseio da matéria-prima.

Silveira et al. (2001) em estudo com peixes de origem fluvial observaram que a produção de histamina a 5°C foi muito baixa ou nula e que temperaturas acima de 15°C podem possibilitar a formação de outras aminas biogênicas como a cadaverina, tiramina e, especialmente, a putrescina, que são potencializadoras da ação da histamina.

Shakila, Vijayalakshmi e Jeyasekaran (2003) ao avaliarem sardinhas (*Sardinella fimbriata*), estocadas em temperatura ambiente observaram a presença de histamina após um período de 9 horas. Uma concentração máxima de 80-90 ppm foi atingida após 18 horas. Concluíram, que se esses peixes forem consumidos após serem expostos a temperatura ambiente por 12-15 horas podem causar uma intoxicação alimentar.

Sanchez-Cascado (2005) ao avaliar anchovas (*Engraulis encrasicolus*) estocadas em gelo por um período de 23 dias encontram baixas concentrações de aminas biogênicas atribuindo este fato ao efeito inibidor do gelo sobre o crescimento em maior número de bactérias produtoras de aminas biogênicas.

Andrade (2006) encontrou nível de histamina acima do limite de 10 mg.100 g<sup>-1</sup> em amostras de atum estocadas em gelo a partir do 10º e 19º dia de análise, e o mesmo perfil ocorreu para os níveis de cadaverina.

Pombo et al. (2009) verificaram a produção de histamina em amostras de sardinha anchovada adquiridas no comércio varejista, além de outras aminas biogênicas em 75% das amostras analisadas. Os autores sugerem que, neste caso, é importante salientar que o processamento tecnológico passa por 90 dias de fermentação o que propicia a produção de aminas biogênicas por microrganismos tais como o *Enterococcus* spp. que pode ter sua ação influenciada pela temperatura, pH e concentração de sal do alimento.

Erkan e Özden (2008) constataram um teor de histamina inicial de 12,3 mg.kg<sup>-1</sup> em amostras de sardinha (*S. pilchardus*) adquiridas diretamente de entreposto de pescado. Após sete dias de estocagem em gelo foi observado um incremento neste valor que alcançou um nível de 52,8 e 45,8mg.kg<sup>-1</sup> nas amostras de sardinha inteira e eviscerada, respectivamente.

Huss (1999) destaca que a maioria das aminas biogênicas é estável ao processo térmico, portanto, sua presença em produtos enlatados é uma boa indicação de que a matéria prima estava alterada antes da cocção.

Pacheco-Aguilar, Lugo-Sánchez e Villegas-Ozuna (1998) avaliaram três diferentes marcas comerciais de sardinhas (*Sardinops sagax caerulea*) enlatadas e observaram uma variação de 0,05 a 7,03 mg.100 g<sup>-1</sup> indicando uma falta de padrão na qualidade da matéria-prima antes do processamento necessitando, portanto, de um controle mais rigoroso na relação tempo/temperatura no manuseio da matéria-prima.

Oliveira et al. (2004) verificaram a presença de histamina em 40 amostras de atum (n=40) e 45 amostras de sardinha (n=45) enlatadas. Os teores variaram de 1,57 a 1.023,16 mg.kg<sup>-1</sup> em atum e de 3,35 a 346,44 mg.kg<sup>-1</sup> em sardinha. Teores de histamina acima de 100mg.kg<sup>-1</sup> foram detectados em 55% das amostras de atum e em 13,33% das de sardinha, resultados estes considerados de relevância pelos autores tanto na questão relacionada à qualidade da matéria-prima, havendo necessidade de controle das práticas de manuseio e fabricação do produto, quanto no âmbito de saúde pública visto que, teoricamente, esses elevados teores de histamina seriam capazes de causar sintomas de intoxicação.

### 3.3.2 Alterações bacteriológicas

As maiores causas de deterioração dos alimentos são o crescimento e metabolismo dos microrganismos, resultando na formação de aminas, sulfetos, alcoóis, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos com sabores e odores desagradáveis e inaceitáveis (ABABOUCHE et al., 1996; GRAM; DALGAARD, 2002). Segundo Gram e Huss (1996) a degradação microbiológica dos alimentos pode assumir diversas formas, mas todas como consequência do crescimento e/ou atividade microbiana, que se manifesta com alterações nas características sensoriais do alimento.

Os autores ainda citam que fatores intrínsecos específicos do peixe tais como sua natureza pecilotérmica, elevado pH *post mortem* (geralmente maior que 6,0), presença de grandes quantidades de nitrogênio não protéico e presença de óxido de trimetilamina influenciam intensamente sua microbiota e degradação. Outros fatores tais como contaminação específica e não específica do animal vivo, que depende do ambiente no qual se encontra, além das características intrínsecas consideradas ótimas de crescimento para os microrganismos como temperatura, atividade de água e pH também contribuem para a complexidade microbiológica do pescado.

Os músculos e líquidos corporais dos peixes são naturalmente estéreis (OGAWA; MAIA, 1999), sendo a microbiota encontrada geralmente na pele, nas brânquias e intestinos (JAY, 2005). No pescado de águas temperadas há predominância de bactérias Gram-negativas, da qual fazem parte as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*, porém microrganismos Gram-positivos, tais como os gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium* também podem ser encontrados em proporções variáveis. Peixes de águas tropicais podem apresentar um ligeiro aumento da carga de bactérias Gram-positivas e entéricas, porém o restante se assemelha à microbiota de peixes de águas temperadas (GRAM; HUSS, 1996; JAY, 2005).

Após a captura do peixe, o sistema imunológico colapsa e as bactérias proliferam livremente. Durante o período de armazenamento a uma temperatura em torno de 0°C, as bactérias invadem o músculo penetrando entre as fibras musculares e inicia-se o desenvolvimento de bactérias psicrófilas aeróbias e anaeróbias facultativas alcançando, após 10 a 12 dias, níveis acima de  $10^7$  UFC.cm<sup>-2</sup> de pele, causando a deterioração do pescado (HUSS, 1999; OGAWA; MAIA, 1999).

Em peixes frescos a microbiota responsável pela deterioração varia com as mudanças na temperatura de armazenamento. Em peixes refrigerados (0-5°C), *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. são as principais bactérias relacionadas com a deterioração. Entretanto, em temperaturas altas de armazenamento (15-30°C), os principais responsáveis pela deterioração são as diferentes espécies da família *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, bem como bactérias Gram positivas (HUSS, 1999).

Os gêneros *Pseudomonas* e *Shewanella* são os mais importantes na deterioração do pescado, com destaque para as espécies *P. fluorescens*, *P. fragi* e *S. putrefaciens*, responsáveis pelas alterações sensoriais desses produtos devido à formação de trimetilamina, ésteres, substâncias voláteis reductoras e outros compostos com aroma pronunciado. Esses gêneros são importantes, devido não só à sua natureza psicrófila, mas, principalmente, pela capacidade que possuem de utilizar, para seu desenvolvimento, substâncias nitrogenadas não-protéicas (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

### 3.3.2.1 Microrganismos envolvidos na formação de aminas biogênicas

Os microrganismos com atividade descarboxilase podem fazer parte da microbiota associada ao alimento ou podem ser introduzidos por contaminação, antes, durante ou após o processamento do alimento (BRINK et al., 1990). Niven Junior, Jeffrey e Corlett Junior (1981) não consideraram que os microrganismos envolvidos com a formação de histamina em peixes façam parte da microbiota normal do pescado, sendo, portanto introduzidos por contaminação.

Os microrganismos responsáveis pelo acúmulo de histamina em peixes parecem ser exclusivamente mesófilos, sendo que as enterobactérias têm sido descritas como as principais produtoras (LÓPEZ-SABATER et al., 1996; NIVEN JUNIOR; JEFFREY; CORLETT JUNIOR, 1981). No entanto, outras bactérias como os lactobacilos, pediococos e enterococos são particularmente ativos durante a formação de aminas biogênicas em alimentos (HALÁSZ et al., 1994).

#### 3.3.2.1.1 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* inclui microrganismos bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, os quais fermentam glicose produzindo ácidos e, em muitas espécies, gás. São oxidase negativos, usualmente catalase positivos, reduzem nitrato a nitrito e são móveis com flagelos peritríquios ou imóveis. Crescem bem a 37°C, porém algumas espécies podem crescer entre 25 e 30°C (PELCZAR JUNIOR; CHAN; KRIEG, 1996).

Os gêneros comuns a essa família compreendem *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Providencia*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*. Em geral bactérias dessa família são mesófilas, porém, algumas cepas psicrótróficas de *Enterobacter*, *Hafnia* e *Serratia* podem desenvolver-se em temperaturas abaixo de 0°C. Apesar de serem associados à contaminação de origem fecal, os integrantes desta família não necessariamente têm o trato intestinal de homens e animais com o “habitat” natural, estando presentes no meio ambiente de um modo geral, sobretudo aqueles envolvendo unidades de manipulação e beneficiamento, podendo, portanto, serem considerados como indicadores de qualidade higiênico sanitária dos alimentos (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Segundo Sillas-Santos (1996) microrganismos tais como *Morganella morganii*, determinadas cepas de *Klebsiella pneumoniae* e algumas de *Hafnia alvei* são prolíferas formadoras de histamina, sendo importantes na microbiologia do pescado.

López-Sabater et al. (1996) analisaram a relação da qualidade bacteriológica com o conteúdo de histamina em 18 amostras de atum, 12 de bonito e 15 de cavala e observaram que para todas as espécies a contagem de bactérias formadoras de histamina ocorreu numa proporção muito baixa representando menos de 0,1% do total da carga bacteriana. O conteúdo de histamina também foi muito baixo (<25ppm) não sendo observado nas amostras de cavala. Em condições experimentais, das bactérias isoladas, *Morganella morgani* e *Klebsiella oxytoca* foram as mais ativas produtoras de histamina com uma média de 276,5 e 141,5 ppm, respectivamente.

Veciana-Nogués, Marine-Font e Vidal-Carou (1997) ao estudarem atuns estocados a 0, 8 e 20°C observaram o maior aumento de *Enterobacteriaceae* nas amostras armazenadas a 20°C quando comparadas às amostras armazenadas a 8°C, não sendo esses microrganismos encontrados em amostras armazenadas à temperatura de 0°C e salientaram a fundamental importância da utilização da baixa temperatura na conservação do pescado.

Silveira et al. (2001) objetivando avaliar qualitativa e quantitativamente a microbiota total e produtora de histamina na superfície de peixes de origem fluvial detectaram a presença de espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em 18,4% das culturas, sendo a *Morganella morganii* a espécie que demonstrou ter o maior potencial de descarboxilação dos aminoácidos.

Jay (2005); Lehane e Olley (2000), Sillas-Santos (1996) também citaram que a espécie *Morganella morganii* apresentou este comportamento de descarboxilação de aminoácidos.

Kim et al. (2002) detectaram em atuns (*Thunnus alalunga*) armazenados em temperatura ambiente (25°C) uma contagem inicial de bactérias aeróbias igual a 1,9 e 3,4 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> na pele, 1,5 e 1,2 UFC.g<sup>-1</sup> x 10<sup>2</sup> no intestino e 6,9 e 7,7 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> na brânquia porém, a contagem bacteriana em meios seletivos para bactérias produtoras de histamina foi baixa, sendo a espécie *Hafnia alvei* a mais frequentemente isolada. Lakshamanan, Shakila e Jeyasekaran (2002) relataram resultados semelhantes em peixe e camarão estocados em gelo (0°C): do total de bactérias psicrótróficas (inicialmente 4 log UFC.g<sup>-1</sup> atingindo em 14 dias 7 log UFC.g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>) as bactérias capazes de produzir aminas biogênicas representaram um pequeno número (inicialmente 1 a 2 log UFC.g<sup>-1</sup> atingindo em 14 dias 6 log UFC.g<sup>-1</sup>).

Pons-Sánchez-Cascado et al. (2005) ao analisarem anchovas (*Engraulis encrasicolus*) estocadas em gelo por um período de 23 dias observaram um aumento do número de enterobactérias durante o período de estocagem, no entanto, apenas 8% dos isolados foram descarboxilase positivos, identificados como *Enterobacter cloacae* e concluíram que o armazenamento no gelo pode ter impedido o crescimento em maior número de bactérias produtoras de aminas biogênicas.

### 3.3.2.1.2 *Enterococcus* spp.

Os *Enterococcus* spp. fazem parte das bactérias ácido-láticas de importância nos alimentos (FRANZ et al., 2003). São cocos Gram positivos, catalase negativo, agrupados aos pares, em cadeias curtas ou células isoladas. Podem crescer em pH de 4,0 a 9,6 e a 45 °C, resistem a 6,5% de NaCl, à concentração de 40% de bile, a 0,01% de cloreto de trifeniltetrazolium, a 0,05% de telurito de potássio e a 60 °C por trinta minutos. Estas características tornam estes microrganismos indicadores de contaminação fecal e de tratamento físico e/ou químico que outros indicadores de condições higiênico-sanitárias não resistem (FRANZ et al., 2003; GIRAFFA, 2002; STILES, 2002; THATCHER; CLARK, 1973). Além disso, podem ser utilizados como indicadores de práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitam a multiplicação de microrganismos indesejáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os *Enterococcus* spp. são bactérias emergentes e vem demonstrando comportamento que requer maior atenção das autoridades em saúde coletiva. São importantes patógenos adquiridos em hospitais por pacientes imunossuprimidos e em unidades de terapia intensiva. Podem ser fonte de microrganismos resistentes a antimicrobianos, como por exemplo, à vancomicina e fonte de intoxicação como agente etiológico de doenças alimentares, principalmente pela intoxicação histamínica por ser capaz de produzir histamina no alimento (GIRAFFA, 2002).

Para Jørgensen, Huss e Dalgaard (2000) as bactérias ácido-láticas podem degradar arginina à ornitina, que, posteriormente, é degradada pelas *Enterobacteriaceae* à putrescina. Isso resulta em níveis de 10-15 vezes maiores de

putrescina do que o produzido pelo crescimento das *Enterobacteriaceae* sozinhas, na ausência de bactérias ácido-láticas.

Santo (2003) detectou a presença de *Enterococcus* spp. em amostras de sardinha verdadeira *in natura* porém considerou o resultado de  $3,5 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> desprezível classificando a matéria-prima como de qualidade aceitável.

Sanchez-Cascado (2005) observou a presença de *Enterococcus* spp. produtores de aminas biogênicas em anchovas (*Engraulis encrasicolus*) após o 23º dia de estocagem em gelo.

Pombo et al. (2009) ao avaliarem a qualidade de peixes anchovados comercializados no mercado varejista isolou *Enterococcus* spp. em 76% das amostras. Como se constatou a presença de histamina em todas as amostras, sugeriram uma estreita relação entre a produção de histamina e a presença desta bactéria e salientaram ainda que este fato é de extrema relevância visto que as condições adversas do produto como a concentração salina e o pH ácido, permitem o crescimento deste microrganismo.

### 3.3.3 Alterações sensoriais

Para Huss (1999) as mudanças sensoriais são as que percebemos através dos sentidos, por exemplo, aparência, odor, textura e sabor.

O peixe fresco deve apresentar-se íntegro; com escamas translúcidas unidas entre si e fortemente aderidas à pele; pele úmida, tensa e bem aderida; mucosidade aquosa e transparente; olhos vivos e destacados; com odor, cor e sabor próprios; curvatura natural do corpo; opérculo rígido com resistência à abertura; brânquias de coloração rósea a vermelho intenso, úmidas e brilhantes; carne firme, de consistência elástica; e vísceras íntegra e perfeitamente diferenciadas (BRASIL, 1997). Com o processo de deterioração, o pescado vai perdendo essas propriedades sensoriais características, tornando-se um produto de baixa qualidade (SOARES et al, 1998).

Segundo Sánchez-Cascado (2005) as primeiras mudanças sensoriais do pescado durante o armazenamento estão relacionados com a aparência e a textura. Isso ocorre porque após a morte do pescado, a interrupção da circulação sanguínea priva o músculo do aporte de oxigênio e de toda uma série de nutrientes. Havendo o

esgotamento do ATP, com a finalidade de obter energia, inicia-se a glicólise anaeróbica com produção de ácido láctico que se acumula e provoca a queda do pH com conseqüente desnaturação das proteínas miofibrilares, originando mudanças na textura do pescado. Com o tempo, a perda das reservas de energia celular leva a um desequilíbrio químico intracelular, que ativa certas enzimas endógenas proteolíticas gerando rupturas dos enlaces peptídeos que provoca o amolecimento da estrutura muscular.

Huss (1999) destaca que, de uma maneira geral, o peixe fresco apresenta um sabor doce e delicado, um odor característico, carne firme e elástica. Quando se inicia a deterioração há formação de compostos com odor e sabor ácidos e mais tarde aparecem substâncias amargas, de aspecto gomoso e aroma sulfuroso e rançoso, culminando com o caráter amoniacal e fecal, característico do pescado pútrido.

Franco e Landgraf (2005) destacam ainda que a oxidação das gorduras insaturadas durante o armazenamento provoca alterações no aroma ou coloração do pescado.

O tempo de deterioração depende principalmente da temperatura de armazenamento e do tipo de espécie de peixe (GRAM; HUSS, 1996).

Ababouch et al. (1996) determinaram a qualidade sensorial de sardinhas européias (*S. pilchardus*) estocadas em temperatura ambiente e sob refrigeração em gelo utilizando uma equipe de quatro a cinco julgadores treinados que avaliaram atributos como *rigor mortis*, odor a ranço, aspecto geral do muco, pele, olhos, brânquias e ânus, odor das brânquias e aderência das escamas no peixe cru e sabor no peixe cozido, utilizando uma escala de 10-1. Pontuações entre 10 e 7 foram dadas aos peixes frescos; 6 foi a pontuação dada aos peixes com odores e sabores neutros e, abaixo de 6, àqueles com odores e sabores desagradáveis, sendo que pontuações abaixo de 4 caracterizavam o peixe como inaceitável. Neste estudo a validade comercial da sardinha armazenada em temperatura ambiente variou de 21 a 27 horas e, daquelas armazenadas em gelo, de oito a onze dias. Foi observado ainda que a deterioração do peixe no 9º dia ocorreu devido à rancificação e que, a degradação bacteriana, foi aparente apenas no 11º dia de armazenamento. Com o avanço da deterioração, a pigmentação da pele perdeu o brilho progressivamente; o muco perdeu a transparência passando a leitoso e, finalmente, amarelado; os olhos afundaram-se significativamente; as brânquias perderam as

cores brilhantes e odor característico passando a ter odor amoniacal. Para estes autores, a cor e o odor das brânquias, aparência geral, cor das pupilas e forma dos olhos, o aparecimento de manchas de sangue ao redor do olho e a aderência das escamas foram valiosos atributos para avaliar o frescor da sardinha.

