

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO E QUALIDADE
DE SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADA NACIONAL**

CECÍLIA RISCADO POMBO

NITERÓ/RJ

2012

CECÍLIA RISCADO POMBO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO E QUALIDADE
DE SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADA NACIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção de Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Sub-Área de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Pescado e Derivados.

Orientador: Prof^a. Dra. Eliane Teixeira Mársico

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Maia Franco

Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

NITERÓI/RJ

2012

P784 Pombo, Cecília Riscado
Avaliação do processamento tecnológico e
qualidade de sardinha (*Sardinella brasiliensis*)
anchovada nacional/ Cecília Riscado Pombo;
orientador Eliane Teixeira Mársico. – 2012.
129f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e
Processamento Tecnológico de Produtos de Origem
Animal)– Universidade Federal Fluminense, 2012.

Orientador: Eliane Teixeira Mársico

1. Processamento de pescado. 2. Sardinha (Peixe)
3. Histamina 4. Qualidade do pescado. 5. Análise
bacteriológica. 6. Clostridium. 7. Aminas Biogênicas

CDD 664.94

CECÍLIA RISCADO POMBO

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

Aprovada em Janeiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Eliane Teixeira Mársico
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
Universidade Federal Fluminense – UFF

Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy
EMBRAPA Agroindústria De Alimentos

Prof. Dr. Thiago da Silveira Alvares
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^a. Dra. Karen Signori Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior
Universidade Federal Fluminense- UFF

NITERÓI/RJ

2012

AGRADECIMENTOS

À minha família por sempre estar me apoiando e incentivando. Sempre presentes nos momentos em que mais precisei.

Ao meu companheiro, amigo, cúmplice e amor, Renato Chagas, por quem tenho grande admiração. Desculpe-me pelos momentos em que fui péssima companheira.

À minha orientadora, Eliane Teixeira Mársico, pelas oportunidades de crescimento e amadurecimento.

Ao meu co-orientador, Robson Maia Franco, pelo apoio constante e palavras de carinho e descontração. Pela preocupação e apoio nos momentos de desabafo.

Ao Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy e a EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, pela atenção e oportunidade.

Ao Sr. Gilberto D'Elia, Dra Ana Maria Paschoal e Rafael Sharmann Monteiro pelo apoio, fundamental, na realização desta pesquisa.

À Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense pelo apoio material e humano.

À CAPES e à PROPP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SIMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO, p. 18

2 OBJETIVO, p. 21

2.1 OBJETIVO GERAL, p.21

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 21

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 23

3.1 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE SARDINHAS ANCHOVADAS, p.23

3.1.1 A maturação das sardinhas, p. 26

3.2 CONTROLE DE QUALIDADE, p. 26

3.2.1 Microrganismos veiculados pelo pescado, p. 28

3.2.1.1 Bactéria halófilas e halotolerantes, p. 28

3.2.1.2. *Enterococcus* spp. e *Tetragenococcus* spp., p. 29

3.2.1.3 *Enterobacteriaceae*, p. 31

3.2.1.4 *Clostridium* spp., p. 31

3.2.2 Conceito dos obstáculos de Leistner, p. 32

3.3 AMINAS BIOGÊNICAS, p. 33

3.3.1 Fatores físico-químicos e bacteriológicos para formação de aminas biogênicas, p. 35

3.3.2 Procedimentos analíticos para determinação de aminas biogênicas, p. 37

3.4 PADRÕES DE QUALIDADE, p. 39

4. MATERIAL E MÉTODOS, p. 41

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 41

4.1.1 Enumeração de *Enterococcus* spp., p. 42

4.1.2 Presença de *Tetragenococcus* spp., p. 43

4.1.3 Contagem de bactérias halofílicas, p. 44

4.1.4 Presença de *Clostridium* spp., p. 44

4.1.5 Contagem de Enterobactérias, p. 45

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 45

4.2.1 Avaliação da formação de aminas biogênicas, p. 46

4.2.1.1 Método da Cromatografia em Camada Delgada, p. 46

4.2.1.2 Método Fluorimétrico, p. 47

4.2.1.3 Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, p. 48

4.2.2 Análise de produção de Bases Voláteis Totais, p. 50

4.2.3 Análise do Percentual de Cloretos, p. 51

4.2.4 Avaliação do pH, p.52

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, p. 5 2

4.3.1 Tratamento estatístico dos dados, p. 52

5 DESENVOLVIMENTO, p. 53

5.1 ARTIGO 1: "EVALUATION OF HISTAMINE FORMATION IN SARDINES MATURATED IN SATURATED BRINE", p. 53

5.2. ARTIGO 2: CLOSTRIDIOS SULFITO REDUTORES EM SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADA", p. 63

5.3. ARTIGO 3: CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE SARDINHAS (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADAS., p. 77

5.4. ARTIGO 4: DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM SARDINHAS ANCHOVADAS UTILIZANDO CLAE E DERIVATIZAÇÃO COM 6-AMINOQUINOLILN-HIDROXISUCCINIMIDIL CARBAMATO (AQC), p. 97

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES, p. 112

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 114

8. APENDICES, p. 122

8.1 SUBMISSÃO A REVISTA FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS, p. 123

8.2 SUBMISSÃO A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. p. 124

8.3 ACEITE PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA, p. 125

9 ANEXOS, p. 126

9.1 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO A, p.127

9.2 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO B, p. 128

9.3 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO C, p. 129

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1 (A, B e C)** - Salão com temperatura controlada onde é realizada a maturação do produto (A). Destaque para os sensores de aferição da temperatura (B e C), p. 24
- Figura 2** - Barricas com capacidade de 130 a 270 Kg contendo as sardinhas em maturação., p. 25
- Figura 3** – Prensa manual utilizada para a retirada do excesso de salmoura do produto após o período de maturação, p. 25
- Figura 4** – Reação de descarboxilação de histidina formando histamina e liberando gás carbônico, p. 34
- Figura 5** – Tubos do tipo “ependorf” contendo o meio de Chromocult® com viragem da cor do meio indicando crescimento positivo para *Enterococcus* spp.,p. 43
- Figura 6** – Placas contendo o meio de MRS, semeadas e incubadas em estufa a 35 °C por 7 dias, p. 43
- Figura 7** - Placas contendo o meio de TSA 3% NaCl, semeadas e incubadas em estufa a 35 °C por 7 dias, p. 44
- Figura 8** - Jarra Gaspac contendo as placas semeadas, e material utilizado para a passivação do cobre, p. 45
- Figura 9** – À esquerda, observa-se a placa de sílica aplicada com as amostras e padrões no momento da corrida cromatográfica. À direita, observa-se a placa revelada pela solução de ninhidrina 3%, p. 47
- Figura 10** – Esquema prático para visualização da etapa de extração de aminas biogênicas de amostras de sardinha anchovas, p. 49
- Figura 11** – Esquema prático para visualização da etapa de derivatização de aminas biogênicas de amostras de sardinha anchovas, p. 49

Figura 12 – Equipamento utilizado para as análises de amins biogênicas em sardinhas anchovadas - cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695, p.50.

Figura 13 – Carbonização de amostra em cadinho de porcelana, p. 51

ARTIGO 1: EVALUATION OF HISTAMINE PRODUCTION IN SARDINES MATURATED IN SATURATED BRINE.

Table 1 Average Levels of histamine (mg.Kg^{-1}) by Spectrofluorimetry of different technological processes (A, B and C) at the beginning and end of the commercial validity period (one year) of brined sardines., p. 62

Table 2 Comparison between the average histamine content (mg.Kg^{-1}) by Spectrofluorimetry and HPLC in the different technological processes (A, B and C) at the end of the commercial validity period (one year) of brined sardines., p. 63

ARTIGO 2: CLOSTRIDIOS SULFITO REDUTORES EM SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADA.

Tabela 1 Resultados das análises físico-químicas e bacteriológica realizadas em amostras de sardinha (*S. brasiliensis*) fresca e em fase de pré-salga durante 10 dias., p.74

Tabela 2 Resultados das análises físico-químicas e bacteriológica realizadas em amostras de sardinha (*S. brasiliensis*) em fase de maturação, p.74

Tabela 3 Resultados das análises físico-químicas e bacteriológica realizadas em amostras de sardinha (*S. brasiliensis*) anchovada durante os sete (7) primeiros meses de validade comercial., p. 75

Gráfico 1 Comportamento do pH durante o processamento tecnológico de sardinhas (*S.brasiliensis*) anchovadas., p. 75

Gráfico 2 Comportamento do pH durante a validade comercial de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas., p. 76

Gráfico 3 Comportamento do percentual de cloretos durante o processamento

tecnológico de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas., p. 76

ARTIGO 3: CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE SARDINHAS (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADAS.

Figura 1 Comportamento da concentração de Bases Voláteis Totais (BVT), em N-BVT/100g da amostra, de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante processamento tecnológico e parte da validade comercial do produto pronto., p. 94

Figura 2 Regressão linear do percentual de cloretos de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante processamento tecnológico., p. 94

Figura 3 Representação gráfica do percentual de cloretos durante as fases de produção e validade comercial de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas., p. 95

Figura 4 Teor e Histamina, em mg.Kg⁻¹, durante processamento tecnológico e parte da validade comercial de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas., p. 95

Figura 5 Comportamento do pH de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante processamento tecnológico., p. 96

Figura 6 Comportamento do pH de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante parte do processamento tecnológico e validade comercial do produto pronto., p. 96

ARTIGO 4: DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM SARDINHAS ANCHOVADAS UTILIZANDO CLAE E DERIVATIZAÇÃO COM 6-AMINOQUINOLILN-HIDROXISUCCINIMIDIL CARBAMATO (AQC).

Tabela 1 Protocolo de gradiente utilizado para separação de aminas biogênicas através de injeções de 1 µL com fluxo de 0,4 mL.min⁻¹., p. 104

Figura 1 Cromatograma da mistura de soluções padrão de Putrescina, Histamina e Cadaverina., p.

Figura 2 Cromatograma de análise de sardinha fresca mantida em condições inadequadas de armazenamento (controle positivo). , p.

Figura 3 Gráfico contendo a curva padrão da quantificação de histamina., p.

Figura 4 Gráfico contendo a curva da quantificação de histamina das amostras de sardinha anchovada ao longo do processamento Tecnológico e início da validade comercial do produto pronto., p.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
%	porcento
Aa	Atividade de água
AB	Aminas Biogênicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
β	Beta
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BVT	Bases Voláteis Totais
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	Comunidade Européia
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAO	Diamino Oxidase
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	“Food and Drug Administration”
g	grama
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
Kg	quilograma
LANARA	Laboratório Nacional de Referência Animal

LTDA	Limitada
MAO	Mono Amino Oxidase
mg	miligrama
N-HMT	Histamina N-Metiltransferase
PCC	Ponto Crítico de Controle
pH	potencial Hidrogeniônico
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
ppm	parte por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SP	São Paulo
spp.	espécies
T	Tonelada
µg	micrograma
µL	microlitro

RESUMO

A anchovagem do pescado consiste em um processo de maturação na qual enzimas tissulares e microbianas agem sobre os hidratos de carbono e proteínas. Existe uma dificuldade para a normatização do fluxograma de produção do peixe anchovado pela falta de padrões oficiais que regulamentem o processo e a identidade e qualidade do produto. Assim sendo, objetivou-se neste estudo foi monitorar etapas do processamento tecnológico e validade comercial de sardinhas anchovadas, através de análises bacteriológicas (presença de *Clostridium* spp., enumeração de *Enterococcus* spp., contagem de bactérias halófilas, enumeração de Enterobactérias, presença de *Tetragenococcus* spp.) e físico-químicos (quantificação de aminas biogênicas, Bases Voláteis Totais, pH e percentual de cloretos). Como resultado das análises microbiológicas não foi isolada colônias suspeitas de *Clostridium* spp. e não foi identificada presença de *Tetragenococcus* spp.. Contudo, houve a contagem de bactérias halófilas identificadas como pertencentes ao gênero *Pediococcus*. Na fase de maturação os valores de pH apresentaram-se entre 5,36 e 5,73 e os valores percentuais de cloretos variaram entre 15,55 e 17,52%. Durante a validade comercial o pH variou entre 5,23 e 5,89 e o percentual de cloretos entre 12,68% e 14,10%. A produção de Bases Voláteis Totais (BVT) observou-se um comportamento crescente durante a fase de processamento tecnológico, com 13,9 mg de N-BVT/100g no início do processo, alcançando o valor máximo de 87,32 mg N- BVT/100g ao final do processo. A formação de histamina, em mg.Kg⁻¹, foi crescente durante o período de processamento, mantendo esse comportamento durante a validade comercial chegando a produção

máxima de 34 mg. Kg⁻¹. Considerando os resultados obtidos, no que tange às etapas de processamento conclui-se que a presença das vísceras na fase de pré-salga não foi determinante no crescimento e desenvolvimento de *Clostridium* spp.. O crescimento bacteriano dos principais gêneros relacionados à formação de histamina foi inibido pelo elevado percentual de cloretos e, conseqüentemente, a formação de histamina foi abaixo do limite estabelecido pela legislação européia. Os valores de pH durante o processamento tecnológico e validade comercial inibiram o crescimento dos gêneros bacterianos estudados porém favoreceram o desenvolvimento de *Pediococcus* spp. Em função dos resultados obtidos é imperativo um alerta para consumo deste produto por pessoas com maior sensibilidade a intoxicação histamínica.

Palavras chaves: Sardinha anchovada; Aminas Biogênicas; Histamina; CLAE; *Clostridium* sp.; *Sardinella brasiliensis*.

ABSTRACT

The brining process of sardines (*Sardinella brasiliensis*) consists in the maturation by the action of tissular and bacterial enzymes acting on carbohydrates and proteins in saturated brine. There is a difficulty for the standardization of the product because there is a lack of official standards regulating for the technological processes. Therefore, the objective of this study was to monitor the processing technology and trade period of brined and matured sardines through bacteriological analysis (presence of *Clostridium* spp., enumeration of *Enterococcus* spp., Halophilic bacteria counts, enumeration of Enterobacteria; presence of *Tetragenococcus* spp) and physical-chemical (quantification of biogenic amines, Total Volatile Bases, pH, and percentage of chlorides). During the experiment, no *Clostridium* spp. suspected colonies were isolated and there was no identification of the presence of *Tetragenococcus* spp. However, the halophilic bacterial count was identified as genus *Pediococcus*. At the maturation phase pH values were between 5.36 and 5.73 and the percentage values of chloride ranged between 15.55 and 17.52%. During the commercial validity pH varied between 5.23 and 5.89 and the percentage of chlorides between 12.68% and 14.10%. The production of total volatile bases (TVB) has shown an increasing trend during the technological process, with 13.9 mg N-BVT/100g early in the process, reaching a maximum value of 87.32 mg N-BVT/100g. The formation of histamine in mg.Kg-1 was increased during the processing, keeping this behavior during the trade period, and coming to the maximum of 34 mg. Kg-1. Therefore, it was concluded that the presence of viscera in the pre-salting was not

decisive in the growth and development of *Clostridium* spp.. The main type of bacterial growth related to the formation of histamine was inhibited by the high percentage of chlorides and, consequently, the formation of histamine was low. The pH during processing technology and trade period inhibited the growth of all bacterial genera studied but favored the development of *Pediococcus* spp. On regard of the results obtained, it is important to alert consumers for the risks of histamine poisoning, especially for people with increased sensitivity.

Keywords: Brined sardines; Biogenic amines; Histamine; HPLC; *Clostridium* sp.; *Sardinella brasiliensis*.

1 INTRODUÇÃO

A conservação de alimentos para consumo humano é uma preocupação desde épocas remotas da civilização humana. Diversos foram os métodos empíricos utilizados para conservar os alimentos, como secagem, salga, defumação, temperatura e até inibição da presença de oxigênio em carnes e peixes.

Após a revolução industrial, novas tecnologias, equipamentos e conservantes foram desenvolvidos para aumentar a validade comercial de produtos alimentícios utilizando-se os princípios remotamente utilizados de secagem, salga e defumação e outros métodos de conservação. Atualmente, estes métodos são fundamentados em estudos que desenvolvidos para estabelecer bases científicas de controle da validade comercial, ainda que sejam, em algumas regiões do Brasil, utilizados de forma artesanal.

O princípio fundamental da salga de peixes é a desidratação, levando a diminuição da atividade de água do pescado. Concomitantemente, o aumento da pressão osmótica interfere nas membranas celulares de microrganismos em geral, inibindo seu crescimento e desenvolvimento.

Na salga, o produto final obtido pode ser o pescado inteiro, em forma de pasta, como o “bagoong”, um condimento pastoso tipicamente filipino feito com peixe fermentado, ou em forma de molhos, como o “nuoc-mam”, produto vietnamita adicionado de caldo de peixe fermentado com aplicação na culinária local de forma semelhante ao molho shoyo. Ao redor do mundo são comercializados produtos típicos de cada região, elaborados com espécies de peixes regionais com características próprias e tecnologias aplicadas de forma artesanal e com expressiva aceitação dos consumidores locais.

No Brasil, existem produtos artesanais que são derivados do pescado salgado e muito consumido em determinadas regiões do país. Pode-se citar, como exemplos, a salga do pirarucu (*Arapaiga gigas*) na região Norte, considerado localmente como “bacalhau brasileiro” e a salga do bagre (*Bagre spp.*) popularmente conhecido como “mulato velho”.

Dentre os produtos submetidos à salga e elaborados em condições industriais, mas sem legislação própria, se destaca o pescado anchovado, cujo processamento é conhecido como anchovagem e, originalmente, utilizam-se os engraulídeos como matéria prima, obtendo-se o “aliche” como produto final.

A anchovagem do pescado consiste, fundamentalmente, num processo de cura prolongada, no qual as enzimas tissulares e microbianas compartilham suas ações sobre os componentes da matriz alimentar. A ação de algumas enzimas autolíticas e de microrganismos capazes de produzir substâncias bloqueadoras de decomposição atua sobre os hidratos de carbono e proteínas, conferindo a este produto aspecto e aromas especiais.

A sardinha (*Sardinella brasiliensis*) pode ser utilizada como matéria prima, pois possui os componentes biológicos necessários para o desenvolvimento do aroma, do sabor, da cor e da textura típicos dos anchovados e que caracterizam o produto. O produto oriundo desta matéria prima denomina-se “Sardinha anchovada” a qual pode ser considerada uma semi conserva pelo fato de não ser submetido à esterilização comercial ao longo do processamento tecnológico.

A matéria prima deste processamento tecnológico pode ser veiculadora de uma grande variedade de microrganismos patogênicos, a maior parte da microbiota em função da contaminação ambiental. Outra fonte de contaminação importante da matéria prima é o manejo inadequado do pescado, desde o momento da captura, ainda nos barcos pesqueiros, até sua destinação final, passando por inúmeras fases de processamento e transporte.

Na indústria do pescado, além da presença de microrganismos patogênicos, é importante considerar a produção de histamina e outras aminas biogênicas, que são formadas pela quebra da cadeia de frio tornando-se um ponto crítico de controle importante da indústria de pescado. Este fato se justifica pela histamina ser

termoestável, além de ter ação intoxicante potencializada pela presença de cadaverina e putrescina.

A histamina é produzida por mecanismo de descarboxilação enzimática da histidina e está envolvida na mediação primária de reações alérgicas, sendo tóxica em concentrações elevadas. Peixes da família Scombridae, como a cavala, cavalinha e os atuns, e os da família Clupeidae, como a sardinha, são freqüentemente envolvidos em surtos de intoxicação histamínica. O controle da produção de histamina nestas espécies deve ser monitorado a fim de prevenir intoxicações no consumidor.

No Brasil, o pescado maturado não se tornou um hábito de consumo significativo por ser um alimento característico de culturas européias e orientais. Porém, as sardinhas anchovadas produzidas no Brasil têm potencial para alcançar o mercado internacional, pois são produzidas com qualidade e submetidas ao eficiente Sistema de Inspeção Federal implantado no país.