Os métodos sensoriais são os mais frequentemente utilizados para avaliar o grau de frescor do pescado pela facilidade e rapidez com que são desenvolvidos. Porém a natureza subjetiva dos mesmos exige a adoção de critérios de avaliação harmonizados e a participação de provadores treinados e familiarizados com o pescado e com os critérios de avaliação usados (NUNES; BATISTA, 2004). A União Européia, com intuito de fixar normas comuns de comercialização para certos produtos da pesca criou o regulamento nº2406 (COMUNIDADE EUROPÉIA, 1996) que inclui esquemas de avaliação do grau de frescor para alguns grupos de peixes (brancos, azuis e elasmobrânquios), cefalópodes e crustáceos e que se destinam a ser utilizados, tanto pela indústria como pelos serviços de inspeção. Entretanto, segundo Nunes e Batista (2004) esses esquemas apresentam falhas por não incluir todas as espécies de peixe comerciais e por não possuírem parâmetros adequados que permitam descrever convenientemente a alteração do pescado.

Esquemas alternativos têm sido criados com o objetivo de avaliar as amostras individualmente como o método do índice de qualidade (MIQ) que se baseia na avaliação dos diversos atributos de qualidade, como aparência, textura, olhos, brânquias e abdômen, e na modificação desses atributos de acordo com o tempo de estocagem. A cada atributo é dado um escore, que varia de zero a três ou de zero a dois (de acordo com seu grau de importância), sendo considerado zero como o melhor e três como o pior escore. O peixe, no momento da captura, apresenta pontuação zero ou próxima de zero. Conforme vai se deteriorando, os atributos vão adquirindo pontuações mais elevadas acumulando pontos de demérito, cujo valor máximo varia de acordo com o protocolo desenvolvido para a espécie estudada (SVEINSDOTTIR et al., 2003; NUNES; BATISTA, 2004).

No MIQ utiliza-se um sistema prático de classificação no qual as pontuações registradas em cada característica se somam para dar uma pontuação sensorial total, o denominado índice da qualidade (HUSS, 1999). Não é dada ênfase a um único atributo, não sendo a amostra rejeitada com base somente nos resultados obtidos em um atributo isoladamente (NUNES; BATISTA, 2004).

O principal objetivo do MIQ é obter uma correlação linear entre a qualidade sensorial das espécies expressa pela soma dos escores e o tempo de estocagem em gelo, prevendo desta forma o grau de frescor do produto (SYKES et al., 2009).

Triqui e Bouchriti (2003) compararam o método sensorial de classificação geral usado pela União Européia com o MIQ ao avaliarem o frescor de sardinhas (*S. pilchardus*) estocadas em gelo e constaram que o MIQ parece ser mais confiável na avaliação sensorial das sardinhas. Relataram também que uma pontuação IQ igual a 22 seria o limite para a negociação deste produto, pois odores rançosos já eram perceptíveis.

Teixeira (2005) avaliou as características sensoriais da corvina (*Micropogonias furnieri*) eviscerada e estocada em gelo pelo método de índice de qualidade e observou que as corvinas obtiveram escores médios de 0,3 no dia da captura e de 6,8, 11,4, 15,5 e 19,4 nos tempos 4, 7, 10 e 14 dias de estocagem, respectivamente, com destaque para os atributos aspecto superficial, que apresentou perda de brilho mais evidenciada a partir do 7º dia de estocagem e odor das brânquias que apresentou uma alteração mais notada entre o 4º e 10º dias de armazenamento.

Oliveira (2005) analisou o camarão (*Litopenaeus vannamei*) inteiro e descabeçado estocado em gelo por 20 dias e sugeriu como limite aceitável para consumo o índice de qualidade de 6,0 para o camarão cru inteiro, que equivale a um período de 12 dias de estocagem, e 5,0 para o camarão cru descabeçado equivalente a um período de 14 dias de estocagem em gelo. Nesta análise atributos como aroma, cor, melanose, aderência da carapaça e aderência da cabeça com o corpo, foram analisados.

Bonilla, Sveinsdottir e Martinsdottir (2007) estimaram um tempo máximo de armazenamento de 8 dias para bacalhau fresco (*Gadus morhua*) armazenado em gelo (0-1°C) por um período de 14 dias após aplicação do MIQ através da utilização do protocolo IQ com oito parâmetros a serem analisados e pontuação máxima de 18.

Musgrove et al. (2007) avaliaram a qualidade da sardinha (*Sardinops sagax*) no período pós-captura utilizando o MIQ e observaram que as alterações mais significativas ocorreram na aparência geral, firmeza da carne, transparência dos olhos e cor das brânquias dessa espécie.

Vaz-Pires et al. (2008) ao avaliarem duas espécies de lula (*Sepia officinalis* e *Illex coindetii*) estocadas em gelo pelo método do índice de qualidade observaram que a rejeição da primeira ocorreu no 10º dia de estocagem e da segunda no 9º dia, principalmente devido à presença de odores desagradáveis que começaram a ser perceptíveis no dia 6 e eram inaceitáveis no dia 8. A avaliação foi realizada a cada dois dias por julgadores treinados. Resultados semelhantes foram observados por Sykes et al. (2009) ao avaliarem lula da espécie *S. officinalis* estocada em gelo que apresentou a validade comercial de oito dias.

Erkan e Özden (2008) avaliaram sardinhas inteiras e evisceradas estocadas a 4°C e observaram que o limite de aceitabilidade, tomando-se como referência os parâmetros sabor e odor, ocorreu no 7º dia de estocagem em ambas as amostras, não sendo observada diferença significativa entre os analitos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL PERMANENTE

O material permanente utilizado para realização das análises, disponível nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (UFF) e no Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Embrapa Agroindústria de Alimentos foram os seguintes:

- Agitador de tubos tipo Vortex;
- Alça de platina;
- Autoclave;
- Balança eletrônica de precisão;
- Balança analítica Bel Engineering
- Bandejas de prolipropileno;
- Banho-maria;
- Bastões de vidro;
- Béqueres (150 e 250 mL);
- Bico de Bunsen;
- Centrífuga - Chermle Z360K;
- Coluna para HPLC YMC-Pack ODS-AM, 5 $\mu$ m - 12nm, 250x4,6mm ID;
- Compressor de ar;
- Contador de colônia tipo Quebec;
- Cromatógrafo Waters modelo Alliance 2695 com detector DAD 2996
- Cuba cromatográfica;

- Destilador - Quimis;
- Erlenmeyer;
- Erlenmeyer de kitsato;
- Estufa da marca Famem ® modelo 315 SE;
- Frascos Kitasato;
- Funil de Buchner;
- Fluorímetro - Sequoia–Turner ® Modelo 450;
- Geladeira – Brastemp;
- Gral e pistilo;
- Homogeneizador do tipo “Stomacher”;
- Liquidificador Osterizer;
- Microburetas (2 $\mu$ L);
- Microseringa Hamilton®;
- Nebulizador para ninhidrina;
- Pinças;
- Pipeta automática (100-1000  $\mu$ L);
- Pipetas graduadas (1, 2 e 5 mL);
- Placas de microdifusão com tampa esmerilhada;
- Provetas (50, 100 e 250 mL);
- Tesoura;
- Tubos de ensaio;
- Ultrassom Branson modelo 2210.

#### 4.2 MATERIAL DE CONSUMO

- Acetona P.A. – Merck;
- Acetonitrila P.A. – Tedia;
- Ácido Bórico P.A. – Fluk Analytical
- Ácido Clorídrico P.A. – Vetec;
- Ácido Fórmico P.A. – Tedia;
- Ácido Perclórico P.A. – Merck;
- Ácido Tricloracético P.A. – Merck;

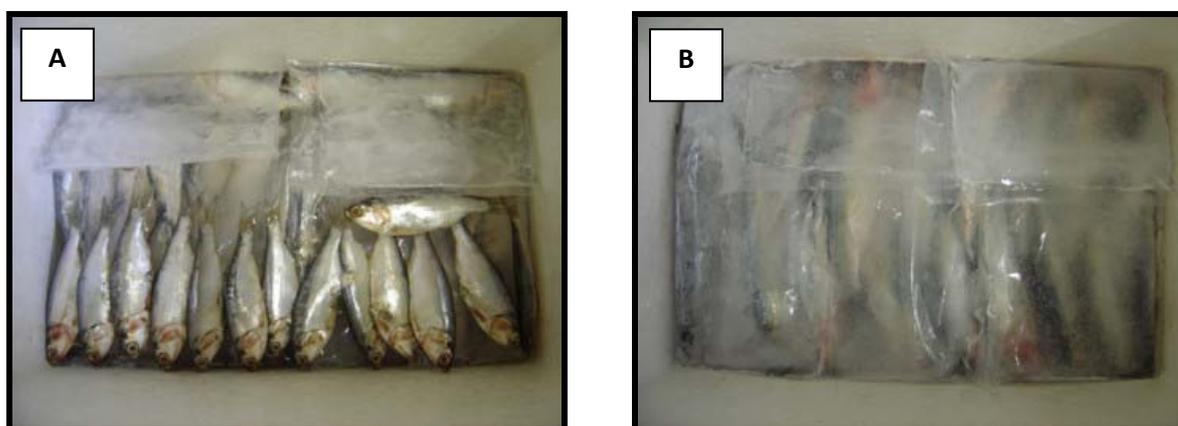
- Ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose;
- Ágar estoque;
- Ágar padrão para contagem (APC);
- Água destilada;
- Água ultra purificada Milli-Q;
- Álcool a 70 %;
- Álcool Metílico P.A. - Dinâmica;
- Carbonato de Potássio P.A.;
- Caldo Chromocult Enterococci;
- Cloreto de sódio P.A. - Merck;
- Cristal violeta;
- Dicloridrato de cadaverina - Sigma;
- Dicloridrato de histamina - Sigma;
- Dicloridrato de putrescina - Sigma;
- Fita impregnada com reativo para oxidase;
- Filtro Milipore Millex-GV Hydrophilic PVDF – 0,22 $\mu$ m;
- Fucsina;
- Hidróxido de Amônio P.A. - Vetec;
- Hidróxido de Sódio P.A. - Reagen;
- Hipoxanthine, minimum 99% - Sigma;
- Lâminas;
- Lugol;
- Microtubos do tipo Eppendorf;
- Ninhidrina – Merck;
- Papel de filtro Whatman nº 5;
- Placas de Petri esterilizadas descartáveis;
- Placa de Sílica gel em poliéster tamanho 20x20 – Alugram ® SIL G
- Ponteira 1000 $\mu$ L;
- Reativo de Kovac's;
- Resina de troca iônica – Dowex ® 1x8 – 100 (Cl) - Sigma
- Sacos plásticos para homogeneização das amostras em “Stomacher”;
- Solução de Ácido Fosfórico 1,78M;

- Solução de ortoftaldeído a 0,1 %;
- Solução salina peptonada 0,1%;
- Vaselina sólida.

#### 4.3 AMOSTRAS

As amostras de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) foram adquiridas diretamente de um entreposto localizado na Região dos Lagos (Cabo Frio) do Estado do Rio de Janeiro e as amostras de sardinha boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) foram adquiridas no momento da recepção de pescado diretamente de barcos pesqueiros no cais de uma fábrica de conservas de pescado localizada no município de São Gonçalo (RJ) no período de março a julho de 2009. Neste período foram obtidos três diferentes lotes de amostras que foram imediatamente acondicionadas em recipientes isotérmicos de poliestireno expandido com gelo e transportadas à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde foram separadas em grupos para realização das análises previstas até a completa deterioração.

Para todos os procedimentos analíticos realizados as amostras foram inicialmente lavadas em água corrente, mantidas sob refrigeração em recipientes isotérmicos de poliestireno expandido com gelo sob temperatura controlada ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) (Figuras 3 A e B) e analisadas durante 18 dias de estocagem.



**Figuras 3 A e B** – Amostras de sardinha boca-torta (*C. edentulus*) (A) e sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) (B) estocadas em recipientes isotérmicos de poliestireno expandido com gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

No primeiro lote, as análises bacteriológicas que constavam de pesquisa de *Enterobacteriaceae* e enumeração de *Enterococcus* spp. foram realizadas em duplicata em biduo no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da UFF, bem como as análises físico-químicas (determinação de bases voláteis totais e trimetilamina, quantificação de histamina, cadaverina e putrescina) realizadas no Laboratório de Controle Físico-químico de Alimentos da UFF. Deste primeiro lote, diariamente, parte da musculatura das amostras foi separada, mantida congelada e posteriormente encaminhada, sob refrigeração, ao Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Embrapa Agroindústria de Alimentos para quantificação de hipoxantina. Um segundo lote de amostras foi obtido para realização da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicotróficas feita também em biduo no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da UFF. Para avaliação sensorial das amostras, inicialmente foram realizados dois treinamentos com uma equipe de seis avaliadores no Laboratório de Análise Sensorial da UFF utilizando dois diferentes lotes de amostras de sardinhas. Um terceiro lote foi obtido apenas para a análise sensorial propriamente dita realizada em dias previamente determinados.

#### 4.4 METODOLOGIA

##### 4.4.1 Análises físico-químicas

Porções da musculatura das amostras de sardinhas foram tomadas em biduo e, com auxílio de grau e pistilo foi realizada a homogeneização. Em seguida, as alíquotas necessárias para cada análise foram pesadas em balança de precisão analítica, identificadas de acordo com o dia de estocagem e acondicionadas congeladas até o momento da análise. As amostras utilizadas para quantificação de hipoxantina foram separadas diariamente com a identificação do dia de estocagem e mantidas sob congelamento até a análise.

#### 4.4.1.1 Quantificação das bases voláteis totais e trimetilamina

A quantificação das bases voláteis totais foi realizada em duplicada de acordo com a técnica oficial de microdifusão em Placas de Conway, descrita no Manual do Laboratório Nacional de Referência Animal - LANARA (BRASIL, 1981) que se baseia na extração das bases voláteis pela adição de ácido tricloracético a 10% e liberação das mesmas pela adição de carbonato de potássio ao extrato. O nitrogênio volátil liberado difunde-se pelo ar e fixa-se na solução de ácido bórico, sendo posteriormente titulado com ácido clorídrico.

A técnica consistiu na homogeneização de 10 g da amostra homogeneizada com 10 mL de ácido tricloracético a 10% em liquidificador Osterizer. Posteriormente realizou-se a filtração do extrato em funil de Büchner acoplado a um erlenmeyer de kitasato, com papel de filtro Wathman nº5. Parte deste filtrado (2 mL) foi colocado ao compartimento externo da placa de Conway e, no compartimento central, pipetou-se 2 mL de ácido bórico de Conway (ácido bórico a 3% com indicador de Tashiro). Vaselina sólida foi passada na borda da placa que, posteriormente, foi parcialmente tampada com uma tampa de vidro. Após adição de 2 mL de solução saturada de carbonato de potássio ao compartimento externo da placa, esta foi imediatamente fechada. Esse conjunto foi em seguida incubado em estufa a 35-36°C por 2 horas e transcorrido este período realizou-se a titulação da solução do compartimento central com ácido clorídrico a 0,1 N (Figura 4).



**Figura 4** – Titulação da solução do compartimento central da placa de Conway com ácido clorídrico 0,1N para determinação das BVT em amostras de sardinhas mantidas sob refrigeração em gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Para cálculo do BVT, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{mg de N-BVT} \cdot 100 \text{ g}^{-1} = \frac{V \times N \times 14 \times 100 (T + U)}{V_A \times P}$$

Onde:

V – Volume gasto de ácido clorídrico para a titulação;

N – Normalidade do ácido clorídrico;

14 – Equivalente grama do nitrogênio;

T – Volume de solução de ácido tricloracético;

U – Umidade da amostra em gramas (8 g);

V<sub>A</sub> – Volume da alíquota analisada;

P – Peso da amostra utilizada no preparo do extrato.

Para determinação da trimetilamina, a técnica utilizada foi a descrita no mesmo manual (ibid) que consistiu em um procedimento semelhante ao anterior, sendo que, neste caso, antes da adição de 2 mL de solução saturada de carbonato de potássio ao compartimento externo da placa, adicionou-se 20 gotas de formol a 35% ao filtrado. O objetivo desta adição foi apenas a difusão da TMA na placa, pois ao reagir com o formol, a amônia se converte em hexametilenotetramina e conseqüentemente, não se difunde na placa.

A análise foi realizada em duplicata e o resultado final foi calculado de forma semelhante aquele realizado para bases voláteis totais.

#### 4.4.1.2 Quantificação de hipoxantina

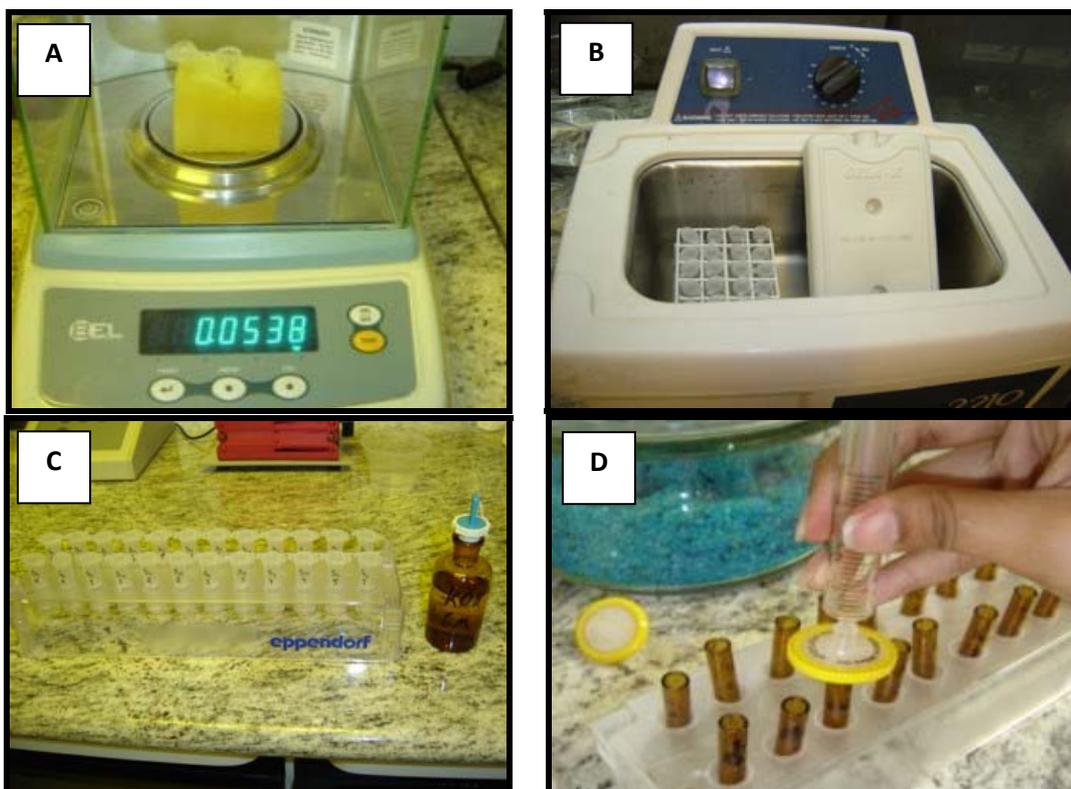
A extração da hipoxantina da amostra foi realizada segundo a técnica descrita por Val et al. (1994) e a quantificação deste composto, feita em duplicata, foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, descrito por Abreu (2008).

A análise consistiu na pesagem em balança analítica Bel Engineering de 50mg da amostra, homogeneização com ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) a 8% em agitador

mecânico ultrassom Branson modelo 2210 por 10 minutos que facilita o rompimento das células, e conseqüentemente, a liberação e extração da hipoxantina e posterior neutralização com hidróxido de potássio (KOH) 6 M com formação do precipitado perclorato de potássio. Após agitação em vortex a amostra foi filtrada em filtro Millipore Millex-GV (0,22  $\mu$ m) diretamente no vial previamente identificado (Figuras 5 A, B, C e D).

Em seguida o vial foi colocado no cromatógrafo e a amostra foi injetada de forma automática. Para a separação da hipoxantina, foi utilizada uma fase móvel com água Milli-Q:acetonitrila:ácido fórmico (97:1:2) e uma coluna de fase reversa YMC-Pack ODS (4,6 x 250 mm).

O volume de amostra injetado foi de 10 $\mu$ L e o tempo de corrida foi de 10 minutos. O resultado foi obtido pela leitura dos cromatogramas através da comparação do tempo de retenção e o espectro de absorção obtidos na análise das amostras com as do padrão de hipoxantina.



**Figuras 5 A, B, C e D** – (A) Pesagem da amostra de sardinha, (B) homogeneização da amostra com ácido perclórico 8% em agitador do tipo ultrassom, (C) adição de KOH para neutralização e (D) filtração em filtro Millipore Millex-GV (0,22  $\mu$ m) diretamente no vial para quantificação de hipoxantina por cromatografia líquida de alta eficiência,

### Elaboração da curva de calibração

O padrão de hipoxantina foi preparado através da diluição de 10 mg de hipoxanthine 99% (Sigma) pesada em balança analítica em 0,5 mL de acetonitrila 1% e 0,5 mL de ácido fórmico 1%. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL ao qual foi adicionado água Milli-Q até completar o volume.

A curva de calibração foi elaborada utilizando sete soluções preparadas através da diluição de diferentes volumes do padrão de hipoxantina com água Milli-Q conforme demonstrado no quadro 1.

**Quadro 1** – Soluções padrões de hipoxantina preparada em diferentes concentrações para elaboração da curva de calibração.

Padrão de hipoxantina (µL)	Água Milli-Q (µL)	Concentração (%)
50	950	5,0
75	925	7,5
100	900	10,0
125	875	12,5
150	850	15,0
175	825	17,5
200	800	20,0

Para cada uma dessas soluções com diferentes concentrações foram retiradas alíquotas com auxílio de uma pipeta automática e colocadas no vial previamente identificado. Esses vials foram agitados em vortex e colocados no cromatógrafo. Após a injeção dessas soluções padrão, o software Empower® da Waters representou através do cromatograma o pico de hipoxantina, juntamente com o tempo de retenção e o espectro de absorção.

#### 4.4.1.3 Quantificação de histamina por fluorimetria

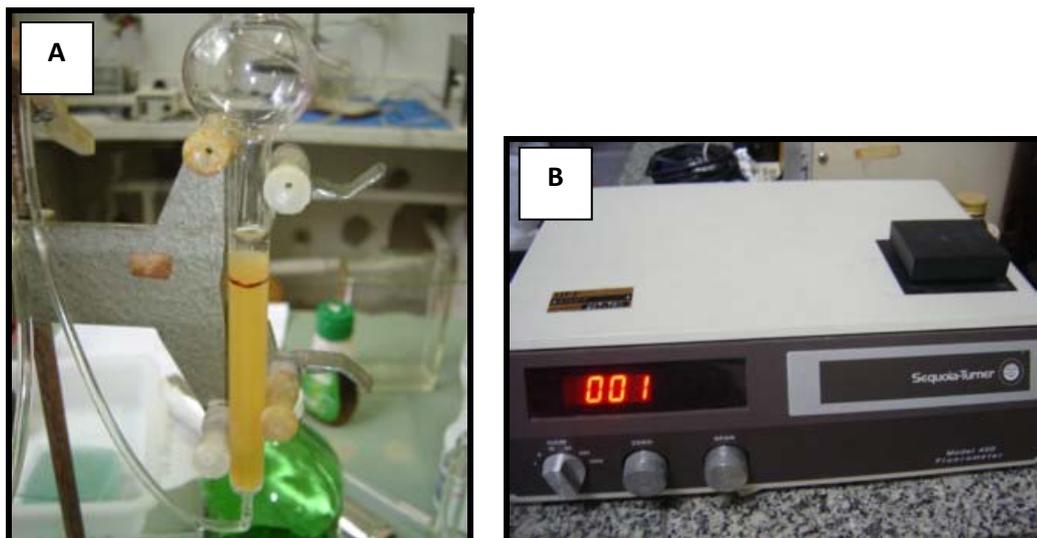
A quantificação de histamina foi realizada conforme o método quantitativo fluorimétrico preconizado pela AOAC (2002) que se baseia na reação da histamina com o Ortoftaldeído (OPT), formando um composto fluorescente.

A técnica consistiu na homogeneização de 10 g da amostra com 50 mL de metanol em liquidificador Osterizer. A função do metanol é extrair as aminas biogênicas presentes na amostra. Em seguida o homogeneizado foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL. Com o objetivo de remover resíduos da amostra que ficaram no copo do liquidificador, foram adicionados mais 50 mL de metanol que também foram transferidos para o erlenmeyer, somando 100 mL de metanol.

O erlenmeyer com o extrato foi tampado com papel alumínio e levado ao banho-maria a 60°C por 15 minutos. Decorrido este período, o conjunto foi filtrado em papel de filtro Whatman® nº1. O filtrado obtido pôde ser guardado sob refrigeração enquanto aguardava o procedimento analítico.

Posteriormente foi realizada a purificação do extrato através da filtração de 1mL da solução em coluna de troca iônica conforme figura 6 A. O filtrado foi recebido em balão volumétrico de 50mL com 5mL de ácido clorídrico (HCl) 1N. À medida que o nível do extrato alcançava 2mm acima da coluna de resina, adicionava-se 5mL de água destilada até um total de 35mL. Ao final o volume do balão foi completado com água destilada.

Do filtrado obtido, foi retirada uma alíquota de 5 mL e a esta foi adicionado 10mL de HCl 0,1N. Em seguida foram adicionados 3mL de Hidróxido de Sódio (NaCl) 1N, 1mL da solução 0,1% de OPT e 3mL de Ácido Fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 1,78M. Procedeu-se a homogeneização da solução a cada adição de reagente, sendo que, após a adição da solução de OPT, a agitação foi realizada durante quatro minutos sem interrupção. A partir da solução obtida, foi realizada a leitura no fluorímetro (Figura 6 B) e os valores obtidos foram aplicados na fórmula para a obtenção do resultado em  $\mu g.g^{-1}$ , que foi comparado com a curva padrão. Procedeu-se a calibração do fluorímetro com uma solução branco preparada de forma semelhante a anterior, diferindo apenas na adição de mais 5mL de HCl 0,1N ao invés da adição do filtrado.



**Figuras 6 A e B** – Filtração da solução de uma das amostras analisadas em coluna de troca iônica (A) e registro em fluorímetro da leitura da solução de uma das amostras analisadas (B).

Para calcular a quantidade de histamina presente na amostras analisadas, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Histamina mg.kg}^{-1} = \frac{(I_s - b) \times 100}{P \times a}$$

Onde:

$I_s$  = leitura da fluorescência no aparelho

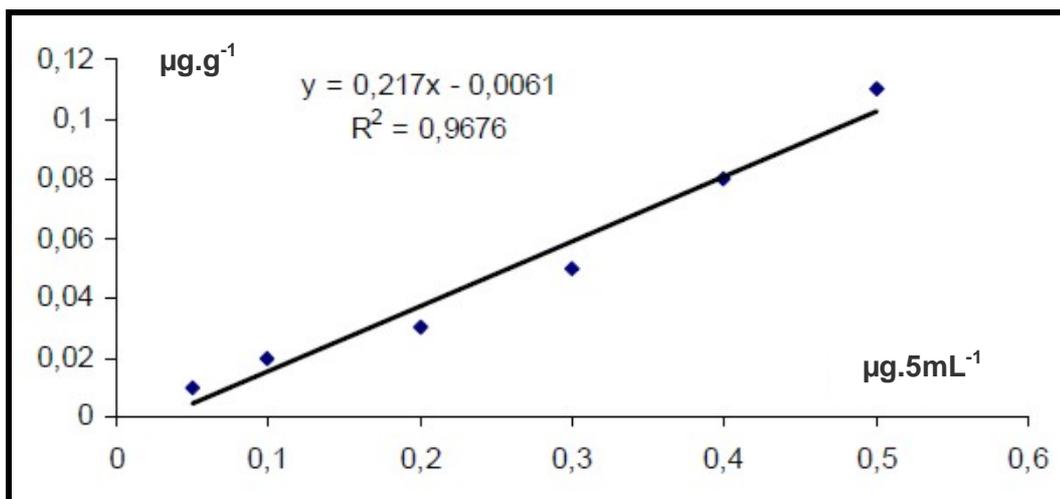
$b$  = coeficiente linear da reta obtida a partir da “curva padrão”

$P$  = massa da amostra em g

$a$  = coeficiente angular da reta obtida a partir da “curva padrão”

1000 = fator de diluição

Os coeficientes  $a$  e  $b$  foram obtidos no plano cartesiano contendo a curva padrão utilizada por Pombo et al. (2009) (Figura 7).



**Figura 7** – Plano cartesiano contendo a “Curva Padrão” da quantificação de histamina utilizada no método Fluorimétrico. Fonte: Pombo et al. (2009).

#### 4.4.1.4 Semi-quantificação de putrescina e cadaverina por CCD (cromatografia em camada delgada)

A quantificação das aminas biogênicas putrescina e cadaverina foi realizada segundo a metodologia descrita por Schutz, Chang e Bjeldanes (1976).

Empregando esta técnica, 1 g da amostra em tubo de ensaio foi homogeneizada com 2mL de metanol em agitador tipo Vortex com auxílio de uma espátula. O conjunto foi aquecido em banho-maria a 100°C até completa coagulação das proteínas e, posteriormente, foi colocado na centrífuga a 3000 rpm por 2 minutos para obtenção do sobrenadante.

A placa de sílica em gel foi previamente preparada para cada uma das aminas. Os padrões de 2 µL, 5 µL e 10 µL (preparados conforme preconizado por Schutz, Chang e Bjeldanes (1976)) foram aplicados com auxílio de uma microseringa Hamilton®, bem como 10 µL das amostras com auxílio de um pipetador automático. Posteriormente as placas aplicadas com os padrões e as amostras foram colocadas em cuba cromatográfica com tampa, contendo um eluente previamente preparado (20 mL de Acetona e 1 mL de Hidróxido de Amônio – 20:1 v/v).

Ao término da corrida cromatográfica a placa foi secada com fluxo de ar quente por um período de 20 minutos e em estufa a 36 °C por uma hora, para a eliminação do excesso de hidróxido de amônia. Para visualização das aminas, a

placa foi revelada por aspersão uniforme de solução de ninhidrina a 0,3 % em metanol seguida de novo fluxo de ar quente. Foram obtidas manchas correspondentes aos padrões e à amostra e a leitura foi realizada pela comparação visual das manchas dos padrões com as manchas de mesmo deslocamento das amostras, avaliando também a intensidade da cor.

#### **4.4.2 Análises bacteriológicas**

As análises bacteriológicas foram realizadas em biduo utilizando as metodologias descritas no Manual Merck (2000) e na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003).

Na RDC nº 12 (BRASIL, 2001), para pescados refrigerados consta apenas a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp.. A análise de *Enterococcus* spp. e *Enterobacteriaceae* não são citadas nesta legislação, porém foram realizadas devido a importância como contaminantes de origem fecal e produtores de aminas biogênicas os alimentos.

Todas as análises foram realizadas seguindo as normas de segurança laboratorial através da utilização de jaleco, calça comprida e sapato fechado, bem como máscara, óculos de proteção e cabelos presos, com o objetivo de evitar acidentes durante o tempo de permanência no laboratório.

Com o objetivo de manter as condições sanitárias reais das amostras, antes das análises tomou-se o cuidado de lavar bem as mãos com água e sabão, bem como sanificar a bancada com álcool 70% e todo material utilizado (pinça, tesoura e bandeja de aço inox) que também foi flambado.

##### **4.4.2.1 Preparo de material e meios de cultura**

O material utilizado (sacos para Stomacher, microtubos do tipo Eppendorf e ponteiros) foi esterilizado em autoclave do tipo vertical (121°C/15 minutos).

Os meios de cultura utilizados foram preparados segundo as instruções descritas no manual da marca comercial (MERCK, 2000) e aquelas do rótulo do próprio meio. Os meios foram pesados em balança analítica de precisão, adicionados de água destilada, homogeneizados em tela de amianto sobre chama

até completa dissolução e o pH foi aferido com fita indicadora e corrigido quando não se encontrava no limite de valor ideal com adição de algumas gotas de solução de HCl (ácido clorídrico) 1N ou KOH (hidróxido de sódio) 1N, para acidificação ou alcalinização do meio, respectivamente. Os meios foram distribuídos em frascos ou tubos de ensaio, embalados e identificados. Em seguida foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C por 15 minutos. O meio ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG), conforme especificação de preparo, não foi submetido a esterilização, sendo apenas diluído em tela de amianto sobre chama e distribuído assepticamente nas placas de petri esterilizadas.

#### 4.4.2.2 Preparo das amostras

A porção da amostra a ser analisada foi coletada com o cuidado de se retirar apenas a musculatura (Figura 8).

De cada amostra foi coletada uma alíquota de 25 g que foi homogeneizada em homogeneizador do tipo “Stomacher” (SEWARD - Stomacher 80) com 225 mL de solução salina peptonada (SSP) a 0,1% para preparo da diluição  $10^{-1}$ . Em seguida, foram preparadas as diluições consecutivas em microtubos do tipo Eppendorf utilizando-se 0,1 mL desta diluição em 0,9 mL de SSP a 0,1%. Para o primeiro dia de análise (dia 0), com objetivo de se conhecer as condições sanitárias das amostras, foram realizadas diluições até  $10^{-8}$ . Nos dias consecutivos as diluições foram preparadas de acordo com os resultados obtidos nas análises anteriores, para minimizar os gastos sem interferir nos achados.



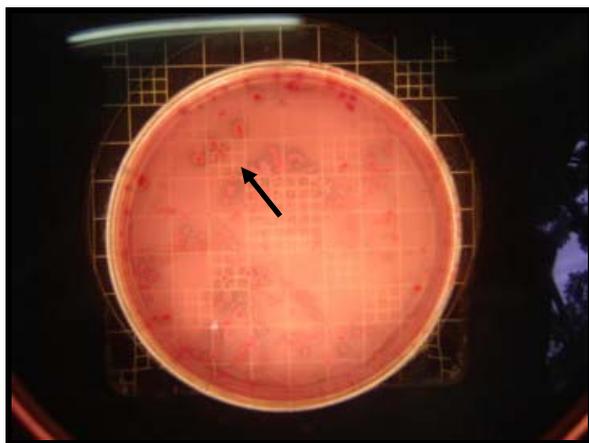
**Figura 8** – Retirada da porção muscular da amostra de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) para realização das análises bacteriológicas.

#### 4.4.2.3 Contagem de *Enterobacteriaceae*

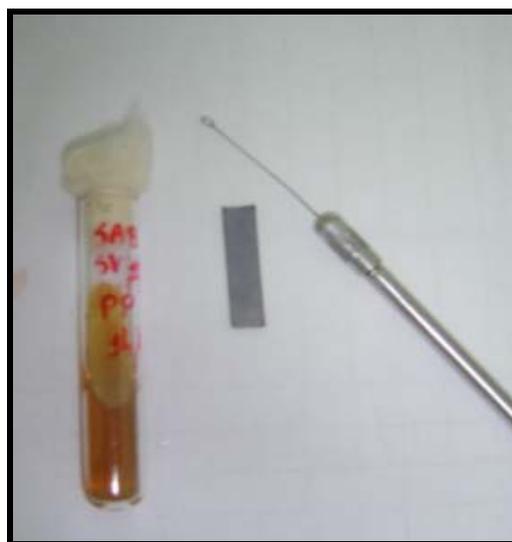
Para pesquisa de *Enterobacteriaceae* foi utilizada a técnica de contagem em placas método “Spread Plate” descrita na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003) que se baseia na inoculação das diluições (0,1 mL) em ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose e posterior incubação a 35-37 °C por 18-24 horas. Neste meio de cultura o cristal violeta e os sais biliares como o desoxicolato de sódio e o tauracolato de sódio atuam como inibidores da microbiota Gram positiva. A composição do meio evidencia a habilidade dos microrganismos fermentarem a glicose com produção de ácido, reação indicada por uma viragem do indicador a vermelho, e a precipitação de sais biliares observada pela formação de halo vermelho ao redor das colônias (Figura 9). As placas que continham entre 15 e 150 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram selecionadas sendo contadas as UFC de coloração vermelha, rodeadas ou não por halo de precipitação da bile presente no meio em contador de colônias tipo Quebec. O resultado final das contagens foi corrigido através da multiplicação do valor obtido por 10 (fator de correção na técnica de minituarização) para obtenção do número de UFC.g<sup>-1</sup> de amostra.