No entanto, a falta de padrões oficiais que regulamente seu processamento tecnológico gera uma dificuldade para a classificação ou normatização do produto nacional e/ou importado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar o processamento tecnológico e validade comercial de sardinhas anchovadas, através de análises bacteriológicas e físico-químicas a fim de avaliar a qualidade de sardinhas anchovadas produzidas em indústria nacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos foram propostos os seguintes procedimentos analíticos:

- Avaliar a presença de *Clostridium* spp.;
- Realizar a contagem de *Enterococcus* spp.;
- Realizar a contagem de bactérias halófilas;
- Realizar a contagem de Enterobactérias;
- Avaliar a presença de *Tetragenococcus* spp.;
- Monitorar por CCD a produção de histamina, cadaverina e putrescina durante as fases de processamento e durante validade comercial;
- Quantificar por HPLC a produção de histamina, durante as fases de processamento e validade comercial;
- Comparar os dados analíticos de quantificação de histamina por HPLC e Espectrofluorimetria;
- Acompanhar a produção de Bases Voláteis Totais durante as etapas de processamento e validade comercial,
- Acompanhar os valores de pH durante as etapas de processamento e validade comercial;

- Acompanhar o percentual de cloretos durante as etapas de processamento e validade comercial;
- Utilizar 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) como agente derivatizante em metodologia por CLAE para a análise de histamina, putrescina e cadaverina em sardinhas anchovadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O processamento tecnológico de sardinhas anchovadas envolve um complexo sistema enzimático e alterações bioquímicas devendo ser acompanhado por rigorosos sistemas de controle. Fatores físico-químicos e bacteriológicos influem no processo de produção e alguns destes aspectos de qualidade serão abordados a seguir.

3.1 TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE SARDINHAS ANCHOVADAS

Os anchovados autênticos são elaborados com os engraulídeos (*Engraulis encrasicolus*, *Engraulis ringens*, *Engraulis mordax*). No entanto, outras espécies de peixes podem ser utilizadas para a produção de peixes anchovados tais como as sardinhas (*Sardinella brasiliensis*, *Sardinella aurita*), manjubas (*Anchoviella* sp.), lambaris (*Astyanax fasciatus*), cavalas (*Scombrer japonicus*) e peixes-agulha (*Belone belone*). Para tanto, são feitas adaptações na tecnologia de produção para a utilização de cada espécie (BEIRÃO, 1976; OETTERER, 2011).

O princípio da anchovagem consiste no aumento da pressão osmótica do meio fazendo uso de sal e mantendo o sistema em anaerobiose. Conseqüentemente, há redução da atividade de água, controlando o crescimento microbiano e a maturação do produto. A anaerobiose inibe os processos bioquímicos fermentativos que deterioram o pescado (OETTERER, 2011).

Pombo (2007) realizou um estudo comparativo de processamentos tecnológicos (Anexos 6.1, 6.2 e 6.3) de anchovagem de sardinhas estabelecendo o processamento descrito, a seguir, como o mais eficiente para a obtenção de sardinhas anchovadas com boa qualidade, considerando parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

O processamento tecnológico de sardinha anchovada inicia-se pela recepção do pescado. Neste momento são observadas a presença de sardinhas deterioradas e a temperatura da matéria-prima, a qual deve estar menor a 4,4 °C (FDA, 2007). Em seguida, as sardinhas são lavadas com água hiperclorada (5ppm) e seguem para a fase de pré-salga.

A etapa de pré-salga é realizada com as sardinhas inteiras e não evisceradas (Pombo, 2007). Depois de lavadas, as sardinhas são colocadas em tanques de alvenaria (capacidade de 7,5 T) higienizadas em camadas alternadas com sal grosso e gelo onde haverá a formação de salmoura. A temperatura inicial das sardinhas é de 2°C, com elevação durante a etapa de pré-salga ao máximo de 19°C. O ambiente é resfriado, tendo a temperatura controlada e mantida a 19 °C (Figura 1).

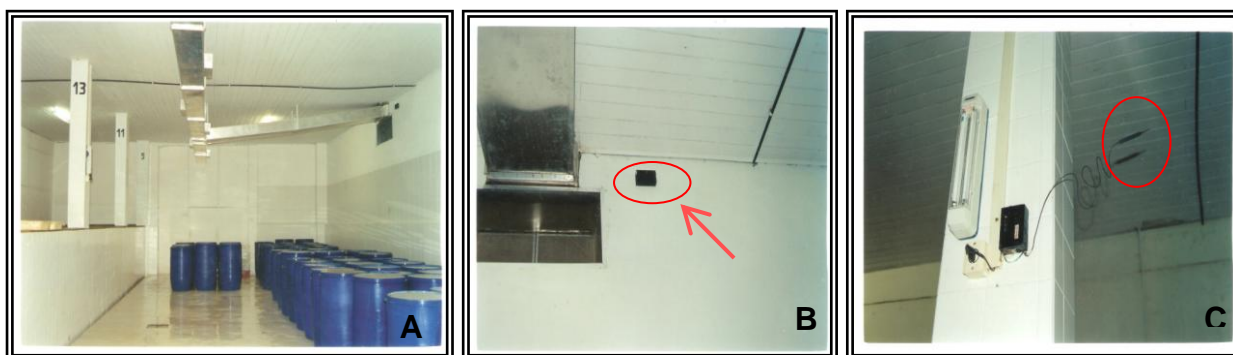


Figura 1 (A, B e C) - Salão com temperatura controlada onde é realizada a maturação do produto (A). Destaque para os sensores de aferição da temperatura (B e C).

Ao longo da fase de pré-salga, imposição de diferentes obstáculos ao crescimento microbiano. À medida que a temperatura da sardinha vai se elevando, o cloreto de sódio vai penetrando e saturando a musculatura do pescado dentro do período de 7 a 10 dias.

Seguindo o fluxograma de produção, as sardinhas são retiradas da pré-salga, evisceradas e descabeçadas. A salmoura formada é filtrada para re-utilização na fase de maturação. Em paralelo a esta etapa, as barricas e/ou tanques de alvenaria são higienizados sendo novamente utilizados na etapa de maturação a seguir.

As sardinhas evisceradas e descabeçadas são recolocadas nos tanques (capacidade de 7 a 9 T) e/ou barricas (capacidade de 130 a 270 Kg) (Figura 2) higienizadas da mesma forma como na fase de pré-salga (camadas alternadas com sal e gelo), adicionadas de salmoura saturada fresca para complementação da

salmoura filtrada, iniciando-se a fase de maturação de, no mínimo, 90 dias. Ao fim do período mínimo de maturação, as características sensoriais das sardinhas (cor, textura, odor e sabor) são observadas para avaliação. A não observância das características sensoriais no padrão estabelecido pela indústria pode levar a extensão da maturação pelo período de 120 dias.



Figura 2 - Barricas com capacidade de 130 a 270 Kg contendo as sardinhas em maturação.

Obtidas as características desejadas, as sardinhas têm a pele extraída e os filés são submetidos a uma pressão mecânica (Figura 3) para a retirada do excesso de salmoura. Em seguida, os filés são cortados em tiras e embalados, sendo coberto com óleo comestível e lacrado á vácuo. Como nenhum tipo de esterilização comercial é aplicado ao produto este é caracterizado como uma semi conserva.



Figura 3 – Prensa manual utilizada para a retirada do excesso de salmoura do produto após o período de maturação.

O rendimento médio para uma partida de sardinha fresca, após toda a etapa de processamento tecnológico, é de 26%¹. Os fatores que interferem neste rendimento estão relacionados com o tamanho da sardinha, o teor de gordura que varia em função da sazonalidade e a duração da fase de maturação.

3.1.1 A maturação das sardinhas

O início da maturação ocorre pela ação de bactérias, inclusive as intestinais, seguido de alterações enzimáticas e químicas, como a oxidação das gorduras, em temperatura de refrigeração. Seguido dos compostos solúveis como a histidina livre, a uréia e o óxido de trimetilamina, as bactérias degradam as proteínas (OETTERER, 1999). Entretanto, Dissaraphong et al. (2007) acrescenta que a hidrólise da proteína também é induzida por enzimas proteolíticas tissulares do peixe, além das enzimas proteolíticas produzidas por bactérias halofílicas.

Na maturação ocorre a conversão das proteínas insolúveis do pescado em formas solúveis. Neste processo, há degradação da actomiosina em peptídeos e aminoácidos, compostos nitrogenados solúveis, que se difundem na salmoura, onde ocorre o aumento de nitrogênio amínico. Ao final do processo de maturação, estão presentes, entre outros, os aminoácidos histidina, alanina, leucina, fenilalanina, prolina, e ácido glutâmico (OETTERER, 2011).

Oetterer (2011) ainda descreve que o “flavour” característico do produto é obtido de uma mistura basicamente constituída de amins, ácidos orgânicos e aminoácidos e que as amins aparecem no produto final, pois alguns microrganismos possuem a capacidade de descarboxilar os aminoácidos.

3.2 CONTROLE DE QUALIDADE

Para a obtenção de sardinhas anchovadas com qualidade é importante que a matéria prima (*Sardinella brasiliensis*) fresca apresente o padrão de qualidade estabelecido pela legislação vigente, seguindo os parâmetros descritos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Pescado Fresco (Inteiro ou Eviscerado) (BRASIL, 1997) e a Instrução Normativa nº 25 de junho de 2011 que aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescado e seus Derivados (BRASIL, 2011).

¹ NA: Informação originada de comunicação pessoal com o Sr. Gilberto D’Elia, Diretor Presidente da Indústria e Comércio de Conservas Ubatuba LTDA, 2011.

A sardinha (*S. brasiliensis*) é uma espécie de peixe com elevada importância econômica no Brasil sendo pertencente à família *Clupeidae* que contém elevados teores de histidina livre (100 – 500 mg.100⁻¹) na porção muscular (CONTRERAZ-GÚZMAN, 1994), fator diretamente implicado no aumento da possibilidade de formação de histamina. Para que isto não ocorra, a principal medida de controle é a manutenção da matéria prima em temperatura controlada não superior a 4,4°C (FDA, 2007).

Em função das limitações da inspeção tradicional e da amostragem/análise de lotes e sua incapacidade de garantir a segurança dos alimentos, em 1970 foi desenvolvido o conceito do APPCC, que trouxe uma grande contribuição para a produção de alimentos seguros. Os objetivos do APPCC são focados nos perigos em um determinado alimento que tenham alguma probabilidade de afetar a saúde coletiva caso não sejam controlados, e no desenvolvimento de produtos alimentícios e de condições de processamento, comercialização, preparação e uso que permitam controlar esses perigos (ICMSF, 2012).