Três UFC típicas foram selecionadas, repicadas para tubos com ágar estoque inclinado e incubadas a 35-37 °C (24 horas) para realização da prova da oxidase através da utilização de fita impregnada com reativo para oxidase e alça de platina

(Figura 10). Nesta prova o aparecimento de cor azul (N'N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) após espalhamento da cultura sobre a fita é indicativo de reação positiva. Todas as enterobactérias são oxidase negativa.



**Figura 9** – Colônias características de *Enterobacteriaceae* rodeadas de halo vermelho indicativo da precipitação de sais biliares devido a produção de ácido no meio.



**Figura 10** – Material utilizado para realização da prova da oxidase: tubo de ensaio com Agar estoque, fita impregnada com reativo para oxidase e alça de platina

#### 4.4.2.4 Enumeração de *Enterococcus* spp.

A enumeração de *Enterococcus* spp. foi realizada pelo método de miniaturização (MERCK, 2000 modificado por FRANCO; LEITE, 2005) que objetiva a redução do consumo do meio de cultura utilizado, sem alteração da especificidade e confiabilidade do procedimento analítico.

A enumeração baseia-se na inoculação das diluições (0,1 mL) em três séries de três microtubos do tipo Eppendorfs contendo o meio “Chromocult Enterococci Broth” e incubação a 45 °C (24-48 horas). A azida sódica presente nesse meio inibe o crescimento de bactérias acompanhantes, principalmente bactérias Gram-negativas e o substrato cromogênico 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- $\beta$ -D-Glucopiranosídeo (X-GLU) quando quebrado pela enzima  $\beta$ -D-Glucosidase característica do *Enterococcus* resulta na viragem da cor do meio para azul esverdeado (Figura 11).



**Figura 11** – Viragem da cor do meio “Chromocult Enterococci Broth” para azul esverdeado (microtubo da esquerda) característico do crescimento de *Enterococcus* spp.

A partir dos cultivos positivos (azuis esverdeados) foi realizado o cálculo final a partir da seguinte fórmula:

$$\text{NMP} = \frac{\text{NMP da tabela} \times \text{fator de diluição intermediário} \times 10 \text{ (fator de correção)}}{100}$$

#### 4.4.2.5 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicotróficas (CBHAP)

A CBHAM e a CBHAP foram realizadas pela técnica de contagem padrão em placa método “Pour plate”, descrita na Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2003).

Esta técnica baseia-se na inoculação das diluições (0,1 mL) em duplicada nas placas com Ágar Padrão para Contagem (APC) e posterior incubação. Para a CBHAM a incubação foi feita a 35-37 °C por 48 horas e para CBHAP a incubação foi feita a 4±1°C por 7 dias.

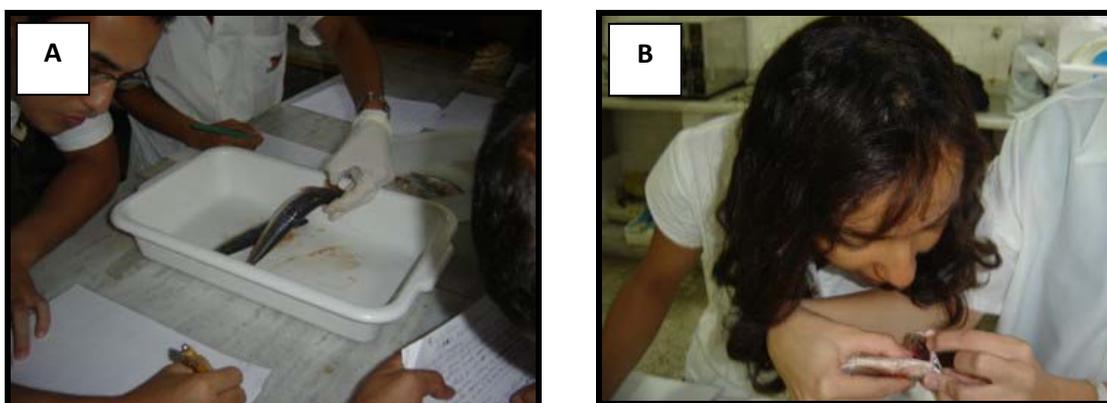
As placas que continham entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram selecionadas e contadas em contador de colônias tipo Quebec. O resultado final das contagens foi corrigido multiplicando o valor obtido por 10 que é o

fator de correção na técnica de minituarização para obtenção do número de UFC/g de amostra.

#### 4.4.3 Análise sensorial

O frescor do peixe inteiro foi avaliado sensorialmente pela utilização do Método de Índice de Qualidade (MIQ) conforme descrito por Sveinsdottir et al. (2003).

Para realização desta análise, seis julgadores passaram por dois treinamentos para elaboração do protocolo de Índice de Qualidade (IQ) utilizando exemplares de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta cruas inteiras e refrigeradas, identificadas para cada tempo de armazenamento. No primeiro treinamento as amostras foram avaliadas no 1º, 4º, 7º, 9º, 14º e 17º dias de estocagem e, no segundo treinamento, a avaliação das amostras ocorreu no 2º, 6º, 9º, 13º e 16º dias de estocagem. As amostras foram retiradas do gelo cerca de 30 minutos antes de cada sessão e expostas aos avaliadores em bandejas plásticas de cor branca (Figuras 12 A e B).



**Figuras 12 A e B** – Treinamento da equipe com amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) refrigeradas para elaboração do protocolo IQ.

Durante os treinamentos, orientados pela líder de equipe, foi permitida a comunicação entre os avaliadores. As mudanças observadas no aspecto geral, olhos, brânquias, boca e abdômen das amostras foram listadas e por consenso, a equipe selecionou os atributos pertinentes a cada situação. A líder de equipe, a partir dos atributos levantados durante os treinamentos, elaborou um esquema final (protocolo IQ) no qual os escores variaram de 0 a 2, de acordo com os parâmetros

avaliados, sendo que zero foi considerado como o melhor e dois como o pior escore (Quadros 2 e 3). Este esquema foi apresentado a equipe dias antes da análise para que houvesse uma concordância de que os atributos considerados estavam de acordo com aqueles pertinentes durante o treinamento.

**Quadro 2** – Protocolo IQ elaborado para avaliação da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) refrigerada em gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Parâmetros		Características	PT
Aspecto geral	Pele	Brilho metálico intenso, três cores bem definidas	0
		Brilho metálico menos intenso, diminuição da definição das cores	1
		Perda do brilho metálico, definição de apenas duas cores, superfície com limosidade	2
	Escamas	Bem aderidas	0
		Soltas	1
	Firmeza da carne	Firme	0
		Ligeiramente amolecida	1
		Amolecida, sinal de Godet	2
	Olhos	Córnea	Límpida
Ligeiramente opaca			1
Opaca			2
Pupila		Preta, delineada	0
		Enevoadada, perda do delineamento	1
		Cinzenta, sem delineamento	2
Forma		Plana	0
		Côncava	1
Brânquias		Odor	Algas
	Maresia		1
	Pútrido		2
	Cor	Vermelho vinho	0
		Vermelho claro	1
		Pálida	2
Boca	Odor	Algas	0
		Maresia	1
		Pútrido	2
	Cor	Vermelha	0
		Rósea	1
		Pálida	2
Abdômen	Aspecto	Íntegro	0
		Ventre rompido	1

**Quadro 3** – Protocolo IQ elaborado para avaliação da sardinha boca-torta (*C. edentulus*) refrigerada em gelo ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Parâmetros		Características	PT
Aspecto geral	Pele	Brilho metálico intenso, duas cores bem definidas	0
		Brilho metálico menos intenso, duas cores definidas	1
		Perda do brilho metálico e definição das cores, superfície com limosidade	2
	Escamas	Bem aderidas	0
		Soltas	1
	Firmeza da carne	Firme	0
		Ligeiramente amolecida	1
		Amolecida, sinal de Godet	2
	Olhos	Córnea	Límpida
Ligeiramente opaca			1
Opaca			2
Pupila		Preta, delineada	0
		Enevoada, perda do delineamento	1
		Cinzenta, sem delineamento	2
		Convexa	0
		Plana	1
		Côncava	2
Forma		Plana	0
	Côncava	1	
Brânquias	Odor	Algas e ferroso	0
		Ferroso intenso	1
		Pútrido	2
	Cor	Vermelho vivo	0
		Rósea	1
		Pálida	2
	Aspecto	Ausência de muco	0
Presença de muco		1	
Boca	Odor	Algas e ferroso	0
		Ferroso intenso	1
		Pútrido	2
	Cor	Vermelha	0
		Rósea	1
		Pálida	2
	Aspecto	Ausência de muco	0
		Presença de muco	1
	Abdômen	Aspecto	Íntegro
Ventre rompido			1

Após o período de treinamento, as amostras de sardinha verdadeira e de sardinha boca-torta de diferentes dias de estocagem (1º, 3º, 9º, 11º, 15º e 1º, 7º, 10º, 14º, 17º, respectivamente) foram depositadas em bandejas previamente codificadas com números aleatórios de três dígitos e observadas pelos julgadores em condições laboratoriais padronizadas sob luz natural. Cada julgador analisou as amostras individualmente e registrou sua avaliação para cada parâmetro de qualidade no protocolo IQ anteriormente preparado para cada amostra. As pontuações registradas para cada característica foram somadas para dar uma pontuação sensorial total, o denominado índice de qualidade (Figura 13).



**Figura 13** – Amostras de sardinha boca-torta (*C. edentulus*) depositadas em bandejas codificadas e ficha para procedimento de análise sensorial pela utilização do protocolo IQ.

#### 4.4.4 Tratamento estatístico dos resultados

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através da utilização do programa computacional Bio Estat 5.0 (AYRES, 2007), empregando-se a análise de regressão linear com o objetivo de avaliar as mudanças nas características bacteriológicas, físico-químicas e sensorial de cada amostra estudada em função do tempo de estocagem.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A seguir serão apresentados os resultados das análises físico-químicas, bacteriológicas e sensoriais obtidos no presente estudo, bem como a discussão dos mesmos.

### **5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas em amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) são descritos e discutidos nos itens subsequentes.

#### **5.1.1 BVT e TMA**

Os valores médios das análises de BVT e TMA realizadas em biduo nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 18 dias de estocagem estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** – Resultados referentes às análises de Bases Voláteis Totais (BVT) e Trimetilamina (TMA) ( $\text{mg N.100 g}^{-1}$ ) realizadas em biduo em amostras de sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 18 dias de estocagem.

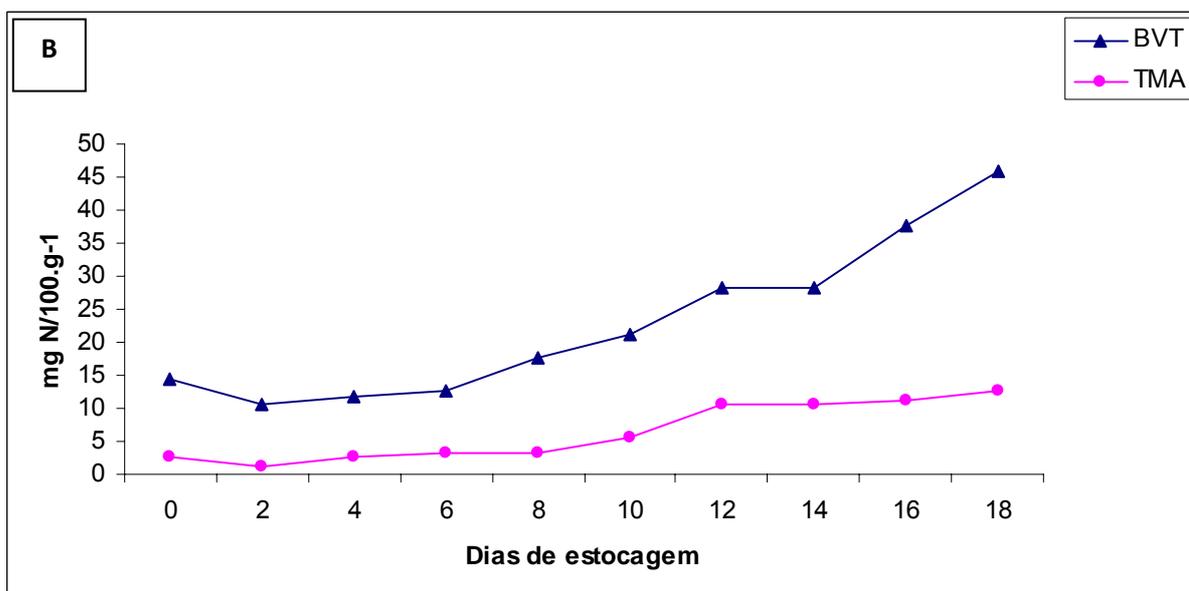
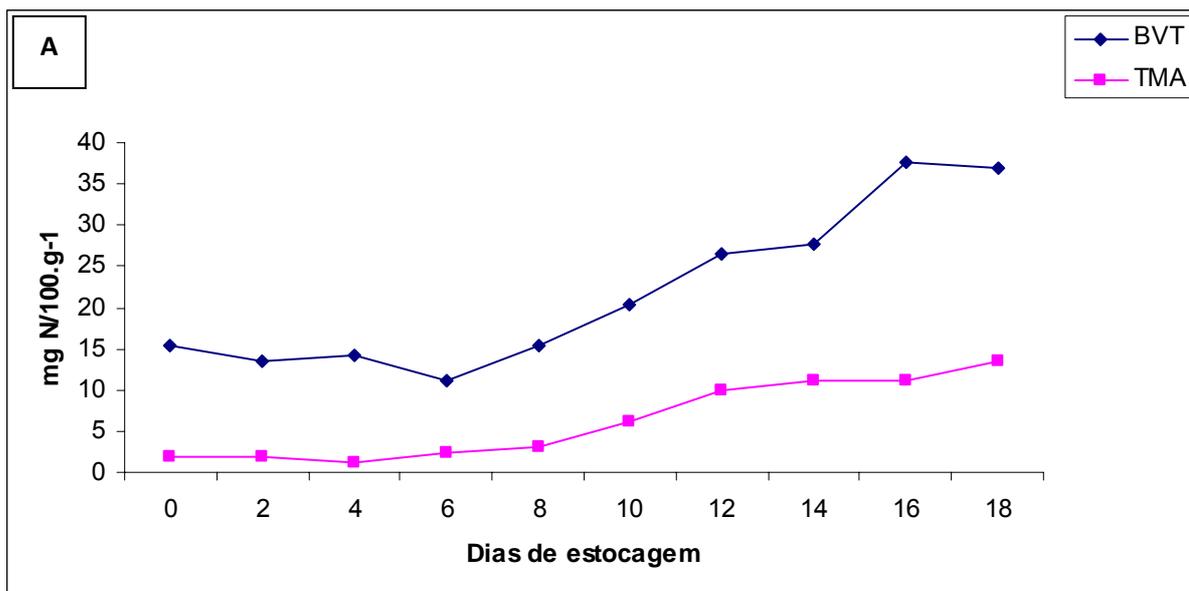
Dias de Estocagem	Sardinha verdadeira ( <i>S. brasiliensis</i> )		Sardinha boca torta ( <i>C. edentulus</i> )	
	BVT	TMA	BVT	TMA
	( $\text{mg N.100 g}^{-1}$ )	( $\text{mg N.100 g}^{-1}$ )	( $\text{mg N.100 g}^{-1}$ )	( $\text{mg N.100 g}^{-1}$ )
<b>0</b>	15,40	1,85	14,38	2,51
<b>2</b>	13,55	1,85	10,65	1,25
<b>4</b>	14,17	1,23	11,91	2,51
<b>6</b>	11,09	2,47	12,53	3,14
<b>8</b>	15,40	3,09	17,52	3,14
<b>10</b>	20,33	6,16	21,30	5,64
<b>12</b>	26,49	9,86	28,20	10,65
<b>14</b>	27,72	11,09	28,20	10,65
<b>16</b>	37,58	11,09	37,59	11,28
<b>18</b>	36,96	13,55	45,74	12,53

Conforme observado na tabela 1 o teor de BVT inicial nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca torta foi de  $15,40 \text{ mg N.100 g}^{-1}$  e  $14,38 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ , respectivamente, aumentando gradualmente e atingindo o limite máximo permitido na legislação brasileira ( $30 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ ) após o 14º dia de estocagem nas duas amostras. Pereira e Tenuta-Filho (2005) mencionam que, como as BVT também incluem a amônia, metabólito presente também no pescado fresco, os valores iniciais são bem acima de zero e, à medida que o pescado se degrada, há um aumento exponencial no valor de BVT como foi comprovado neste estudo.

De acordo com os resultados obtidos para BVT no presente estudo, as sardinhas puderam ser classificadas inicialmente como de média qualidade, pois segundo Ogawa e Maia (1999) peixes em excelente estado de frescor apresentam teor de BVT entre  $5\text{-}10 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ , os que apresentem média qualidade possuem entre  $15\text{-}25 \text{ mg N.100 g}^{-1}$  e, aqueles em deterioração, podem ter entre  $30\text{-}40 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ , atingindo, em estágios mais avançados, teor acima de  $50 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ .

O teor inicial de TMA, também demonstrado na tabela 1, foi de 1,85 mg N.100 g<sup>-1</sup> e 2,51 mg N.100 g<sup>-1</sup>, nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta, respectivamente, sendo que após o 8º dia nas duas amostras, o limite máximo preconizado na legislação para bases voláteis terciárias foi alcançado. Marrakchi et al. (1990) afirmam que, a partir do teor de TMA, seria possível classificar o frescor de sardinhas em 1ª qualidade, para as espécies com ótimo frescor e que apresentem teor de TMA menor que 1 mg N.100 g<sup>-1</sup>; 2ª qualidade para aquelas com bom frescor e conteúdo entre 1-3 mg N.100 g<sup>-1</sup>; e 3ª qualidade para as espécies com frescor intermediário que apresentem um teor de TMA maior que 5 mg N.100 g<sup>-1</sup>. Ababouch et al. (1996) consideram que o limite máximo aceitável de TMA deve estar entre 10-15 mg N.100 g<sup>-1</sup> e que, para o pescado ser classificado como de boa qualidade, deve conter teor menor que 1,5 mg N.100 g<sup>-1</sup>. Sendo assim, no presente estudo as amostras de sardinha puderam ser classificadas inicialmente como de 2ª qualidade visto que apresentaram teores de TMA inferiores a 3 mg N.100 g<sup>-1</sup>.

Nas figuras 14 A e B observa-se que a evolução do teor de BVT e TMA, nas amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca torta (*C. edentulus*) respectivamente, ocorreu em função do tempo de armazenamento sob refrigeração (0±2°C). Na mesma figura verifica-se que, à medida que o teor de TMA aumenta, o teor de BVT aumenta de forma proporcional, demonstrando a estreita relação entre esses compostos, pois a TMA é uma base nitrogenada produzida essencialmente no peixe refrigerado por bactérias deteriorantes que constitui uma das BVT. Além disso, os níveis superiores de BVT sugerem a produção de outros compostos nitrogenados, como a amônia, resultante da proteólise bacteriana e metabolismo dos aminoácidos, conforme mencionado por Ababouch et al. (1996).



**Figuras 14 A e B** – Representação gráfica do teor de BVT e TMA ( $\text{mg N} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) em (A) sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e (B) sardinha boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem.

A tabela 2 apresenta os modelos de equação linear para as análises das BVT e TMA realizadas nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta em função do período de estocagem.

**Tabela 2** – Modelos de equação de regressão das análises de BVT e TMA (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p)

Análises físico-químicas		Modelo de regressão	$R^2$	p > F
<b>Sardinha verdadeira</b>	<b>BVT</b>	$Y = 5,83 + 2,91.x$	0,81	0,0006
	<b>TMA</b>	$Y = - 1,93 + 1,48.x$	0,90	0,0001
<b>Sardinha boca-torta</b>	<b>BVT</b>	$Y = 2,70 + 3,65.x$	0,86	0,0003
	<b>TMA</b>	$Y = - 1,21 + 1,37.x$	0,88	0,0015

Nesta tabela observa-se que o tempo de estocagem em gelo ( $0 \pm 2^\circ\text{C}$ ) influenciou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a produção BVT e TMA nas duas amostras estudadas.

Os valores iniciais para BVT deste estudo foram semelhantes aos observados por Pereira e Tenuta-Filho (2005) ao avaliarem sardinhas verdadeiras frescas. Porém foram mais altos que os relatados por Kilinc e Cakli (2004) e Ndaw et al. (2008) e mais baixos que os encontrados por Aubourg, Sotelo e Gallardo (1997) e Oetterer et al. (2003), variação que pode ter ocorrido em função da qualidade da matéria-prima analisada por esses estudiosos.

Os resultados encontrados nesta pesquisa concordaram com os observados por Marrakchi et al. (1990), que ao avaliarem as alterações sensoriais, químicas e microbiológicas de sardinhas europeias (*Sardina pilchardus*) durante 18 dias de estocagem em gelo, notaram que os valores médios de TMA nos dias 0, 9 e 18 foram de 0,16, 4,84 e 10,78 mg N.100 g<sup>-1</sup> respectivamente. Esses autores observaram também que o valor médio inicial de BVT foi de 13,41 mg N.100 g<sup>-1</sup>, atingindo nos dias 9 e 18 valores de 21,48 e 37,46 mg N.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Contudo os resultados deste trabalho diferiram dos achados por Erkan e Özden (2008) e Teodoro, Andrade e Mano (2007). Os primeiros autores avaliaram sardinhas da espécie *S. pilchardus* inteiras e evisceradas estocadas em gelo ( $4^\circ\text{C}$ ) e observaram um valor médio inicial de BVT de 11,11 e 10,18 mg N.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente, atingindo, ao final de nove dias de estocagem, uma média de 29,03 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas sardinhas inteiras e 15,03 mg N.100 g<sup>-1</sup> nas sardinhas evisceradas e um teor de TMA inicial de 2,5 e 2,6 mg N.100g<sup>-1</sup> que, ao final do estudo, atingiu 4,16 e 2,36 mg N.100g<sup>-1</sup> nas amostras de sardinhas inteiras e

evisceradas, respectivamente, concluindo desta forma, que nas sardinhas inteiras a atividade enzimática e bacteriana que ocorre nas vísceras influencia diretamente no teor das BVT. Os segundos autores objetivando avaliar o efeito da embalagem de sardinhas (*S. brasiliensis*) em atmosfera modificada mantidas sob refrigeração, observaram que a partir do 10º dia a amostra controle (sem tratamento) apresentou valores acima do permitido na legislação ( $30 \text{ mg N.100 g}^{-1}$ ) e a amostra embalada a vácuo apresentou-se imprópria a partir do 13º dia. Nas amostras embaladas com  $\text{CO}_2$  a presença de BVT acima do limite estabelecido foi detectada no 20º dia de armazenamento, o que comprova que a embalagem em atmosfera modificada pode ter influenciado no número de bactérias presentes e/ou na habilidade dessas bactérias em agir na desaminação dos compostos nitrogenados não protéicos.

### **5.1.2 Hipoxantina**

Os valores médios de hipoxantina obtidos nas análises diárias dos exemplares de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta mantidas sob refrigeração em gelo ( $0 \pm 2^\circ\text{C}$ ), durante 18 dias de estocagem, podem ser observados na tabela 3.

**Tabela 3** – Resultados referentes aos teores de hipoxantina ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) em sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem.

Dias de estocagem	Hipoxantina ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ )	
	Sardinha verdadeira	Sardinha boca-torta
	( <i>S. brasiliensis</i> )	( <i>C. edentulus</i> )
0	0,65	1,40
1	0,70	1,65
2	0,79	1,40
3	0,79	1,38
4	0,84	1,46
5	1,04	1,72
6	1,11	1,67
7	0,89	2,03
8	0,97	1,62
9	1,65	1,90
10	1,53	2,02
11	1,32	1,78
12	1,64	1,59
13	1,93	1,50
14	2,92	2,16
15	2,73	2,42
16	2,89	2,00
17	2,45	1,82
18	2,62	2,09

Conforme os dados contidos nesta tabela, no 1º dia de análise, o teor médio de Hx nos exemplares de sardinha verdadeira foi de  $0,65 \mu\text{mol.g}^{-1}$  aumentando gradativamente, de forma linear, no decorrer do período de estocagem, perfil facilmente verificado na Figura 15, atingindo  $2,62 \mu\text{mol.g}^{-1}$  no 18º dia. Nos exemplares de sardinha boca-torta, o conteúdo médio inicial foi elevado em comparação com as amostras de sardinha verdadeira ( $1,40 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ) e aumentou de forma gradativa e linear, atingindo  $2,09 \mu\text{mol.g}^{-1}$  no último dia de estocagem.

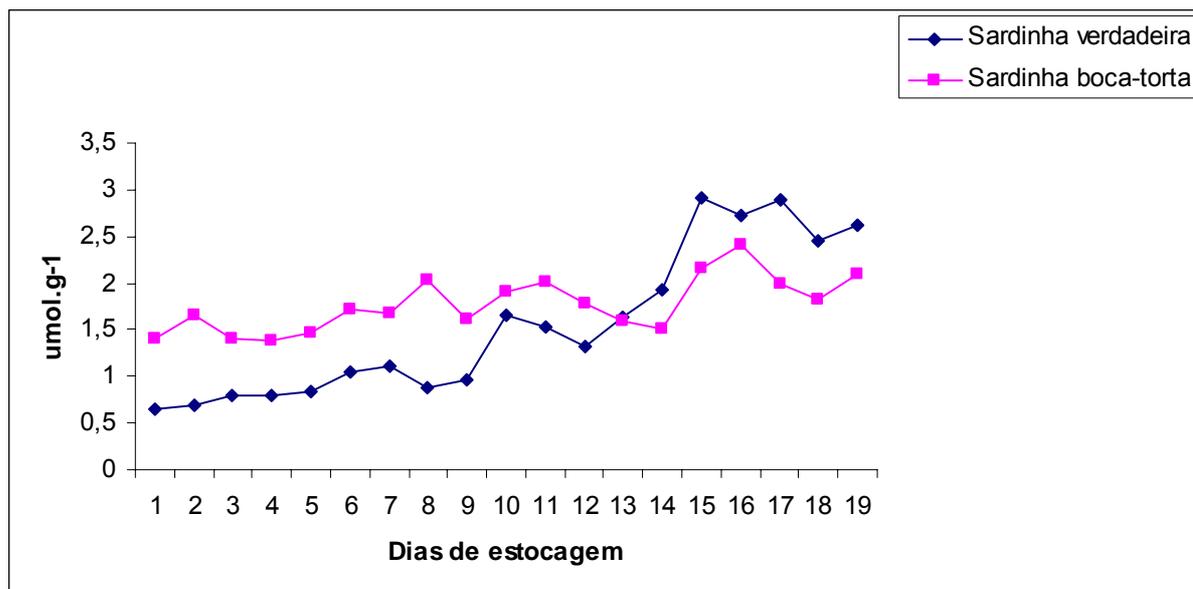
Apesar da legislação brasileira não pontuar limites para hipoxantina, trata-se de um importante parâmetro para avaliar o grau de frescor do pescado, pois é um dos primeiros compostos formados a partir da degradação do ATP pela decomposição autolítica de nucleotídeos ou pela ação bacteriana assim que o processo de deterioração se instala (GRAM; HUSS, 1996). Como a taxa e o padrão de degradação do ATP variam em função da espécie, do músculo e da maturidade dos peixes, bem como das condições de estresse durante a captura, manuseio e armazenamento (BATISTA et al., 2004; HUSS, 1999; OCAÑO-HIGUERA, et al., 2009; ÖZYURT et al., 2007; SALLAM, 2007), a diferença no teor de hipoxantina encontrado nas espécies estudadas pode ter ocorrido devido a essa variação, principalmente em virtude do estresse durante a pesca que leva ao cansaço e, conseqüente, esgotamento do ATP e ADP, acúmulo de IMP e posteriormente Hx.

Os valores obtidos no presente estudo foram superiores aos relatados por Lakshamanan, Antony e Gopakumar (1996) que estudaram a degradação de nucleotídeos em duas espécies de peixe (*Liza corsula* e *Eetroplus suratensis*) estocadas em gelo e observaram que na primeira espécie o conteúdo de Hx aumentou de  $0,175\mu\text{mol.g}^{-1}$  imediatamente após a captura, para  $1,913\mu\text{mol.g}^{-1}$  após 15 dias de armazenamento e, na segunda espécie, um aumento de  $0,16\mu\text{mol.g}^{-1}$  para  $1,14\mu\text{mol.g}^{-1}$  foi observado, após o mesmo período.

Sallan (2007) ao avaliar a validade comercial de filés de salmão armazenados sob refrigeração ( $1^{\circ}\text{C}$ ) durante um período de 15 dias observou um conteúdo de Hx inicial de  $0,62\text{-}0,68\mu\text{mol.g}^{-1}$  que aumentou significativamente para  $3,58\mu\text{mol.g}^{-1}$  ao final do experimento. Os valores iniciais da presente pesquisa para amostras de sardinha verdadeira foram coincidentes com os descritos por esse pesquisador, porém o conteúdo final foi inferior.

Confrontando os dados obtidos nessa pesquisa com os valores relatados por esses estudiosos, sugere-se, portanto, uma variação no conteúdo de hipoxantina de acordo com a espécie estudada.

A figura 15 representa graficamente a evolução gradativa do teor de hipoxantina nas duas amostras estudadas em função do tempo de armazenamento sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).



**Figura 15** - Representação gráfica da concentração de hipoxantina ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) em sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem.

Os resultados encontrados nesse estudo no que diz respeito a evolução do teor de hipoxantina em função do tempo de armazenamento, ou seja, um aumento gradativo deste composto no decorrer do período de estocagem corroboram com os obtidos por Kodaira et al. (2001); Özoğul e Özoğul (2002); Özyurt et al. (2007); Veciana-Nogués, Marine-Font e Vidal-Carou (1997) ao analisarem diferentes espécies de peixe armazenadas em diferentes temperaturas.

Na tabela 4 estão apresentados os modelos de equação linear que melhor se ajustaram ao conteúdo de hipoxantina nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca torta em função do período de estocagem. Os dados pontuados indicam que o aumento do teor de hipoxantina ocorreu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) nas duas amostras em função do tempo de estocagem. Porém, como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido pela análise de sardinha boca-torta foi de 0,47, sugere-se que existam outras variáveis que provavelmente influenciem no teor de hipoxantina dessas espécies, além do tempo de estocagem.

**Tabela 4** – Modelos de equação de regressão da análise de hipoxantina (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p)

Hipoxantina	Modelo de regressão	$R^2$	p > F
<b>Sardinha verdadeira</b> <b>(<i>S. brasiliensis</i>)</b>	$Y = 31,70 + 17,93.x$	0,85	< 0,0001
<b>Sardinha boca-torta</b> <b>(<i>C. edentulus</i>)</b>	$Y = 192,27 + 4,85.x$	0,47	0,0016

Baseado nos valores de hipoxantina obtidos nas condições desse estudo correlacionados com os resultados obtidos nas análises bacteriológicas e sensoriais é possível sugerir uma classificação quanto ao frescor das espécies estudadas. Para os exemplares de sardinha verdadeira um conteúdo de hipoxantina de  $0,70 \mu\text{mol.g}^{-1}$  seria indicativo de ótima qualidade (excelente grau de frescor), ao redor de  $1,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$  indicaria bom estado de frescor e, em torno de  $1,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ , associado à rejeição das amostras devido às alterações sensoriais e aos valores de TMA e CBHAP, seria indicativo de perda de qualidade da matéria-prima. Para os exemplares de sardinha boca torta, o conteúdo de hipoxantina entre  $1,4\text{-}1,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$  indicaria bom estado de frescor, sendo que um teor ao redor de  $1,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$  seria indicativo de perda de frescor. Neste caso, os valores iniciais mais elevados são devidos, possivelmente, ao estresse sofrido durante a pesca com rápida degradação do ATP, não sendo possível, desta forma, sugerir valores que classificassem a ótima qualidade desta matéria-prima.

### 5.1.3 Aminas biogênicas

O conteúdo de histamina, cadaverina e putrescina nos exemplares de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) analisadas em biduo por um período de 18 dias está apresentado na tabela 5.

**Tabela 5** – Resultados referentes à análise de histamina (HI) por fluorimetria ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e cadaverina (CA) e putrescina (PU) por CCD – Cromatografia em Camada Delgada ( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ ) em sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e sardinha boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ) em diferentes dias de estocagem.

Dias de estocagem	Sardinha verdadeira ( <i>S. brasiliensis</i> )			Sardinha boca-torta ( <i>C. edentulus</i> )		
	HI	CA	PU	HI	CA	PU
	( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )	( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )	( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )	( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )
0	1,8	ND	ND	1,8	ND	ND
2-8	0,0	ND	ND	0,0	ND	ND
10	1,8	< 2,0	ND	0,0	ND	ND
12	0,9	< 2,0	ND	0,0	ND	ND
14	1,8	< 2,0	ND	1,8	ND	ND
16	0,0	< 2,0	< 2,0	0,0	< 2,0	< 2,0
18	0,9	< 2,0	< 2,0	0,0	< 2,0	< 2,0

ND: Não Detectável por CCD (Cromatografia em Camada Delgada)

Com os dados da tabela 5, tanto nas amostras de sardinha verdadeira como nas amostras de sardinha boca-torta observa-se que o limite de  $10\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (100ppm) de histamina estabelecido na Portaria nº 185 (BRASIL, 1997) não foi alcançado durante todo o período de estocagem. Como no presente estudo os peixes foram mantidos sob refrigeração ( $0\pm 2^\circ\text{C}$ ), não ocorreram condições favoráveis a produção de histamina que segundo Halász et al. (1994) é controlada em alimentos armazenados a  $5^\circ\text{C}$  devido ao lento crescimento dos microrganismos produtores de histamina à baixa temperatura.

Esses resultados não estão em conformidade com os obtidos por diversos estudiosos como Marrakchi et al. (1990) que avaliaram sardinhas europeias (*Sardina pilchardus*) estocadas em gelo por um período de 18 dias e observaram que o conteúdo de histamina no 3º dia de estocagem foi de  $1,25\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ , atingindo em torno de  $18\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  ao final do estudo (18º dia); Ababouch et al. (1996) apesar terem observado que a taxa de produção de histamina foi muito maior nas amostras de sardinha europeia armazenadas em temperatura ambiente quando comparada com a estocada em gelo, obtiveram níveis de  $14,74$  e  $21,05\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  para essas

amostras, após 11 e 13 dias de armazenamento, respectivamente; Erkan e Özden (2008) também avaliaram sardinhas europeias inteiras e evisceradas estocadas em gelo (4°C) e detectaram um conteúdo inicial de histamina baixo (12,30 mg.kg<sup>-1</sup>) nas duas amostras, atingindo um nível máximo de 52,8 e 45,8 mg.kg<sup>-1</sup> nas amostras de sardinha inteira e eviscerada, respectivamente, após 7 dias de estocagem.

Pacheco-Aguilar, Lugo-Sánchez e Villegas-Ozuna (1998) reportaram valores menores de histamina (0,00018ppm) que os encontrados nesse estudo ao analisarem sardinhas (*Sardinops sagax caerulea*) estocadas a 0°C durante 15 dias de armazenamento e concluíram que o tratamento adequado pós-captura garantiu uma baixa população microbiana na superfície do peixe antes do armazenamento a 0°C.

Como pode ser observado na tabela 5, ocorreu uma variação não linear no teor de histamina em função do tempo de estocagem nas duas amostras, pois inicialmente (dia 0 de estocagem) um conteúdo de 1,8 µg.g<sup>-1</sup> foi encontrado nas duas espécies, sendo observado o mesmo conteúdo apenas no 10º e 14º dias de estocagem nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta, respectivamente. Esse fato pode ser explicado pela análise ter sido realizada em um lote e não apenas em um peixe, pela manutenção do frio realizada de forma heterogênea que propiciou a atividade histidina descarboxilase das bactérias em alguns exemplares e pela variação do conteúdo de histamina em um mesmo exemplar em função da porção muscular analisada.