Lupin et al. (2010), avaliando a produção de derivados de pescado em indústrias Latino americanas que aplicaram o sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle, verificaram que nestes locais houve redução com custos para manutenção da qualidade do pescado com consequente aumento da qualidade do produto final.

O sistema APPCC tem como pré-requisito as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO). Estes pré-requisitos identificam os perigos potenciais à segurança do alimento desde a obtenção da matéria-prima até o consumo, estabelecendo os Pontos Críticos de Controle (PCC). Estes PCC são monitorados com o objetivo de garantir a obtenção de um alimento seguro e com qualidade ao fim do processo (ANVISA, 2012; ICMSF, 2012).

Para a produção de sardinhas anchovadas há necessidade de aplicação de cuidados rigorosos quanto às questões de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, pois ao longo do processamento tecnológico não é aplicado tratamento térmico pelo calor, não havendo esterilização comercial do produto pronto (POMBO et al, 2009).

3.2.1 Microrganismos veiculados pelo pescado

Leitão et al. (1983), em trabalho realizado com pescado de origem marinha, detectaram que as bactérias presentes nos peixes podem ser principalmente encontradas na superfície da pele e vísceras. Ogawa e Maia (1999) afirmam que as guelras também apresentam contaminação bacteriana podendo gerar contaminação dos demais tecidos após a morte do animal.

A maioria das bactérias marinhas são bacilos Gram negativos, móveis, anaeróbios facultativos e psicrófilicos e os gêneros prevalentes na água do mar são *seudomonas*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium* (HAGLER; HAGLER, 1991). Outros gêneros que também fazem parte da microbiota natural do pescado são: *Moraxella*, *Shewanella* e *Micrococcus* (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Dentre as bactérias patogênicas associadas ao consumo de peixes e seus derivados destacam-se: *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* (NOVOTNY et al., 2004).

Algumas bactérias comuns ao trato gastrointestinal dos homens e animais, com capacidade de resistir a condições adversas, podem estar presentes neste ambiente em função da constante contaminação por causa da emissão de esgotos ao mar (GIRAFFA, 2002).

3.2.1.1 Bactérias halófilicas e halotolerantes

As bactérias que conseguem se desenvolver e mesmo necessitam de altas concentrações salinas são denominados halófilos e aqueles que sobrevivem, mas não crescem e nem se desenvolvem, são denominados halodúricos (JAY, 2005).

Os microrganismos ligeiramente halófilos, que crescem em meio contendo de 2% a 5% de sal, são de origem marinha, principalmente dos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*. Aqueles que crescem em meios contendo de 5% a 20% de sal são chamados de moderadamente halófilos tendo como exemplos as bactérias das famílias *Bacillaceae* e *Micrococcaceae*. Bactérias que crescem em meios contendo concentrações de 20% a 30% de sal são extremamente halófilas como o *Halobacterium* spp. e *Halococcus* spp.. Já os patógenos *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* e *Staphylococcus aureus* são halotolerantes (OETTERER, 2011).

Ventosa et al. (1998) em um estudo sobre a biologia das bactérias aeróbicas moderadamente halófilas cita Vilas et al.² (1985) que comenta que o *Pediococcus halophilus* como bactéria dominante presente em anchovas curadas e que esta bactéria se desenvolve em condições de aerobiose e anaerobiose, além de tolerar valores superiores a 15% de NaCl.

A maioria das bactérias moderadamente halófilas envolvidas em contaminação de alimentos salgados (5 a 20% de NaCl) são espécies Gram positivas das famílias *Bacillaceae* e *Micrococcaceae*. Algumas espécies de bactérias Gram negativas também podem se desenvolver em alimentos curados contendo sal em valores superiores a 10% (BAROSS, 2001).

3.2.1.2 *Enterococcus* spp. e *Tetragenococcus* spp.

Os *Enterococcus* spp. são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, dispostos aos pares ou pequenas cadeias (DOMING et al., 2003; TENDOLKAR et al., 2003) e podem tolerar elevadas concentrações de sal. Pertencem a família *Enterococcaceae*, junto com os gêneros *Melissococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (HUGAS et al., 2003).

Os membros típicos do gênero *Enterococcus* (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. mundti*) são facilmente distinguíveis, pois crescem em ambas as temperaturas, 10 e 45°C, em caldo contendo até 6,5% de NaCl, em pH 9,6 e em presença de 40% de bile. Existem dados na literatura registrando a presença de *Enterococcus* spp. em pH 5,0 (FRANZ et al., 2003; HUGAS et al., 2003; TENDOLKAR et al., 2003). Diferem do gênero *Tetragenococcus* por não crescer a 10 °C, além de ser sensível ao antibiótico vancomicina (WINN, KONEMAN, 2006).

Este microrganismo pode ser utilizado como indicador de higiene do alimento, baseado na capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas, somado à possibilidade de estar presente no trato intestinal de homens e animais e à resistência a temperaturas elevadas (DOMING et al., 2003; GIRAFFA, 2002).

Porém, Hugas et al. (2003) destacaram que o *Enterococcus* spp. possui um papel importante em alimentos fermentados pois algumas espécies podem produzir

² VILLAR, M. A. P.; DE RUIZ HOLGADO, J.J.; SANCHEZ, R.E.T.; OLIVER, G. Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). *Journal of Applied Microbiology*. v. 49, p.664-666. 1985.

enterocinas com atividade antimicrobiana que agem sobre a microbiota patogênica possivelmente presente no alimento. Em contrapartida, a capacidade de produzir descarboxilases, com conseqüente formação de aminas biogênicas, também gera preocupação. Fatores como o pH, temperatura e concentração de NaCl interferem na produção das aminas biogênicas por intervirem na curva de crescimento do *Enterococcus faecalis* (GARDINI et al., 2001).

Sob estes aspectos, os *Enterococcus* spp. tornaram-se o centro de muitas atividades de pesquisa e preocupação em relação à saúde coletiva. De um lado, participam de importantes funções em vários produtos fermentados e, de outro, é utilizado como indicador de contaminação fecal, além da existência de algumas espécies que tem algum potencial patogênico (DOMING et al., 2003).

Ao avaliarem a qualidade de peixes anchovados Pombo et al (2009) isolaram *Enterococcus* spp. em 76% das amostras analisadas, além de constatar a presença de histamina em todas as amostras analisadas sugerindo uma relação entre estes fatos.

O gênero *Tetragenococcus*, atualmente classificado na família *Enterococcaceae*, ordem *Lactobaciles* na classe *Bacilli* (GARRITY; HOLT, 2001), é composto por quatro espécies: *T. halophilus* (COLLINS et al., 1990), *T. muriaticus* (SATOMI et al., 1997), *T. solitarius* (ENNAHAR, CAI, 2005) e *T. koreensis* (LEE et al., 2005). São cocos Gram positivos, imóveis, não formadores de esporos, oxidase negativos e homofermentativos (LEE et al., 2005).

O *T. muriaticus* foi originalmente isolado em um molho de peixe fermentado tradicional no Japão e foi identificado como uma nova espécie de bactéria ácida láctica halofílica formadora de histamina (KIMURA et al, 2001; KONAGAWA et al, 2002)

No estudo realizado por Kobayashi et al. (2004) observou-se que o crescimento de *T. muriaticus* e *T. halophilus* foi efetivo em meio de MRS com variações de pH entre 5,8 e 7,5 e concentrações de NaCl que variaram entre 3% e 15%. No entanto, o conjunto condições que proporcionou o melhor crescimento bacteriano foi em meio MRS adicionado de 7% de NaCl em pH entre 6,5 e 7,5.

Zaman et al. (2009) realizaram uma revisão sobre os alto teores de aminas biogênicas em peixes fermentados e relataram o *T. Muriaticus* e *T halophilus* como espécies formadoras de histamina nestes produtos.

3.2.1.3 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* possui bastonetes Gram positivos, anaeróbios facultativos, os quais fermentam glicose produzindo ácidos e, em algumas espécies, gás. São oxidase negativos, usualmente catalase positivos, reduzem nitrato a nitrito e podem ser móveis ou imóveis (BORMAN et al, 1944).

Os gêneros pertencentes a esta família são, entre outros, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Hafnia* e *Proteus*. Em geral são bactérias mesófilas, apesar de conter algumas cepas psicrótróficas, que estão associadas à contaminação de origem fecal, não sendo necessariamente o trato intestinal de animais e homens o seu “habitat” natural. As bactérias pertencentes a esta família podem estar presentes no ambiente, sobretudo unidades de produção de alimentos, sendo consideradas como indicadores de qualidade higiênico sanitária dos alimentos (KORNACHKI; JOHNSON, 2001).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são formadoras de histamina, sendo a *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei* as produtoras mais efetivas desta amina biogênica (STRATTEN, TAYLOR, 1991).

Silveira et al (2007) avaliando a qualidade e a quantidade de microbiota total e produtora de histamina em peixes detectaram a presença de espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Em revisão bibliográfica realizada por Suzzi e Gardini (2003) sobre aminas biogênicas em produtos fermentados, diversos autores são citados afirmando o isolamento de bactérias formadoras de histamina nestes produtos. Dentre as espécies bacterianas isoladas e identificadas foram observadas: *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoga*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, entre outras bactérias.

Pombo et al. (2009) comparando três processamentos tecnológicos para a elaboração de sardinhas anchovadas isolou bactérias dos gêneros *Proteus*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Pseudomonas*.

3.2.1.4 *Clostridium* spp.

Os clostrídios são bacilos Gram positivos formadores de esporos, anaeróbios estritos e catalase negativos. A principal fonte de clostrídios é o solo, porém também podem ser encontrados no trato intestinal de homens e animais. Quando presente

nos alimentos, a multiplicação deste gênero pode levar a deterioração do produto (*C. pasteurianum*, *C. sporogenes*) ou produção de toxinas (*C. botulinum*, *C. perfringens*) (FRANCO, LANDGRAF, 2005).

O *Clostridium botulinum* pode ser classificado em função de suas toxinas que vão do tipo A ao G (HUSS, 2003). Porém, somente as estirpes produtoras de toxinas não-proteolíticas do tipo B, E e F, as quais são termolábeis e sensíveis a presença de NaCl, têm o ambiente aquático como habitat natural (HUSS, 1997).