Com relação a presença de cadaverina e putrescina, na legislação nacional não consta limites para essas aminas biogênicas, porém são de suma importância por potencializarem a ação da histamina como mencionado por Lehane e Olley (2000), assim como por caracterizarem a qualidade da matéria-prima, visto que a presença dessas aminas indica perda de aminoácidos como lisina e ornitina.

Nesse estudo, conforme os dados apresentados na tabela 5, um teor de cadaverina menor que 2,0 mg.100 g<sup>-1</sup> foi observado nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta no 10º e 16º dia de estocagem, respectivamente. A presença de putrescina somente pôde ser detectada a partir do 16º dia de estocagem num nível menor que 2,0 mg.100 g<sup>-1</sup> nas duas amostras. É importante salientar que a presença de outras aminas foi detectada a partir do 16º dia de estocagem nos exemplares de sardinha verdadeira e no 18º dia de estocagem na sardinha boca-torta.

## 5.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Os resultados obtidos nas análises bacteriológicas das amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca torta são visualizados nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

Cabe ressaltar que na legislação brasileira não consta limites para *Enterococcus* spp. e *Enterobacteriaceae* em pescado, porém essas análises são importantes por indicarem o estado higiênico-sanitário das amostras além desses microrganismos estarem diretamente envolvidos com a produção de histamina. Com relação a CBHAM e CBHAP, que também não são encontradas na legislação, porém importantes por avaliarem a qualidade sanitária e o grau de deterioração das amostras, respectivamente, usa-se como referência o limite de  $10^7$ UFC.g<sup>-1</sup> (7logUFC.g<sup>-1</sup>) estabelecido pela legislação internacional (ICMSF, 1974).

**Tabela 6** – Resultados referentes à contagem de *Enterobacteriaceae* (log UFC.g<sup>-1</sup>), enumeração de *Enterococcus* spp. (log NMP.g<sup>-1</sup>) e Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotróficas (CBHAP) (logUFC.g<sup>-1</sup>) em sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) mantidas sob refrigeração (0±2°C) em diferentes dias de estocagem.

Dias de Estocagem	Contagem	Enumeração	CBHAM (log UFC.g <sup>-1</sup> )	CBHAP (log UFC.g <sup>-1</sup> )
	de <i>Enterobacteriaceae</i> (log UFC.g <sup>-1</sup> )	de <i>Enterococcus</i> spp. (log NMP.g <sup>-1</sup> )		
0	NR	1,95	4,61	4,25
2	3,81	3,66	4,54	4,62
4	3,64	2,85	4,31	4,92
6	3,75	2,85	4,40	5,78
8	3,94	2,85	5,94	7,66
10	4,16	2,97	6,10	9,21
12	5,61	2,63	6,85	9,33
14	6,13	3,32	7,03	9,78
16	5,46	4,04	6,81	10,07
18	6,57	3,45	7,16	10,83

NR: Não Realizado

**Tabela 7** – Resultados referentes à contagem de *Enterobacteriaceae* (log UFC.g<sup>-1</sup>), enumeração de *Enterococcus* spp. (log NMP.g<sup>-1</sup>) e Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotólicas (CBHAP) (log UFC.g<sup>-1</sup>) em sardinhas boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração (0±2°C) em diferentes dias de estocagem.

Dias de Estocagem	Contagem	Enumeração	CBHAM (log UFC.g <sup>-1</sup> )	CBHAP (log UFC.g <sup>-1</sup> )
	de <i>Enterobacteriaceae</i> (log UFC.g <sup>-1</sup> )	de <i>Enterococcus</i> spp. (log NMP.g <sup>-1</sup> )		
0	NR	1,85	4,09	4,26
2	3,82	2,59	4,17	4,74
4	2,72	2,63	4,34	5,44
6	4,79	2,97	5,05	7,17
8	4,29	2,36	6,09	8,16
10	3,65	2,63	5,91	8,16
12	5,58	3,18	6,66	8,94
14	5,93	3,46	7,10	9,80
16	6,12	4,04	7,11	9,54
18	6,77	3,56	7,48	10,57

NR: Não Realizado

Conforme os dados das tabelas 6 e 7, observa-se que a contagem de *Enterobacteriaceae* e a enumeração de *Enterococcus* spp. variaram de 3,81 a 6,57 log UFC.g<sup>-1</sup> e 1,95 a 3,45 log NMP.g<sup>-1</sup>, respectivamente nas amostras de sardinha verdadeira e de 3,82 a 6,77 log UFC.g<sup>-1</sup> e 1,85 a 3,56 log NMP.g<sup>-1</sup>, respectivamente nas amostras de sardinha boca torta.

Com relação a CBHAM, nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca torta inicialmente foi observado um crescimento de 4,61 log UFC.g<sup>-1</sup> e 4,09 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente, que atingiu o limite de 7 log UFC.g<sup>-1</sup> preconizado na legislação internacional no 14º dia de estocagem nas duas amostras estudadas, resultados esses semelhantes aos encontrados por Santo (2003) que ao analisar amostras de sardinha verdadeira *in natura* detectou uma variação de 2,54 a 4,04 log UFC.g<sup>-1</sup> na CBHAM, considerando ser esta uma carga bacteriana normal para espécies marinhas tropicais.

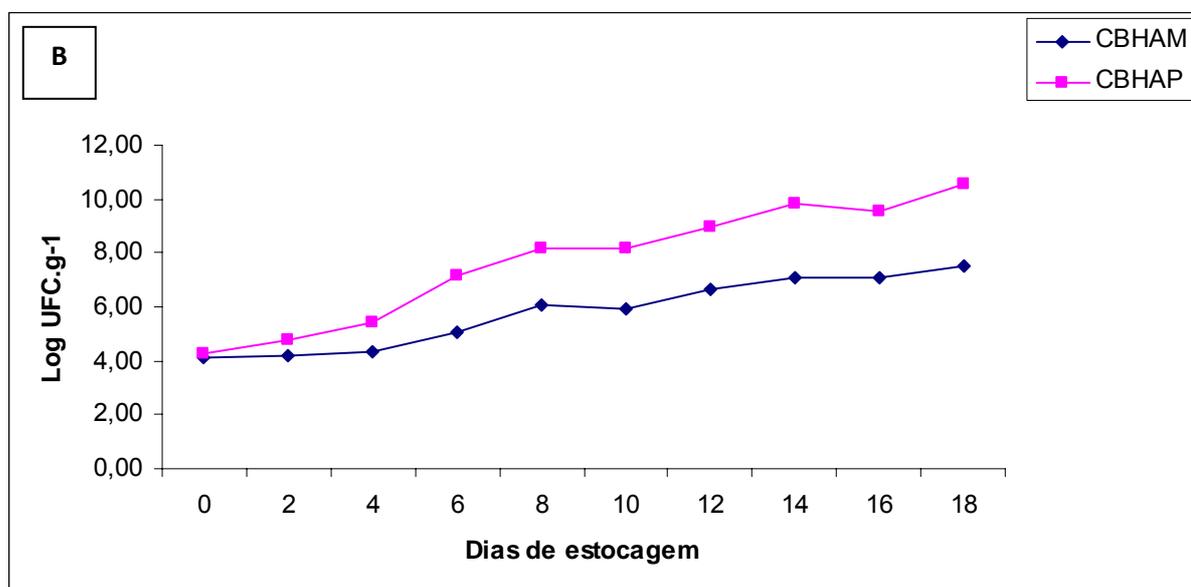
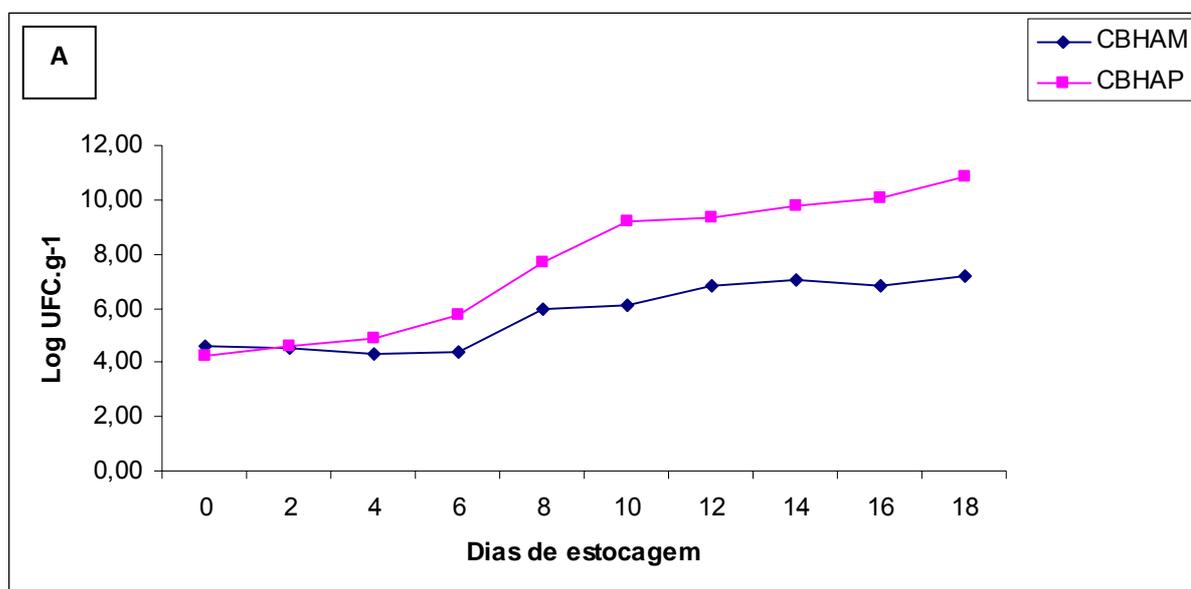
A CBHAP iniciou em 4,25 log UFC.g<sup>-1</sup> e 4,26 log UFC.g<sup>-1</sup>, nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta, respectivamente, alcançando o limite máximo previsto na legislação no 8º dia de estocagem (7,66 log UFC.g<sup>-1</sup>) nas amostras de sardinha verdadeira e no 6º dia (7,17 log UFC.g<sup>-1</sup>) nas amostras de sardinha boca-torta.

Os resultados obtidos na presente pesquisa não estão em conformidade com os relatados por diversos pesquisadores como Marrakchi et al. (1990) que observaram após as primeiras horas de captura da *S. pilchardus*, uma contagem inicial de bactérias psicotróficas igual a 1,86x10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup> (3,27 log UFC) e de *Enterobacteriaceae* igual a 2,2x10<sup>1</sup> UFC.g<sup>-1</sup> (1,34 log UFC) e que o limite de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> foi alcançado aos 9 dias de estocagem sob refrigeração (2-4°C); Özogul, Polat e Özogul (2004) que investigando o efeito da embalagem em atmosfera modificada e da embalagem a vácuo na qualidade da *S. pilchardus* estocada a 4°C observaram uma contagem de bactérias inicial um pouco abaixo de 4,0 log UFC.g<sup>-1</sup> que atingiu 6 log UFC.g<sup>-1</sup> aos 3, 8 e 10 dias na amostra controle (sem tratamento), na embalada a vácuo e na embalada em atmosfera modificada, respectivamente; Erkan e Özden (2008) que ao avaliarem sardinhas inteiras e evisceradas estocadas a 4°C, observaram uma contagem inicial de bactérias psicotróficas nas amostras de sardinhas evisceradas de 3,5 log UFC.g<sup>-1</sup> e nas sardinhas inteiras de 3,8 log UFC.g<sup>-1</sup>, atingindo no nono dia de estocagem uma contagem de 5,32 log UFC.g<sup>-1</sup> e 5,37 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Com relação a contagem de mesófilos e a contagem de *Enterobacteriaceae*, os valores encontrados nesse estudo foram semelhantes aos observados por Erkan e Özden (2008) que observaram uma contagem de mesófilos inicial de 4 e 3,8 log UFC.g<sup>-1</sup> com crescimento até 6 e 5,25 log UFC.g<sup>-1</sup> no 9º dia de estocagem nas amostras de sardinha inteira e sardinha eviscerada, respectivamente, e uma contagem de *Enterobacteriaceae* inicial de 3,5 log UFC.g<sup>-1</sup>, que ao final de nove dias de estocagem aumentou para 5,08 e 4,30 log UFC.g<sup>-1</sup> nas sardinhas inteiras e evisceradas, respectivamente.

Na figuras 16 A e B, observa-se a evolução das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) e psicotróficas (CBHAP) em função do tempo de armazenamento, para cada uma das espécies. Nestas figuras observa-se também que a CBHAP foi maior que a CBHAM, o que pode ser explicado por Jay (2005) que afirma que em baixas temperaturas os microrganismos psicotróficos têm

demonstrado boa atividade enzimática além de possuírem boa mobilidade da membrana que facilita o transporte de nutrientes, sendo portanto mais eficientes que os mesófilos na absorção de solutos.



**Figuras 16 A e B** – Representação gráfica das Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotróficas (CBHAP) (logUFC.g<sup>-1</sup>) em (A) sardinhas verdadeiras (*S. brasiliensis*) e (B) sardinhas boca torta (*C. edentulus*) mantidas sob refrigeração (0±2°C) em diferentes dias de estocagem.

Nas tabelas 8 e 9, estão apresentados os modelos de equação linear que melhor se ajustaram a cada uma das análises bacteriológicas em função do tempo

de armazenamento em gelo das espécies sardinha verdadeira e sardinha boca torta, respectivamente.

**Tabela 8** – Modelos de equação de regressão das análises bacteriológicas (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p).

Análises bacteriológicas	Modelo de regressão	$R^2$	p > F
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	$Y = 2,87 + 0,38.x$	0,83	0,0010
Enumeração de <i>Enterococcus spp.</i>	$Y = 2,46 + 0,11.x$	0,32	0,0886
<b>CBHAM</b>	$Y = 3,78 + 0,36.x$	0,85	0,0003
<b>CBHAP</b>	$Y = 3,18 + 0,81.x$	0,94	< 0,0001

**Tabela 9** – Modelos de equação de regressão das análises bacteriológicas (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) da sardinha boca-torta (*C. edentulus*) e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e níveis de probabilidade (p).

Análises bacteriológicas	Modelo de regressão	$R^2$	p > F
Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	$Y = 2,72 + 0,43.x$	0,76	0,0026
Enumeração de <i>Enterococcus spp.</i>	$Y = 1,91 + 0,19.x$	0,72	0,0015
<b>CBHAM</b>	$Y = 3,48 + 0,42.x$	0,96	< 0,0001
<b>CBHAP</b>	$Y = 3,76 + 0,71.x$	0,95	< 0,0001

O tempo de estocagem influenciou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) todas as análises bacteriológicas realizadas, conforme observado nas tabelas 8 e 9, com exceção da enumeração de *Enterococcus spp.* nos exemplares de sardinha verdadeiras que não apresentaram ajustamentos nos modelos linear e quadrático no decorrer do período de estocagem, justificada pela avaliação de um lote heterogêneo.

Apesar da contagem de *Enterobacteriaceae* e a enumeração de *Enterococcus spp.* terem aumentado de forma significativa em função do tempo de estocagem das amostras sob refrigeração, a quantidade de amins biogênicas detectada foi muito baixa. Interpreta-se, neste caso, que pode existir a presença de um pequeno número de bactérias produtoras de histamina nas amostras e que a manutenção adequada do frio, pode ter inibido a atividade histidina-descarboxilase desses microrganismos.

A elevada contagem bacteriana não está necessariamente relacionada com a produção de histamina, conforme constatado por Kim et al. (2002); Lakshamanan, Shakila e Jeyasekaran (2002); López-Sabater et al. (1996); Pons-Sanchez-Cascado et al. (2005); Silveira et al. (2001) que observaram elevadas contagens de microrganismos, entre os quais *Enterobacteriaceae*, em diferentes espécies de peixe, porém um número baixo de bactérias descarboxilase positivas.

No presente estudo, para CBHAM o limite estabelecido na legislação internacional, tanto nas amostras de sardinha verdadeira como nas amostras de sardinha boca-torta, foi alcançado apenas no 14º dia de estocagem. Sendo assim, essas matérias-primas foram classificadas como de boa qualidade e a manutenção do frio foi realizada de forma adequada, pois segundo Franco e Landgraf (2005) a contagem de mesófilos está relacionada com a qualidade sanitária dos alimentos, podendo ainda ser utilizada para indicar deficiência no armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura.

Na CBHAP o limite também estabelecido na legislação internacional foi atingido no 8º e 6º dias de estocagem nas amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta, respectivamente. Apesar de Franco e Landgraf (2005) apontarem que essa contagem permite avaliar o grau de deterioração de alimentos refrigerados e no caso das amostras de sardinha verdadeira esse resultado ter coincidido com o teor de TMA, em conformidade com os resultados sensoriais, as amostras analisadas foram classificadas como de boa qualidade para esse período, não podendo, desta forma, serem rejeitadas. Portanto, a presença dessas bactérias nas amostras não indicou deterioração, pois, conforme explicado por Huss (1999) cada produto pesqueiro possui suas próprias bactérias específicas de deterioração, e é o número dessas bactérias e não o número total de microrganismos que estabelece relação com a duração do tempo de estocagem do produto.

### 5.3 ANÁLISE SENSORIAL

O esquema MIQ pontuou índices de qualidade variando de 0 a 19 para os exemplares de sardinha verdadeira (Quadro 2) e de 0 a 23 para os exemplares de sardinha boca-torta (Quadro 3).

Nas tabelas 10 e 11 estão apresentados os escores médios obtidos pela avaliação dos julgadores a partir da aplicação do protocolo IQ na avaliação sensorial das amostras de sardinha verdadeira e sardinhas boca-torta, respectivamente, estocadas sob refrigeração. No início do período de estocagem os escores médios foram de 1,83 e 2,00, atingindo 13,33 e 16,29 ao final do período de estocagem, para as amostras de sardinha verdadeira e sardinha boca-torta, respectivamente.

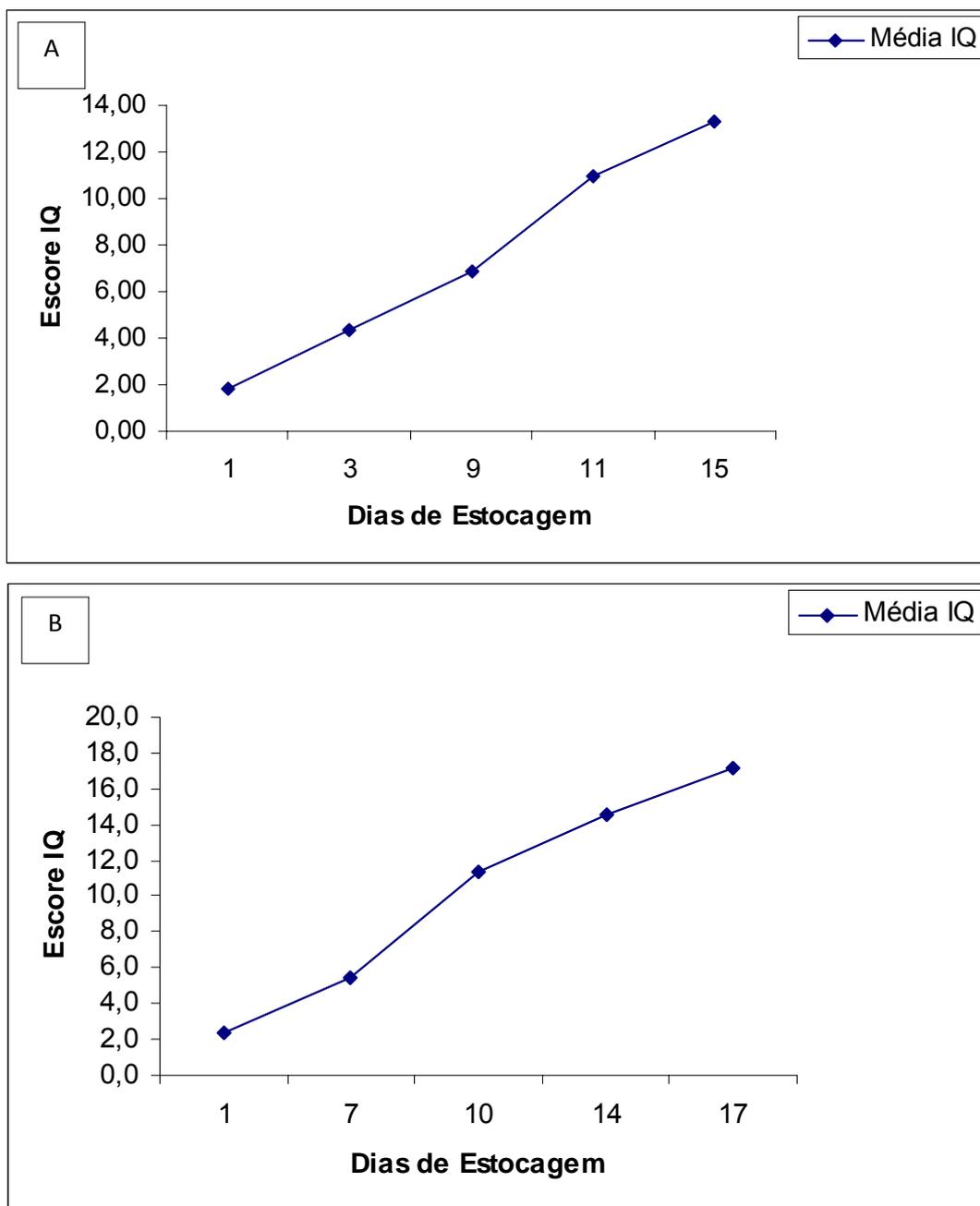
**Tabela 10** – Média dos escores resultantes da aplicação do protocolo IQ em amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) estocada sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

<b>Dia de estocagem</b>	<b>Escore</b>
1	1,83
3	4,33
9	6,83
11	11,00
15	13,33

**Tabela 11** – Média dos escores resultantes da aplicação do protocolo IQ em amostras de sardinha boca-torta (*C. edentulus*) estocada sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

<b>Dia de estocagem</b>	<b>Escore</b>
1	2,00
7	5,14
10	10,14
14	14,00
17	16,29

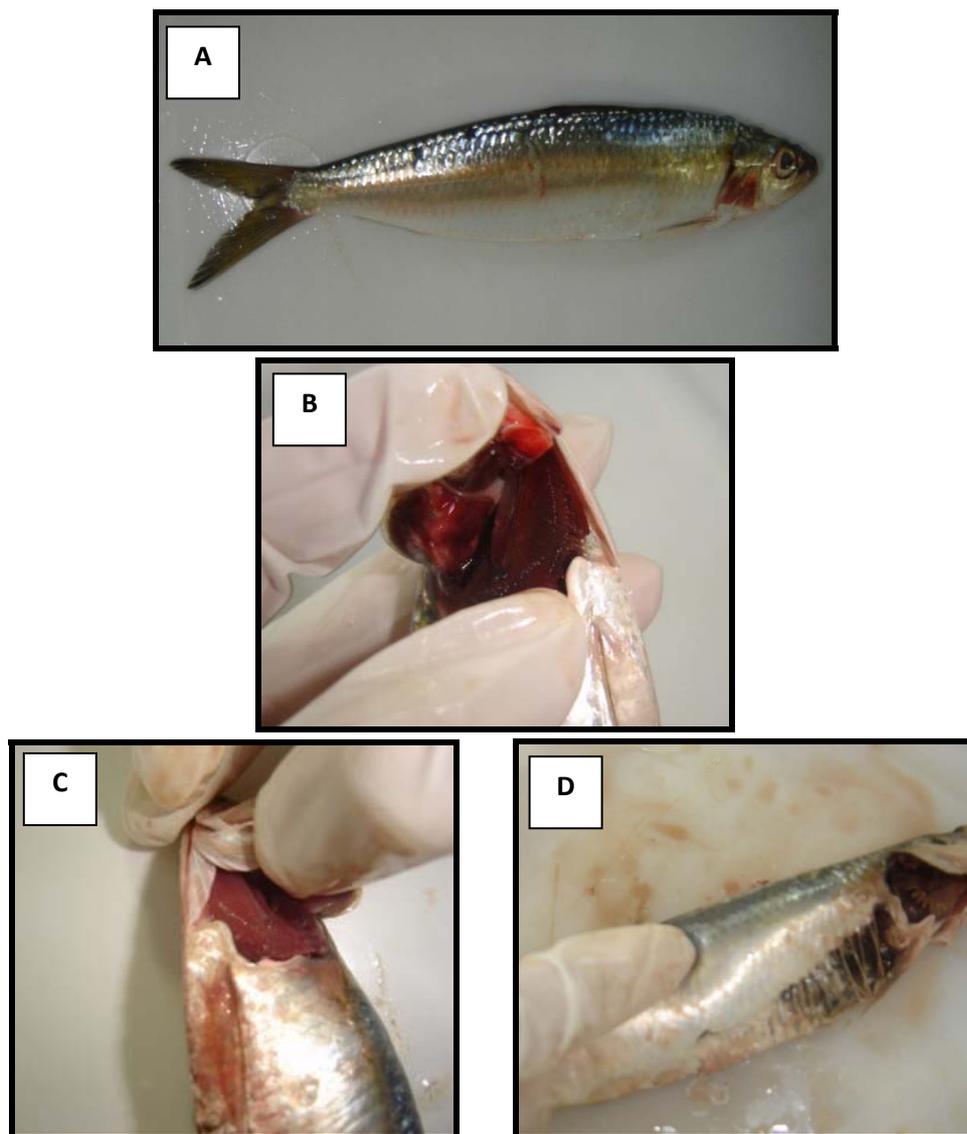
Nas figuras 17 A e B estão representadas graficamente as médias dos escores obtidos na avaliação das amostras pelos julgadores de acordo com o período de estocagem nas quais foi observado que o IQ aumentou de forma linear de acordo com o tempo de estocagem, e que entre os dias 9 e 11 de estocagem das sardinhas verdadeiras e os dias 7 e 10 de estocagem das amostras de sardinha boca torta houve um aumento mais acentuado do escore IQ.



**Figuras 17 A e B** – Representação gráfica das médias dos escores conferidos pelos julgadores na avaliação das amostras de sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) (A) e sardinha boca torta (*C. edentulus*) (B) estocadas sob refrigeração ( $0\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

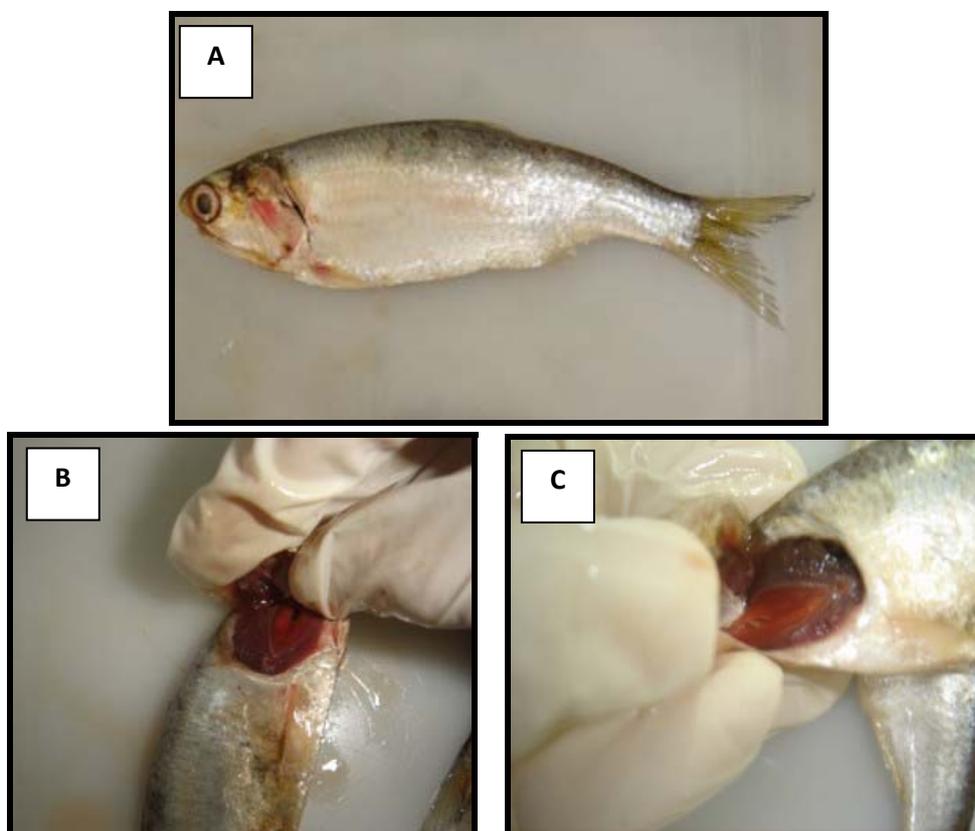
No início da estocagem, as amostras de sardinha verdadeira apresentavam a pele com brilho metálico sendo observada a diferenciação de três cores, a carne firme, os olhos transparentes, a pupila preta e bem definida, as brânquias com coloração vermelho vinho e cheiro de alga e o abdômen íntegro. A perda do brilho e definição das cores pôde ser observada a partir do 9º dia de estocagem, assim como a perda da coloração da brânquia que passou a vermelho claro. A partir do 11º dia a

carne apresentou-se amolecida, o ventre encontrava-se rompido e a brânquia pálida e odor de maresia, sendo que, neste tempo, os julgadores já demonstravam rejeição. No último dia de estocagem, de uma forma geral, as características mais perceptíveis foram carne amolecida, opacidade de córnea, odor pútrido nas brânquias e ventre rompido (Figuras 18 A, B, C e D). Para esta espécie o IQ proposto como limite de consumo aceitável foi inferior a 11.



**Figuras 18 A, B, C e D** – Sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) apresentando pele com brilho metálico e diferenciação de três cores (A) e brânquias com coloração vermelho vinho (B) no 1º dia de estocagem; brânquia com coloração vermelho claro no 9º dia de estocagem (C); perda do brilho metálico e diferenciação de cores, carne amolecida e ventre rompido no último dia de estocagem (D).

Para as amostras de sardinha boca-torta no início do período de estocagem, as características mais evidenciadas foram pele com brilho metálico e diferenciação de duas cores, carne firme, olhos transparentes, pupila preta, bem definida e convexa, brânquias com coloração vermelho vivo e odor a algas e ferroso e abdômen íntegro. No 10º dia de estocagem a amostra foi rejeitada pelos julgadores e apresentava perda do brilho metálico, as escamas soltas, a carne amolecida, a pupila enevoada, a brânquia pálida e com odor ferroso intenso e o ventre rompido (Figura 19 A, B e C). De acordo com as alterações observadas o IQ proposto como limite de aceitabilidade foi menor que 14.



**Figuras 19 A, B e C** – Sardinha boca-torta (*C. edentulus*) apresentando pele com brilho metálico e diferenciação de duas cores (A) e brânquias com coloração vermelho vivo (B) no 1º dia de estocagem; brânquia com coloração pálida no 10º dia de estocagem (C).

A tabela 12 apresenta os modelos de equação linear que melhor se ajustaram a avaliação sensorial das amostras a partir do protocolo MIQ em função do tempo de estocagem que influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) as mudanças nas características sensoriais das amostras.

**Tabela 12** – Modelos de regressão da análise sensorial da sardinha verdadeira (*S. brasiliensis*) e sardinha boca-torta (*C. edentulus*) (Y) em função do tempo de armazenamento em gelo (x) e seus respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) e níveis de probabilidade (p)

<b>Análise sensorial</b>	<b>Modelo de regressão</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p &gt; F</b>
<b>Sardinha verdadeira (<i>S. brasiliensis</i>)</b>	Y = - 1,44 + 2,97.x	0,99	0,0004
<b>Sardinha boca-torta (<i>C. edentulus</i>)</b>	Y = - 1,44 + 3,86.x	0,98	0,0009

Os dados obtidos nesse estudo corroboram com os observados por outros estudiosos como Vaz-Pires et al. (2008) que ao avaliarem duas espécies de lula (*Sepia officinalis* e *Illex coindetii*) estocadas em gelo observaram que a rejeição da primeira ocorreu no 10º dia de estocagem e da segunda no 9º dia, principalmente devido à presença de odores desagradáveis; Sykes et al. (2009) que observaram uma validade comercial de 8 dias para lula da espécie *Sepia officinalis* estocado em gelo; e Bonilla, Sveinsdottir e Martinsdottir (2007) que desenvolveram um protocolo IQ para avaliar a qualidade do bacalhau fresco (*Gadus morhua*) armazenado em gelo (0-1°C) por um período de 14 dias com oito parâmetros a serem analisados e uma pontuação máxima de 18. Através da aplicação deste protocolo esses autores estimaram um tempo máximo de armazenamento para esta espécie de 8 dias em gelo. Porém esses dados discordam dos obtidos por Erkan e Özden (2008) que estabeleceram o limite de aceitabilidade para sardinhas inteiras e evisceradas estocadas a 4°C no 7º dia de estocagem, possivelmente devido a temperatura de estocagem ter sido mais elevada contribuindo desta forma, na aceleração das alterações sensoriais da matéria-prima. Esses autores relataram ainda que no 1º dia de estocagem os peixes encontravam-se firmes e brilhantes e no 4º dia o peixe foi classificado como pálido e a carne amolecida, com escores médios de 2,36, 5,53, 13,26, 20,10 e 22,53 para os dias 1, 3, 5, 7 e 9 de estocagem.

Os parâmetros que apresentaram maiores variações apontados pelos julgadores na presente pesquisa concordam com aqueles descritos por Musgrove et al. (2007) que objetivando avaliar a qualidade da sardinha (*Sardinops sagax*) no período pós-captura utilizando o MIQ, observaram que alterações significativas na aparência geral, firmeza da carne, transparência dos olhos e cor das brânquias.

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo pôde-se concluir que:

- O teor de TMA foi o fator de melhor aplicabilidade para avaliação do grau de frescor do pescado em comparação ao teor de BVT que ultrapassou o limite preconizado pela legislação apenas quando o pescado tinha sido rejeitado sensorialmente.
- O conteúdo de hipoxantina aumentou de forma significativa no decorrer do período de estocagem nas espécies estudadas, apresentando, portanto uma boa correlação com a qualidade do pescado.
- Apesar de nesta pesquisa ainda não ter sido possível estabelecer valores de hipoxantina que possam ser utilizados com precisão na avaliação do grau de frescor de pescado, correlacionando os resultados da análise sensorial com o teor deste composto, valores ao redor de  $1,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$  para as espécies de sardinha verdadeira e valores ao redor de  $1,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$  para as espécies de sardinha boca-torta poderiam ser utilizados como alerta indicativo de deterioração.
- A manutenção do pescado em temperaturas baixas ( $0 \pm 2^\circ\text{C}$ ) retardou a produção de aminas biogênicas.
- A CBHAM indicou boa qualidade da matéria-prima e adequada manutenção da cadeia do frio no armazenamento das amostras.
- A CBHAP, apesar de ter apresentado correlação com o teor de TMA nas amostras de sardinha verdadeira, não teve boa correlação com os resultados

sensoriais, não apresentando, desta forma, boa aplicabilidade para avaliação do grau de frescor do pescado, tomando-se como referência a legislação internacional que estabelece um limite máximo de 7 log UFC.g<sup>-1</sup>.

- Os resultados da enumeração de *Enterococcus* spp. e da contagem de *Enterobacteriaceae* tiveram boa correlação com a qualidade do pescado, devido o aumento dos valores ter ocorrido de acordo com o período de estocagem.
- O MIQ pode ser utilizado para avaliação do grau de frescor das espécies estudadas, pois teve boa correlação com os resultados físico-químicos e bacteriológicos.
- Sensorialmente os parâmetros que apresentaram maiores variações no decorrer do tempo de armazenamento, foram odor das brânquias e aspecto da pele e abdômen, nas duas espécies estudadas.
- Foi estabelecida a validade comercial de dez dias para as sardinhas verdadeiras e de nove dias para as sardinhas boca-torta.

Considerando os resultados obtidos, sugere-se:

- A realização de estudos que estabeleçam novos parâmetros para BVT que possam ser utilizados com segurança na avaliação do grau de frescor do pescado.
- Uma avaliação mais ampla do comportamento evolutivo do conteúdo de hipoxantina em cada etapa *post mortem*, até perda da validade comercial das espécies de pescado, que contribuía na obtenção de dados para futuras inclusões desse parâmetro no Regulamento Técnico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABABOUC, L. H.; SOUIBRI, L.; RHALIBY, K.; OUAHDI, O.; BATTAL, M.; BUSTA, F. F. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiology*, v. 13, p. 123-132, 1996.