As toxinas produzidas pelo *C. botulinum* do tipo A, B, E e F são causadoras de botulismo humano. A doença, conseqüente da ingestão da toxina através do alimento contaminado, pode provocar náuseas e vômito podendo evoluir para sintomas neurológicos. Em casos mais graves a intoxicação pode ser fatal em 24 Horas (HUSS, 2003).

O *Clostridium perfringens* produz proteínas biologicamente ativas, algumas com atividade tóxica e outras com atividade enzimática. São cinco estirpes para classificação do *C. perfringens* (A, B, C, D e E), porém, somente os tipos A, C e D são produtores de enterotoxinas sendo o tipo A o mais envolvido em toxinfecções alimentares (FRANCO, LANDGRAF, 2005).

No entanto, Gelli et al. (2002) relata que pH inferior a 4,5 impede a multiplicação de *C. botulinum*, atividade de água inferior a 0,93 é limitante e que concentrações superiores a 8% de NaCl impedem a produção de toxina.

3.2.2 Conceito dos obstáculos de Leistner

O estudo das interações entre os fatores intrínsecos (características do alimento) e extrínsecos (ambiente em que o alimento se encontra) que interferem na capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos nos alimentos originou o conceito dos obstáculos de Leistner que, em inglês, é conhecido como hurdle theory (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Lembrando que os fatores intrínsecos são a Atividade de água (Aa), acidez (pH), potencial de oxi-redução (Eh), composição química, fatores antimicrobianos naturais e interações entre microrganismos. Contudo, relaciona-se como fatores extrínsecos a temperatura, a umidade relativa e composição gasosa, todos relacionados ao ambiente. Estes efeitos podem ser aditivos, sinérgicos ou antagônicos e estas interações serão utilizadas de acordo com o alimento produzido (ibid). Ray (2005) cita, além dos fatores acima citados, que a tecnologia de

processamento do alimento, tais como tratamento térmico, secagem, fermentação e adição de aditivos, também compõe o conjunto de fatores do conceito dos obstáculos de Leistner.

Para melhor compreensão, seguem alguns resultados de trabalhos descritos por Scott (1989) e Gould e Jones (1989) que exemplificam como funciona o conceito dos obstáculos de Leistner:

1. Tratamento térmico do alimento com valores inferiores a 100°C não eliminam um grande parte dos microrganismos patogênicos e formadores de esporos. Estes microrganismos e esporos podem ser ativados pelo aumento da temperatura ambiente levando ao seu crescimento e multiplicação. No entanto, se o pH do alimento for reduzido a 4,5 ou NO₂ e NaCl forem adicionados, os esporos não germinarão;
2. O *Clostridium botulinum* cresce a 35°C em Aa 0,95. No entanto, se a temperatura de estocagem cair para 20°C, este só cresce se a AA aumentar para 0,97;
3. *C. botulinum* cresce em pH 7,0 a 37°C e Aa 0,94; no entanto, quando há queda do pH para 5,3 não existe crescimento do clostrídio, mesmo que a Aa suba para 0,99. A produção de toxina pelo *C. botulinum* acontece quando a bactéria é incubada a 16°C por 28 dias em pH 5,5. Contudo, se o pH cair para 5,2, não há produção de toxina.

Para a produção de sardinhas anchovadas com qualidade, a utilização do conceito dos obstáculos de Leistner é fundamental, pois não há utilização de tratamento térmico pelo calor (esterilização comercial) em nenhuma das etapas de processamento.

Pombo et al. (2007), demonstra em estudo comparativo de três processamentos tecnológicos para a elaboração de sardinhas anchovadas que o acompanhamento da temperatura ambiente associada as baixa atividade de água e ph acidificado do meio em que se encontram as sardinhas são importantes para que haja inibição do crescimento.

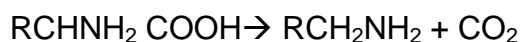
3.3 AMINAS BIOGÊNICAS

As Aminas Biogênicas (AB) se formam, nos alimentos, pela descarboxilação microbiana de seus aminoácidos precursores ou se formam, nos seres vivos, como conseqüência dos processos metabólicos celulares normais. São compostos

orgânicos nitrogenados de caráter básico presentes em animais, plantas e microrganismos (LEHANE; OLLEY, 2000).

As principais AB são a histamina, a putrescina e a cadaverina pelo fato da histamina estar relacionada a casos de intoxicação alimentar alérgica e ter seu efeito tóxico potencializado pela presença da putrescina e cadaverina. Também se destacam a tiramina, a triptamina, a β -feniletilamina, a agmatina, a espermina e espiromidina (GIROTO et al., 2010; LEHANE; OLLEY, 2000; SIGNORINI; GUERRERO-LEGARRETA, 2009).

A formação de AB ocorre por ação da enzima descarboxilase no grupamento carboxila (COOH) terminal dos aminoácidos formando aminas biogênicas ou bioativas e CO₂, como demonstrado na reação abaixo (OGAWA; MAIA, 1999).



A histamina é formada quando seu aminoácido precursor (Figura 4), a histidina, é descarboxilado. Koessler et al.³ (1928) citado por Halasz et al. (1994) sugeriram que a formação de aminas biogênicas é um mecanismo de defesa das bactérias a um meio muito ácido. Outras aminas como a cadaverina, putrescina e tiramina também são formadas pela descarboxilação dos seus respectivos precursores, lisina, ornitina e tirosina (OGAWA; MAIA, 1999).

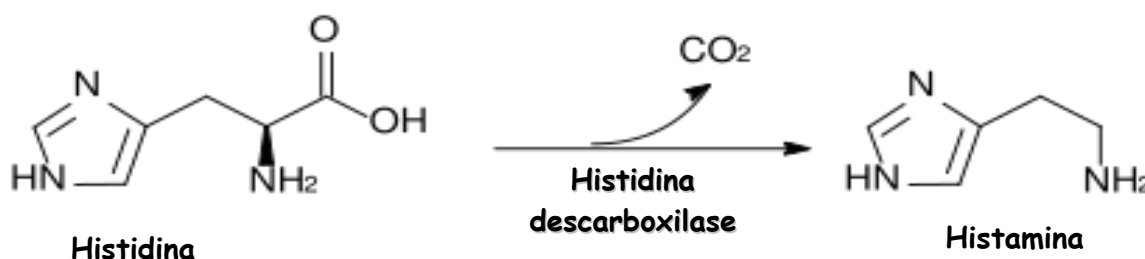


Figura 4 – Reação de descarboxilação de histidina formando histamina e liberando gás carbônico.

A histamina pode ser catabolizada de diversas maneiras: a Diaminoxidase - DAO (ou histaminase) pode promover a desaminação da molécula de histamina através da oxidação da mesma formando acetoaldeído imidazólico e ácido imidazolacético; a N-metiltransferase (N-HMT) pode promover uma metilação na cadeia da histamina formando a metil-histamina; ou a cadeia pode ser metilada e

³ KOESSELER, K. K.; HANKE, M. T.; SHEPPARD, M. S.. Production of histamine, tyramine, brochospartic and arteriospastic substance in blood broth by pure culture of microorganisms. *Journal of Infectious Diseases*. v.3, p. 363-377, 1928.

acetilada ao mesmo tempo. A presença de DAO e N-HMT no trato intestinal e de N-HMT no fígado fazem com que concentrações de histamina inferiores a 100 mg.Kg⁻¹ possam ser ingeridos sem que ocorram intoxicação ou reações alérgicas. A Monoaminoxidase (MAO) é outra enzima importante na detoxificação da histamina. (TAYLOR et al., 1989).

No entanto, Mongar (1957) observou que a presença de outras aminas biogênicas inibe a DAO e N-HMT aumentando a absorção intestinal da histamina.

Outros fatores com o consumo de medicamentos inibidores da MAO e DAO (anti-histamínicos, agentes anti-malária, alguns medicamentos para tratamentos psicológicos, entre outros) e doenças intestinais (doença de Crohn) também podem ser importantes na ocorrência de intoxicações por histamina (LEHANE; OLLEY, 2000; TAYLOR et al., 1989).

3.3.1 Fatores físico-químicos e bacteriológicos para formação de aminas biogênicas

Existem alguns fatores limitantes que interferem na formação de histamina e de outras aminas biogênicas tais como: a disponibilidade de substrato, o pH, a Atividade de água (Aa), a concentração de sal e a temperatura.

O pH é um fator importante, pois interfere na descarboxilação dos aminoácidos, que ocorre em maior concentração em meio ácido. O valor ótimo de pH está entre 4,0 e 5,5, pois nesta faixa algumas bactérias são estimuladas a produzirem mais descarboxilases como forma de defesa ao meio ácido (HALASZ et al., 1994). Este meio ácido favorece o desenvolvimento de alguns microrganismos como as bactérias lácticas as quais podem promover a inibição da microbiota acompanhante (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os alimentos que contem baixa ou reduzida Atividade de água (Aa) influem, negativamente, na formação de aminas biogênicas em função da diminuição do metabolismo bacteriano (JAY, 2005).

Ambientes com alta concentração de cloreto de sódio (NaCl) influenciam o metabolismo bacteriano e geram progressiva alteração na membrana onde estão localizadas as enzimas descarboxilases, inibindo a liberação enzimática (OREN, 1999). Desta forma, Henry e Koehler (1986) descreveram que concentrações de 3,5 a 5,5% de NaCl podem inibir a formação de histamina. Pombo et al. (2009) observaram que durante o processamento tecnológico de sardinhas anchovadas, a

saturação da salmoura permite que a concentração de sal na porção muscular das sardinhas varie entre 15,65% e 18,87%.

A adição de sais provoca a redução do valor da Atividade de água, que, juntamente com a temperatura, influem no metabolismo bacteriano. A Aa, temperatura e disponibilidade de nutrientes são interdependentes. Assim como o pH, a Aa desfavoráveis provocam o aumento da fase *lag* de multiplicação bacteriana. (GARDINI et al., 2001; JAY, 2005; SUZZI; GARDINI, 2003).

A temperatura influencia na curva de crescimento, o metabolismo e a atividade enzimática bacteriana interferindo, conseqüentemente, na formação de aminas biogênicas. Temperaturas elevadas favorecem a proteólise e a reação de descarboxilação, resultando no aumento da concentração de aminas. Em contrapartida, baixas temperaturas diminuem a formação de aminas em função da redução das reações de descarboxilação (HUSS, 1997).

Durante o processo de maturação, os aminoácidos livres no músculo e os produzidos pela decomposição de proteínas podem sofrer descarboxilação e desaminação por ação de enzimas bacterianas (POMBO et al., 2009). Sobre esse aspecto, é importante considerar que na etapa de maturação ocorre uma série de transformações por ação de proteases e peptidases de origem bacteriana e endógena com conseqüente formação de AB, assim como alterações sensoriais desejáveis para produção de determinados tipos de alimentos (GIROTO et al., 2010).

Para os sistemas enzimáticos, a temperatura exerce dois papéis que podem causar efeitos opostos na velocidade da reação enzimática. Ao mesmo tempo em que o aumento da temperatura acelera a velocidade da reação enzimática, este aumento também pode gerar a desnaturação da enzima, diminuindo a reação (GARDINI et al., 2001; HUSS, 1997).

As principais bactérias responsáveis pela formação de histamina pertencem à família Enterobacteriaceae (HALÁSZ et al., 1994; LEHANE; OLLEY, 2000). No entanto, outros gêneros bacterianos são citados por produzirem enzimas descarboxilases, como algumas bactérias lácticas (SUZZI; GARDINI, 2003) representadas pelos gêneros *Enterococcus* (GARDINI et al., 2001; GIRAFFA, 2002) e o *Tetragenococcus* (KUDA et al., 2007; SATOMI et al., 1997). Halász et al. (1994) comentam que os gêneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacillus* também produzem a histidina descarboxilase.

3.3.2 Procedimentos analíticos para determinação de aminas biogênicas

No Brasil, a histamina vem sendo analisada por técnicas semi-quantitativas, como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (SCHUTZ et al., 1976), e quantitativas, como a Espectrofluorimetria (AOAC, 2002; BRASIL, 1997) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (BRASIL, 2011).

Métodos semi-quantitativos geralmente são utilizados para o acompanhamento de processos de produção ou triagem pelos sistemas de controle de qualidade das indústrias para verificar a presença de aminas biogênicas de forma rápida e com baixo custo (MÁRSICO et al., 2006; SHAKILA et al., 2001; SOARES et al., 2005).

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de adsorção têm múltiplas vantagens, pois é de fácil compreensão e execução, separação em espaço de tempo curto, grande repetitividade e baixo custo (LOPES, 2006).

A separação na cromatografia de adsorção depende da competição entre a adsorção na superfície do sólido e a dessorção pelo solvente (etapa de eluição). Solventes mais polares irão deslocar os compostos mais rapidamente para a fase líquida (AQUINO NETO, 2003).

O método é baseado na comparação visual de manchas avermelhadas formadas pela presença de aminas biogênicas no alimento que são separadas por migração diferencial e adsorção em placa de sílica e são reveladas por solução de Ninhidrina 3% sendo, posteriormente comparadas aos padrões das aminas biogênicas estudadas (LOPES, 2006; SCHUTZ et al., 1976).

O método da Espectrofluorimetria é instrumental, demandando mais tempo, maior quantidade de reagente na etapa analítica de purificação. A histamina é selecionada pela resina de troca iônica (Bio-Rad AG 1-X8, 50-100 *mesh* ou Dowex 1-X8, 50-100 *mesh*) e complexada com o agente derivatizante *o*-ftalaldeído (OPA), formando um composto fluorescente. A determinação fluorimétrica é feita com excitação a 350 nm e emissão a 444 nm (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada e os solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (SPADARO, 2006).

A resina contém grupos funcionais que retém os analitos com cargas iônicas opostas aos da resina, como estão representadas nas equações a seguir: $R^+X^- + A^- \leftrightarrow R^+ A^- + X^-$ ou $R^-X^+ + C^+ \leftrightarrow R^- C^+ + X^+$ (QUATTROCCHI et al., 1992; SPADARO, 2006).

Todo o processo resulta numa análise demorada e com produtos de derivatização pouco estáveis, além de não quantificar outras amins biogênicas potencializadoras da ação intoxicante da histamina.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) como método oficial para análise de amins biogênicas em alimentos é recente no Brasil (BRASIL, 2011). Esta técnica permitir a quantificação de diferentes amins biogênicas de um mesmo extrato, concomitantemente, poupando tempo e permitindo a avaliação mais abrangente da qualidade do alimento analisado (HEIDI; COLLIN, 2005; MALLE; VALLE, 1996; POMBO et al., 2010; SILVEIRA et al., 2007).

Diversas metodologias utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram desenvolvidas para a análise de amins biogênicas em alimentos.

Malle e Valle (1996) desenvolveram uma metodologia analítica rápida para a determinação de amins biogênicas por CLAE que pode ser usado em pescado e derivados. Usando este método é possível quantificar a putrescina, cadaverina e histamina e propor um Índice de Qualidade (IQ) para as diferentes espécies de peixes.

A CLAE também foi utilizada por Dulfos et al. (1999) para quantificar putrescina, cadaverina, histamina, espermina, esperimidina, metilamina, com o objetivo de definir limites referenciais para caracterizar a qualidade de *Merlangus merlangus* (espécie de badejo) e *Pleuronectes platessa* (espécie de linguado).

A quantificação de putrescina e cadaverina foi feita através de CLAE por Heide e Collin (2005) para o desenvolvimento de método rápido e simples para a determinação de baixas concentrações destas amins biogênicas objetivando a determinação de frescor em pescado nas primeiras horas de deterioração.

Contudo, a quantificação de amins biogênicas também é utilizada para determinar a qualidade de outros alimentos como o café, no qual Silveira et al. (2007) determinaram o perfil e os teores de amins biogênicas e bioativas após diferentes torrações do café.

Yldirim et al (2007) determinaram as concentrações de histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, agmatina e β - feniletilalanina por CLAE em

diferentes tipos de vinhos com o objetivo de descrever a relação entre a presença destas aminas biogênicas e os tipos de vinho.

A determinação de aminas biogênicas também foi realizada em carnes (KURT; KOMPRDA et al, 2009; VINCE; ANTONELLI, 2002; ZORBA, 2009) e queijos (INNOCENTE et al, 2007; LADERO et al, 2009).

3.4 PADRÕES DE QUALIDADE

Atualmente, não existem regulamentos ou normativas específicas para o processamento tecnológico de sardinhas anchovadas que forneçam um padrão de qualidade e identidade para este produto. Para produção nacional, no Brasil são utilizadas leis, normas e regulamentos onde são encontradas referências de manipulação de pescado que promovam a produção de sardinhas anchovadas com qualidade e inocuidade para o consumidor (POMBO et al, 2009).

As indústrias inspecionadas pelo Ministério da Agricultura optaram por consultar as legislações Europeias utilizando-as como complemento para a fabricação de sardinhas anchovadas em função da não observância na legislação brasileira da possível ocorrência de formação de histamina no pescado maturado elaborado com espécies de peixes contendo elevado teor de histidina em sua composição muscular (ibid).

Baseando-se no RIISPOA (BRASIL, 1952), as sardinhas anchovadas seriam classificadas como “produto curado salgado” (art. 448, art. 460 e art. 461). Pela definição da referida Lei, o *“pescado curado” é o produto elaborado com pescado íntegro, tratado por processos especiais, compreendendo, além de outros, os seguintes tipos principais: 1- pescado salgado; 2- pescado ... adicionados ou não de um meio aquoso ou gorduroso, dispensando-se a esterilização ... obtido pelo tratamento do pescado do pescado íntegro, pela salga a seco ou por salmoura.”*

Em complementação ao RIISPOA (BRASIL, 1952) foi elaborado o Regulamento Técnico de Identidade de Qualidade (RTIQ) de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco (BRASIL, 2000). Neste documento existe a orientação do processo que caracteriza o pescado salgado. *“Os peixes eviscerados e limpos devem ser misturados ao sal (cloreto de sódio) e permanecer em salmoura ou sal por tempo suficiente para que, a concentração do sal se distribua uniformemente em todo o músculo e permita a cura...”*

No entanto, ao avaliar o processamento tecnológico de fabricação de sardinhas anchovadas percebe-se que estas legislações não esclarecem alguns aspectos importantes da fabricação da matriz alimentar, como o tempo mínimo de maturação e as espécies que são aptas para este processamento tecnológico.

Nas “Normas Sanitárias de Produção e Comercialização dos Produtos da Pesca” (PORTUGAL, 1991) faz-se referência aos “Produtos Transformados” que é caracterizado por “*todo o produto da pesca que tenha sido submetido a um processo químico ou físico, tal como o aquecimento, a defumação, a salga, a seca... ou combinação destes processos.*” Nesta norma são feitas recomendações técnicas para a produção de pescado salgado, porém também não há referência às espécies recomendadas para serem submetidas à fase de maturação e ao período mínimo de maturação. Entretanto, na norma há recomendações para que o tratamento seja destinado a inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e que este deve contribuir para assegurar a conservação do produto, mas deve ser cientificamente reconhecido.

Com relação à qualidade microbiológica, a Resolução RDC nº 12 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) é utilizada para referenciar as análises bacteriológicas em Pescados e Produtos de Pesca. No item “*pescados, moluscos e crustáceos secos ou salgados; semi-conservas de pescado, moluscos e crustáceos, mantidas sob refrigeração (marinados, anchovados ou temperados)*” indica-se a realização da Enumeração de coliformes a 45 °C, a contagem de Estafilococos coagulase positiva e a verificação da presença de *Salmonella* spp.

Quanto aos parâmetros físico-químicos de qualidade, além de ser usada como referência a Portaria nº 185 (BRASIL, 1997) e a Instrução Normativa nº 25 (BRASIL, 2011) para avaliar a matéria prima, faz-se uso da legislação Européia (CE, 2005) para avaliar a produção de histamina em “*Produtos da pesca que tenham sido submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura, fabricados a partir de espécies de peixe associados a um elevado teor de histidina.*”

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa obteve-se o apoio de empresa nacional, inspecionada pelo Ministério da Agricultura, localizada na cidade de Ubatuba-SP. Desta forma foi possível acompanhar um lote de fabricação de sardinhas anchovadas de 250 Kg em duas etapas: na fabricação do produto (desde a matéria prima até produto pronto) e na validade comercial através de análises bacteriológicas e físico-químicas.