ABREU, R. L. *Correlação entre tempo, temperatura e pH com a concentração de hipoxantina e hidroxiprolina em carne resfriada de javali (Sus scrofa scrofa)*. Niterói, 2008. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2008.

ANDRADE, P. F. *Avaliação do prazo de vida comercial do atum (Thunnus atlanticus) armazenado sob refrigeração*. Niterói, 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2006.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 17. ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 2002.

AUBOURG, S. P.; SOTELO, C. G.; GALLARDO, J. M. Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 2, p. 295-298, 1997.

AUBOURG, S. P.; SOTELO, C. G.; PÉREZ-MARTÍN, R. Assessment of quality changes in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) by fluorescence detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 5, p. 575-580, 1998.

AYRES, M. *BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. 5.ed. Pará, 2007. 364 p.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 341-346, 1995.

BATISTA, G. M.; LESSI, E.; KODAIRA, M.; FALCÃO, P. T. Alterações bioquímicas *post-mortem* de maxitrã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) procedente da piscicultura, mantido em gelo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 24, n. 4, 2004.

BONILLA, A. C.; SVEINSDOTTIR, K. MARTINSDOTTIR, E. Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control*, v.18, p. 352-358, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para o controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. II – Métodos físicos e químicos. LANARA, Brasília, DF, 1981, 123 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185 de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1997.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos Para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 02 de janeiro de 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2003.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos nº 1255 de 25 de julho de 1962, nº 1.236 de 02 de setembro de 1994, nº 1812 de 08 de fevereiro de 1996, nº 2.224 de 04 de junho de 1997 e nº 6.385 de 27 de fevereiro de 2008. Aprova o novo Regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - R.I.I.S.P.O.A. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2008.

BRINK, B.; DAMINIK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 73-84, 1990.

BRUSCHI, F. L. F. *Rendimento, composição química e perfil de ácidos graxos de pescados e seus resíduos: uma comparação*. Itajaí, 2001. 65 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em oceanografia) – Curso de oceanografia – Centro de ciências tecnológicas, da terra e do mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2001.

COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento (CE) nº2073 da Comissão, de 15 de novembro de 2005. Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, 22 de dezembro de 2005.

COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento (CE) nº2406 do Conselho, de 26 de novembro de 1996. Relativo à fixação de normas comuns de comercialização para certos produtos da pesca. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 334, 23 de dezembro de 1996.

CONTRERAS – GUZMÁN, E. S. *Bioquímica de pescado e derivados*. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409 p.

ERKAN, N.; ÖZDEN, Ö. Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, p.1549-1559, 2008.

FAO. *El Estado Mundial de La Pesca e La Acuicultura 2008*. Roma: FAO, 2009.

FAO. *World fisheries production, by capture and aquaculture, by country (2007)*. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-0a.pdf>. Acesso em: 11 de setembro de 2009.

FDA. Scombrototoxin (Histamine) Formation (A Chemical Hazard). In: \_\_\_\_\_. *Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance*. 3.ed. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/ucm091910.htm>. Acesso em: 02 de janeiro de 2010.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II. Teleostei (1)*. São Paulo: Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo, 1978. 110 p.

FISHBASE. *Cetengraulis edentulus* (Cuvier, 1829). Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=547>>. Acesso em: 22 de setembro de 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de alimentos*, São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, p. 105-122, 2003.

GAY, D.; SERGIPENSE, S.; ROCHA, C. F. D. Ocorrência e distribuição de *Cetengraulis edentulus* (Cuvier) (Teleostei, *Engraulidae*) na Laguna de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, n. 17, v. 2, p. 463-472, 2000.

GIANNINI, D. H. Determinación de nitrógeno básico volátil (NBV) en pescado: Consideraciones generales. *Alimentaria*, Madrid, v. 40, n. 343, p. 49-54, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococci from food. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, p. 163-171, 2002.

GRAM, L.; DALGAARD, P. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 262-266, 2002.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p. 121-137, 1996.

GUTIERREZ, L. E.; SILVA, R. C. M. Fatty acid composition of commercially important fish from Brazil. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 50, n. 3, p. 478-483, 1993.

HALÁSZ, A.; BARATH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.

HUSS, H. H. *Garantia da Qualidade dos produtos da pesca*. Roma: FAO, 1997. 176 p.

HUSS, H. H. *El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad*. Dinamarca: FAO, 1999.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. *Relatório de Reunião sobre a pesca de sardinha-verdadeira nas regiões sudeste e sul*. Itajaí, 2004. 34 p.

\_\_\_\_\_. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. *Estatística da pesca 2007 Brasil: grandes regiões e unidades da federação*. Brasília, 2007. 113 p.

\_\_\_\_\_. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa nº15 de 21 de maio de 2009. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 de maio de 2009.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD. *Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. University of Toronto Press, Toronto. 1974.

JABLONSKI, S.; DU MONT, A. S.; OLIVEIRA, J. S. *O mercado de pescado no Rio de Janeiro*. Infopesca, 1997. 80 p.

JAY, M. J. *Microbiologia de alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JØRGENSEN, L. V.; HUSS, H. H.; DALGAARD, P. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 920-934, 2000.

KILINC, B.; CAKLI, S.; Chemical, microbiological and sensory changes in thawed frozen fillets of sardine (*Sardina pilchardus*) during marination. *Food Chemistry*, v. 88, p. 275-280, 2004.

- KIM, S. H.; PRICE, R. J.; MORRISSEY, M. T.; FIELD, K. G.; WEI, C. I.; AN, H. Occurrence of histamine-forming bacteria in albacore and histamine accumulation in muscle at ambient temperature. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 4, p. 1515-1521, 2002.
- KODAIRA, M.; TOMÉ, E.; PÉREZ, M. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los cambios *post-mortem* y frescura en híbridos de Cachama (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) cultivados. *Anales Venezolanos de Nutrición*, Caracas, v. 14, n. 2, 2001.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676 p. Cap. 8, p. 69-82.
- LAKSHAMANAN, P. T.; ANTONY, P. D.; GOPAKUMAR, K. Nucleotide degradation and quality changes in mullet (*Liza corsula*) and pearlspot (*Etroplus suratensis*) in ice and at ambient temperatures. *Food Control*, v. 7, n. 6, p. 277-283, 1996.
- LAKSHAMANAN, R.; SHAKILA, R. J.; JEYASEKARAN, G. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*, v. 19, p. 617-625, 2002.
- LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. New solvent system for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, v. 1045, p. 223-232, 2004.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, v. 58, p. 1-37, 2000.
- LIMA, D. M.; COLUGNATI, F. A. B.; PADOVANI, R. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SALAY, E.; GALEAZZI, M. A. M. *Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO)*. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Versão II, 2 ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.
- LÓPEZ-SABATER, E. I.; RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MORA-VENTURA, M. T. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *International Journal of Food Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 411-418, 1996.
- LUDORFF W.; MEYER, V. *El pescado y los productos de la pesca*. 2. ed. Zaragoza: Editora Acribia, 1978. 342 p.
- MARRAKCHI, A.E.; BENNOUR, M.; BOUCHRITI, N.; HAMAMA, A.; TAGAFAIT, H. Sensory, chemical and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 53, n. 7, p. 600-605, 1990.

MERCK, 2000, modificado por FRANCO, R. M.; LEITE, A. M. O. Enumeração e identificação de *Enterococcus* spp. e cepas de *Escherichia coli* patogênico em coxas de frango e estudo da atividade antimicrobiana das cepas isoladas. In: XV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2005, Niterói. *Anais...* Niterói, 2005. CD-ROM.

MERCK. *Microbiology Manual*. Germany, 2000. 407p.

MUSGROVE, R.; CARRAGHER, J.; MATHEUS, C.; SLATTERY, S. Value-adding Australian sardine: factors affecting rates of deterioration in sardine (*Sardinops sagax*) quality during post-harvest handling. *Food Control*, v.18, p.1372-1382, 2007.

NDAW, A. D.; FAID, M.; BOUSETA, A.; ZINEDINE, A. Effect of controlled lactic acid bacteria fermentation on the microbiological and chemical quality of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 10, n. 1, p. 21-27, 2008.

NIVEN JUNIOR, C. F.; JEFFREY, M. B.; CORLETT JUNIOR, D. A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-production bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 321-322, 1981.

NUNES, M. L.; BATISTA, I. Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. *Instituto das Pescas da Investigação e do Mar (IPIMAR) Divulgação*, n. 29, 2004. Disponível em: < [http://ipimar-  
iniap.ipimar.pt/servicos/biblioteca/edicoes/ipimar-divulgacao/Folheto29.pdf](http://ipimar-iniap.ipimar.pt/servicos/biblioteca/edicoes/ipimar-divulgacao/Folheto29.pdf) >. Acesso em: 02 de novembro de 2008.

OCAÑO-HIGUERA, V. M.; MARQUEZ-RÍOS, E.; CANIZALES-DÁVILA, M.; CASTILLO-YÁÑEZ, F. J.; PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; GARCÍA-OROZCO, K. D.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chemistry*, v. 116, p. 933-938, 2009.

OETTERER, M.; PERUJO, S. D.; GALLO, C. R.; ARRUDA, L. F.; BORGHESI, R.; CRUZ, A. M. P. Monitoring the sardine (*Sardinella brasiliensis*) fermentation process to obtain anchovies. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 511-517, 2003.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. *Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430 p.

OLIVEIRA, C. P.; GLÓRIA, M. B. A.; BARBOUR, J. F.; SCANLAN, R. A. Nitrate, nitrite and volatile nitrosamines in whey-containing food products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 967-969, 1995.

OLIVEIRA, H. A. C.; SILVA, H. C. M.; SAMPAIO, A. H.; VIANA, F. A.; SAKER-SAMPAIO, S. Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados. *Revista Ciência Agronômica*, v. 35, n. especial, p. 179-188, 2004.

OLIVEIRA, V. M. *Estudo da qualidade do camarão branco do pacífico (Litopenaeus vannamei), inteiro e descaneçado, estocado em gelo*. Niterói, 2005. 91 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chemistry*, v. 103, p. 1475-1486, 2007.

ÖZOĞUL, Y.; ÖZOĞUL, F. Degradation products of adenine nucleotide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice and in modified atmosphere packaging. *Turkish Journal of Zoology*, v. 26, p. 127-130, 2002.

ÖZOGUL, F.; POLAT, A.; ÖZOGUL, Y. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, v. 85, p. 49-57, 2004.

ÖZOĞUL, F.; ÖZOĞUL, Y., KULEY, E. Nucleotide degradation in sardine (*Sardina pilchardus*) stored in different storage condition at 4°C. *Journal of Fisheries Sciences*. v. 1, n. 1, p. 13-19, 2007.

ÖZYURT, G.; ÖZYURT, Y.; ÖZYURT, C. E.; POLAT, A.; ÖZOGUL, F.; GÖKBULUT, C.; ERSOY, B.; KÜLEY, E. Determination of the quality parameters of pike perch *Sander lucioperca* caught by gillnet, longline and harpoon in Turkey. *Fisheries Science*, v. 73, p. 412-420, 2007.

PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; VILLEGAS-OZUNA, R. E. Histamine quantification in Monterey sardine muscle and canned products from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 11, p. 188-195, 1998.

PAES, E. T.; SOPPA, M. A.; SOUZA, R. B. Covariações entre os desembarques da sardinha-verdadeira – *Sardinella janeiro* (Eigenmann, 1984) em seus extremos de ocorrência na plataforma sudeste brasileira e anomalias de temperatura da superfície do mar estimados por satélite. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 13., 2007, Florianópolis/Brasil, INPE, p. 4651-4658.

PAIVA, M. P.; MOTTA, P. C. S. Cardumes da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner), em água costeiras do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 17, n. 2, p. 339-346, 2000.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 524p.

PEREIRA, A. A. F.; TENUTA-FILHO, A. Avaliação de condições de consumo da sardinha (*Sardinella brasiliensis*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 4, p. 720-725, 2005.

POMBO, C. R.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; GUIMARÃES, C. F. M.; CRUZ, A. M. P.; PARDI, H. S. Salted and fermented fish processes evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p.2100-2105, 2009.

PONS-SÁNCHEZ-CASCADO, S.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-preserved anchovies. *European Food Research and Technology*, v. 220, p. 312-315, 2005.

SALLAM, K. I. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry*, v. 101, p. 592-600, 2007.

SANCHES-CASCADO, S. P. *Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (Engraulis encrasicolus) y sus derivados*. Barcelona, 2005. 287 f. Tese (Programa de Doctorado Nutrición, Tecnología e Higiene de los Alimentos) – Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona, 2005.

SANTO, M. L. P. E. *Efeito da bacteriogenicidade do Lactobacillus sakei 2 a na qualidade microbiológica da sardinha-verdadeira (Sardinella brasiliensis) fermentada*. Florianópolis, 2003. 204 f. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciência dos alimentos) – Universidade de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

SANTO, M. L. P. E.; BEIRÃO, L. H.; SANT'ANNA, E.; DAMIAN, C.; FRANCO, B. M. Avaliação da atividade bacteriogênica do *Lactobacillus sakei* na fermentação da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) utilizando glicose como carboidrato fermentecível. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 83-98, 2003.

SANTOS, C. A. M. L. A qualidade do pescado e a segurança dos alimentos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DO PESCADO, 2., 2006, São Vicente/São Paulo. São Vicente/São Paulo. *Anais eletrônicos...* São Paulo, 2006. Disponível em: < [ftp://ftp.sp.gov.br/ftppeca/qualidade\\_pescado.pdf](ftp://ftp.sp.gov.br/ftppeca/qualidade_pescado.pdf) >. Acesso em 02 de novembro de 2008.

SCHUTZ, D. E.; CHANG, G. W.; BJELDANES, L. F. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. *Chemical indexes*. Department of Nutrition Science; University of California Berkeley, 1976.

SHAKILA, R. J.; VIJAYALAKSHMI, K.; JEYASEKARAN, G. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish the Thoothukkudi coast of Tâmil Nadu, Índia stored at ambient temperature. *Food Chemistry*, v. 82, p. 347-352, 2003.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SILLAS SANTOS, M. H. Biogenics amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 29, p. 213-231, 1996.

- SILVA, M. A.; ARAÚJO, F. G.; AZEVEDO, M. C. C.; MENDONÇA, P. Distribuição espacial e temporal de *Cetengraulis edentulus* (Cuvier) (*Actinopterygii*, *Engraulidae*) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 20, n. 4, 2003.
- SILVEIRA, N. F. A.; LEITÃO, M. F. F.; BALDINI, V. L. S.; TEIXEIRA FILHO, A. R. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 4, p. 19-25, 2001.
- SOARES, V. F. M.; VALE, S. R.; JUNQUEIRA, R. G.; GLÓRIA, M. B. A. Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 4, 1998.
- SYKES, A. V.; OLIVEIRA, A. R.; DOMINGUES, P. M.; CARDOSO, C. M.; ANDRADE, J. P.; NUNES, M. L. Assessment of European cuttlefish (*Sepia officinalis*, L.) nutritional value and freshness under ice storage using a developed Quality Index Method (QIM) and biochemical methods. *Food Science and Technology*, v. 42, p. 424-432, 2009.
- STILES, M. Safety aspects of enterococci from the food point of view. In: ENTEROCOCCI IN FOODS – FUNCTIONAL AND SAFETY ASPECTS, 2002, Berlin – Germany. *Anais...* Berlim, 2002. 84 p. seção 4, p. 29.
- SURTI, T.; TAYLOR, K. D. A.; MA'RUF, W. F. The effect of storage at tropical ambient temperature on the quality and shelf life of grouper (*Plectropomus maculatus*). *International Journal of Food Science and Technology*, v. 36, p. 517-522, 2001.
- SVEINSDOTTIR, K.; HYLDIG, G.; MARTINSDOTTIR, E.; JORGENSEN, B.; KRISTBERGSSON, K. Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Food Quality and Preference*, v. 14, p. 237-245, 2003.
- TEIXEIRA, M. S. *Estudo das características sensoriais da corvina (micropogonias furnieri) eviscerada e estocada em gelo*. Niterói, 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.
- TEODORO, A. J.; ANDRADE, É. C. B.; MANO, S. B. Avaliação da utilização de embalagem modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 158-161, 2007.
- THATCHER, F. S.; CLARK, D. S. *Análisis microbiológico de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 1973. 271p.
- TIMM, M.; JORGENSEN, B. M. Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food Chemistry*, Denmark, v. 76, n. 4, p. 509-518, 2002.

TOMÉ, E.; IGLESIAS, M.; KODAIRA, M.; VALLS, J. Efecto del tiempo de retardo en la refrigeración sobre la frescura de la tilapia (*Oreochromis* spp.) cultivada. *Anales Venezolanos de Nutrición*, Caracas, v. 14, n. 1, 2001.

TRIQUI, R.; BOUCHRITI, N. Freshness assessments of Moroccan sardine (*Sardina pilchardus*): comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7540-7546, 2003.

VAL, A. L.; MAZUR, C. F.; SALVO-SOUZA, R. H.; IWAMA, G. K. Effects of experimental anaemia on intra-erythrocytic phosphate levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, v. 45, p. 269-277, 1994.

VAZ-PIRES, P.; SEIXAS, P.; MOTA, M.; LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J.; LINDO, A.; SILVA, T. Sensory, microbiological, physical and chemical properties of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex coindetii*) stored in ice. *Food Science and Technology*, v. 41, p. 1655-1664, 2008.

VÁZQUEZ-ORTIZ, F. A.; PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SANCHEZ, M. E.; VILLEGAS-OZUNA, R. E. Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 10, p. 158-165, 1997.

VECIANA-NOGUÉS, M. C.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP- related compounds volatile amines and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 2036-2041, 1997.

VENUGOPOL, V. Biosensors in fish production and quality control. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 17, p. 147-157, 2002.

VISENTAINER, J. V.; CARVALHO, P. O.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 20, n. 1, p. 90-93, 2000.

VIVATERRA. Peixes de água salgada. Disponível em: < [http://www.vivaterra.org.br/peixes\\_salgada\\_6.htm#sardinhabocatorta](http://www.vivaterra.org.br/peixes_salgada_6.htm#sardinhabocatorta) >. Acessado em: 22 de setembro de 2009.