Na etapa de fabricação do produto, as amostras foram coletadas nos seguintes pontos: matéria prima fresca, fase de pré-salga (dias um, três, sete e dez) e mensalmente na fase de maturação (30, 60 e 90 dias). A segunda etapa do trabalho consistiu na avaliação mensal do produto pronto originado do lote acompanhado anteriormente, durante o período de validade comercial.

As amostras foram coletadas da forma como estabelecido pela Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2003) e foram encaminhadas para os laboratórios de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal (POA), Controle Físico-químico de POA da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, além do Laboratório de Cromatografia Líquida da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, via terrestre, em embalagem isotérmica contendo gelo.

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

As análises bacteriológicas para controle de qualidade da matéria prima foram baseadas na resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001), sendo realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

Segundo a RDC nº 12 (BRASIL, 2001), para produtos de pesca como semiconservas de anchovados, são previstas as seguintes análises bacteriológicas: enumeração de coliformes (MERCK, 2000 modificado por FRANCO e MANTILA,

2002), contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2003) e isolamento e identificação de *Salmonella* sp. (PIGNATO et al, 1995).

Além das análises bacteriológicas citadas pela legislação (Brasil, 2001), forma realizadas a enumeração de *Enterococcus* spp., verificação da presença de *Tetragenococcus* spp., a contagem de bactérias halofílicas, a presença de *Clostridium* spp. e a contagem de enterobactérias como descrito a seguir.

4.1.1 Enumeração de *Enterococcus* spp.

A metodologia utilizada para esta análise bacteriológica (MERCK, 2002 modificado por FRANCO e LEITE, 2005) teve por objetivo a Enumeração de *Enterococcus* sp. e redução do consumo do meio de cultura utilizado, o Chromocult® Enterococci Broth (Cat n° 110294) (MERCK, 2002), através da técnica de miniaturização.

De cada amostra coletada, foram obtidas subamostras de 25 g em triplicata, pesadas assepticamente, acondicionadas em envelope de “stomacher” e homogeneizada com solução salina peptonada a 0,1 % (SSP 0,1%), em “stomacher” (Seward®) por dois minutos em velocidade normal.

A partir da diluição de 225 mL de SSP 0,1% e 25 g da amostra (diluição 10^{-1}) preparou-se a diluição de 10^{-2} retirando-se uma alíquota de 100 μ L da primeira diluição previamente homogeneizada e colocando-a em microtubos tipo “ependorf” esterilizado contendo 900 μ L de SSP 0,1 %. Após homogeneização da segunda diluição, uma alíquota de 100 μ L desta foi retirada e colocada em um terceiro “ependorf” esterilizado contendo 900 μ L de SSP 0,1%. Assim prepararam-se três diluições de cada amostra (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Destas diluições, retiraram-se três alíquotas de 100 μ L e, cada uma delas, foi distribuída em microtubo tipo “ependorf” contendo 1 mL de Chromocult® previamente preparado, esterilizado e distribuído em “ependorfs” esterilizados de 1,5 mL. Assim sendo, de cada amostra obtiveram-se três diluições em SSP 0,1%, e, de cada diluição, três repetições na semeadura do Chromocult®, encubando-as por 24 a 48 horas a 45 +/- 0,5 °C (Figura 5).

O Chromocult® é um caldo de enriquecimento seletivo que se torna azul esverdeado quando houver crescimento positivo. A turbidez do meio pode ser fraca (MERCK, 2000).



Figura 5 – Tubos do tipo “ependorf” contendo o meio de Chromocult® com viragem da cor do meio indicando crescimento positivo para *Enterococcus* spp.

4.1.2 Presença de *Tetragenococcus* spp.

A determinação da presença do gênero *Tetragenococcus* foi feita através da metodologia utilizada por Kobayashi et al (2004). No entanto, como a metodologia utiliza o meio de MRS contendo 7% de NaCl e o produto estudado contém maiores concentrações de sal, também foi realizado o estudo da presença do *Tetragenococcus* spp. em meio de MRS adicionado de 15 % de NaCl, a fim de reproduzir as condições encontradas pelo microrganismo no alimento estudado.

As diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} de cada amostra de 25 g foram feitas em água peptonada contendo 7% ou e 15% de NaCl e semeadas pela técnica de “pour plate” nos meio de MRS 7% NaCl e MRS 15% NaCl, respectivamente. As placas foram arrumadas em bandejas forradas com algodão úmido e incubadas a 35°C - 37°C por 7 dias (Figura 6).



Figura 6 – Placas contendo o meio de MRS, semeadas e incubadas em estufa a 35 °C por 7 dias.

4.1.3 Contagem de bactérias halofílicas.

As diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} de cada amostra de 25 g foram feitas em água peptonada contendo 3% de NaCl e semeadas pela técnica de “pour plate” nos meio de TSA 3% NaCl. As placas foram arrumadas em bandejas forradas com algodão úmido e encubadas a 35°C - 37°C por 7 dias (Figura 7).

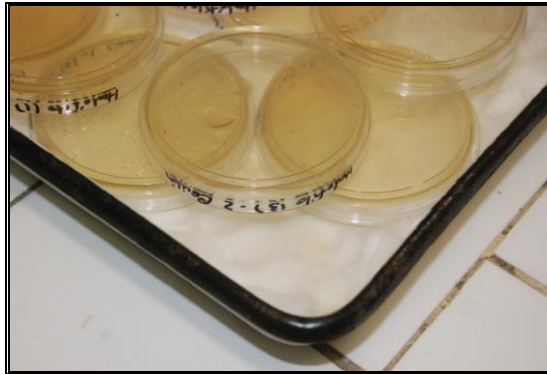


Figura 7 - Placas contendo o meio de TSA 3% NaCl, semeadas e incubadas em estufa a 35°C por 7 dias

4.1.4 Presença de *Clostridium* spp.

As diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} de cada amostra de 25 g foram feitas em SSP 0,1% e semeadas pela técnica de “pour plate” nos meio de SPS. As placas foram arrumadas em “Jarra Gaspak” de 2,4L de capacidade e encubadas a 35°C - 37°C por 7 dias (Figura 8).

Para que dentro da jarra fosse feito um ambiente de anaerobiose foi utilizada a técnica de “passivação do cobre” através da qual se coloca, sobre as placas arrumadas dentro da jarra, uma placa de petri contendo 5g de palha de aço embebido em 75 mL de solução de sulfato de cobre acidulado 5%. A palha de aço deve permanecer na solução até a solução azulada ficar incolor e a palha de aço avermelhada.

Dentro da jarra, ainda sobre a “passivação do cobre”, deve ser colocado um pequeno Becker contendo 20mL de água na qual será adicionado, no momento de lacrar a jarra, 8g de bicarbonato e ácido cítrico (Sonrisal®). No momento da efervescência, há formação de CO_2 . Paralelamente, o cobre presente na palha de aço catalisa a reação de oxidação do ferro, consumindo o oxigênio do ambiente e formando óxido ferroso (JÜRGENSEN, JÜEGENSEN, 1982).



Figura 8 - Jarra Gaspak contendo as placas semeadas, e material utilizado para a passivação do cobre.

4.1.5 Contagem de Enterobactérias.

Para efetuar a detecção e enumeração de *Enterobacteriaceae* foi utilizado o meio de VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar). Este meio contém peptona como fonte de carbono além de nitrogênio, vitaminas e minerais. O Extrato de levedura complementa a concentração de vitamina B a qual estimula o crescimento bacteriano. Os sais de bile e o cristal violeta inibem o crescimento das bactérias Gram positivas (DIFCO, 2009).

A partir das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em SSP 1% foram semeadas as placas contendo o meio de VRBG pela técnica de “pour plate” sendo estas incubadas a 35 °C por 24 horas. (Brasil, 2003)

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras coletadas, ao chegarem ao Laboratório de controle físico-químico, foram pesadas em balança analítica de acordo com cada protocolo de análise, identificadas e congeladas. As amostras para análise de Bases Voláteis Totais (BVT) e análise de pH não foram congeladas, sendo estas análises realizadas no dia da chegada da amostra.

Além das análises de BVT e Ph (BRASIL, 1981), também foram realizadas análise de aminas biogênicas pelos métodos de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (SCHUTZ, CHANG e BJELDANES, 1976), Espectrofluorimetria (AOAC, 2002) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (POMBO et al., 2010); avaliação do percentual de cloretos (BRASIL, 1981).

4.2.1 Avaliação de formação de aminas biogênicas

Para avaliação da produção de histamina, putrescina e cadaverina, utilizou-se o método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) segundo a metodologia proposta por Schutz, Chang e Bjeldanes (1976) e CLAE (POMBO et al., 2010). Contudo, também foi realizada a quantificação de histamina pelo método quantitativo fluorimétrico segundo a metodologia preconizada pela AOAC (2002).

4.2.1.1 Método de Cromatografia em Camada Delgada

Pelo emprego desta metodologia, utilizou-se uma alíquota de 1g da porção muscular transferindo-a para tubo de ensaio e adicionando-se 2mL de metanol e homogeneizadas em vórtex (Certomat ® MV). O conjunto foi aquecido em banho-maria até fervura. Neste momento, transferiu-se o tubo de ensaio para centrifuga (Hermle ® Z 360 K) para obtenção de sobrenadante após dois minutos a 3000 rpm.

De cada amostra centrifugada retirou-se 10 µL do sobrenadante, com o auxílio de pipetador automático, aplicando-as na placa de sílica. Foram aplicados, também, os padrões de histamina com 2 µL, 5 µL e 10 µL. As placas com os padrões e as amostras foram colocadas em cuba cromatográfica, contendo o eluente (20 mL de Acetona P.A. e 1 mL de Hidróxido de Amônio P.A.– 20:1 v/v).

A solução eluente se desloca por capilaridade sobre a placa de sílica até 2 cm da borda superior carreando as aminas biogênicas (histamina, putrescina e cadaverina) que, quando presentes, se ligam à sílica em diferentes deslocamentos. Ao ser retirada da cuba, a placa foi secada com ar fluyente quente por um período de 20 minutos e em estufa à 36 °C, para a eliminação dos vapores de amônia.

Para a visualização das aminas, a placa foi revelada aspergindo-se uniformemente sobre a mesma, solução de ninhidrina a 0,3 % em metanol. A placa foi secada novamente com ar fluyente quente, para visualização da coloração

avermelhada que aparece em função da complexação da ninhidrina com o radical NH_3 das aminas biogênicas.

A quantificação da histamina foi feita pela comparação visual entre as manchas formadas pelos padrões e pelas amostras, de mesmo deslocamento, além da intensidade da cor (Figura 9).

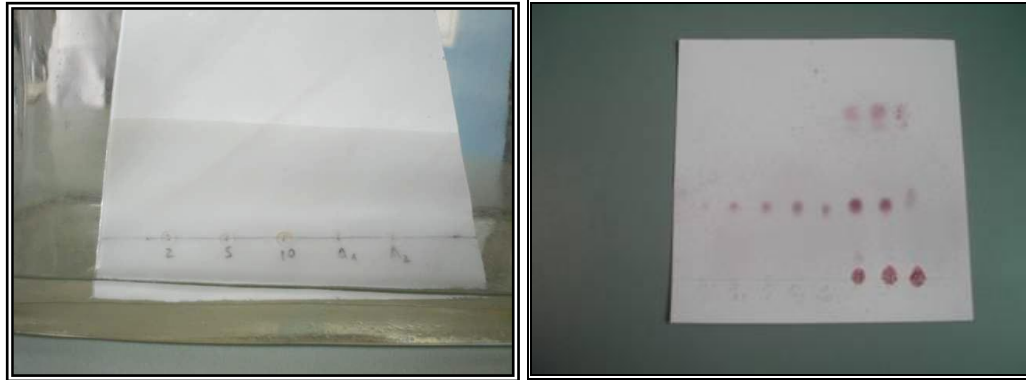


Figura 9 – À esquerda, observa-se a placa de sílica aplicada com as amostras e padrões no momento da corrida cromatográfica. À direita, observa-se a placa revelada pela solução de ninhidrina 3%.

4.2.1.2 Método Fluorimétrico

O método fluorimétrico baseia-se na reação da histamina com o Ortoftaldeído (OPT), formando um composto fluorescente (AOAC, 2002).

Empregando esta metodologia, utilizou-se 10 g da amostra homogeneizando-a com 100 mL de metanol em liquidificador (Oster ®). Com o auxílio de um funil de polipropileno, o homogeneizado foi transferido para um erlenmeyer de 125mL e tampado com um pequeno quadrado de folha de alumínio. O conjunto foi submetido a banho-maria por 15 minutos a 60°C, seguido de filtração em papel Whatman ® n°1 para balão de 100 mL. Assim, foi obtido um extrato que pôde ser conservado sob refrigeração até realização do procedimento analítico.

A purificação do extrato foi feita através da filtração de 1 mL da solução em coluna de troca iônica e eluido com 35 mL de água destilada. O filtrado foi transferido para um balão de 50 mL contendo 5 mL de HCl 1N. O volume do balão foi completado com água destilada e o filtrado homogeneizado e, em seguida, refrigerado.

Do filtrado refrigerado, retirou-se uma alíquota de 5 mL e transferiu-se para um erlenmeyer. Em seguida, se adicionou 10 mL de HCl 0,1N, com a finalidade de homogeneizar a solução. Nas etapas seguintes, foram adicionados 3 mL de

hidróxido de Sódio (NaCl) 1N, 1 mL da solução 0,1 % de OPT e 3 mL de Ácido Fosfórico (H_3PO_4) 1,78M. Entre uma etapa e outra, sempre se procedeu à homogeneização das soluções, sendo que após a adição da solução de OPT, a solução foi agitada de forma constante por 4 minutos.

Também foi elaborada uma solução “branco” da mesma forma como citado anteriormente, diferindo somente na não adição do filtrado resfriado. Utilizamos esta solução para zerar o fluorímetro.

Transferida a solução obtida após a adição do ácido fosfórico para uma cubeta, foi realizada a leitura no fluorímetro (Sequoia–Turner® Modelo 450) e os valores obtidos foram anotados.

Cálculo da quantidade de histamina

$$\text{Histamina mg/Kg} = \frac{(I_s - b) \times 1000}{P \times a}$$

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 linear da reta obtida a partir da “Curva Padrão”

1000 = fator de diluição

4.2.1.3 Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para avaliar a presença de histamina, putrescina e cadaverina nas amostras de sardinha anchovada em processamento e do produto pronto foi utilizado o método desenvolvido por Pombo et al. (2010).

A extração foi realizada de acordo com o método da AOAC (2002) que consiste em homogeneizar 10g de amostra com 100 mL de metanol (Tedia®, grau HPLC) e submeter o extrato a banho-maria a 60°C, por 15 minutos. Em seguida o extrato foi filtrado (Whatman® n° 1) e transferido para balão de 100 mL, corrigindo o volume com metanol quando necessário. Uma segunda filtração foi procedida em filtro Millex® 0,22µM. Uma alíquota de 10µL foi coletada e colocada em “vial” para secagem em dessecador à vácuo por 1h. As pedras de sílica presentes no dessecador foram previamente aquecidas em estufa 105°C por 1h para favorecer a volatilização e secagem da alíquota no dessecador (Figura 10).

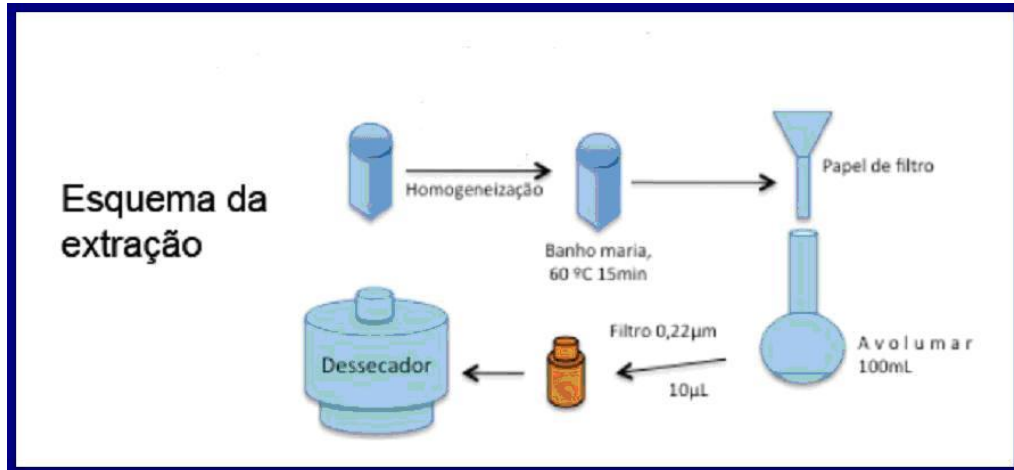


Figura 10 – Esquema prático para visualização da etapa de extração de aminas biogênicas de amostras de sardinha anchovas.

O extrato seco foi ressuspensionado por 20µL de solução de Ácido Clorídrico (HCl) 20mM seguido da adição de 60 µL de tampão borato (pH 8,5). O AQC (20µL) foi colocado no “vial” sendo homogeneizado em vórtex por 15 segundos. A homogeneização deve ser iniciada o mais rápido possível para que a reação do AQC com as aminas biogênicas ocorra efetivamente. A solução derivatizada foi transferida para um segundo “vial” com redutor de volume e colocada no cromatógrafo para análise (Figura 11).

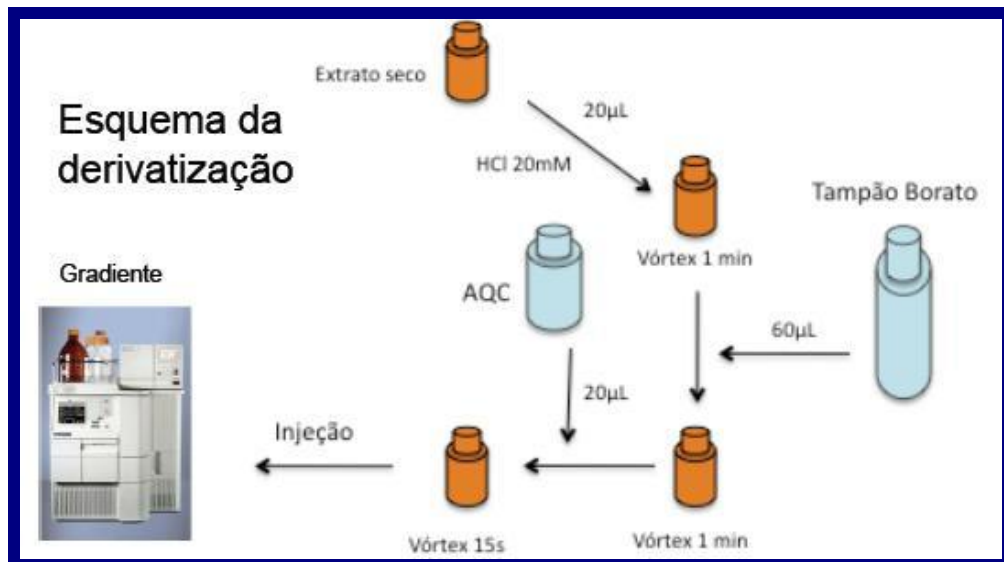


Figura 11 – Esquema prático para visualização da etapa de derivatização de aminas biogênicas de amostras de sardinha anchovas.

Para a análise das alíquotas derivatizadas utilizou-se o cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695 (Figura 12), com injetor automático, com filtro pré-coluna 0,5

µm Krud Katchen Ultra-In-Line®, coluna Phenomenex® 50 X 2,10 mm modelo Kinetex C18, 2,6µm, 100Å, em forno a 40°C e detector de fluorescência Waters® modelo 2475. O comprimento de onda de excitação foi de 254 nm e da emissão de 395 nm.



Figura 12 – Equipamento utilizado para as análises de aminas biogênicas em sardinhas anchovadas - cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695.

O equipamento permaneceu conectado a um computador e foi controlado pelo software Empower® da Waters®.

A água ultra pura utilizada nos experimentos foi recém coletada do equipamento Milli-Q®, apresentando resistividade mínima de 18MΩ/cm e carbono orgânico total (TOC) máximo de 7 ppb.

A fase móvel foi composta por duas soluções: (A) Acetonitrila - Tedia® e (B) Tampão Acetato - Waters®, pH 5,5. O preparo da solução A foi feito através da diluição de 50 mL do AccQ.Tag Eluente - Waters® concentrado para análise de aminoácidos em 500 mL de água Milli-Q®. Os componentes para a preparação da solução derivatizante fazem parte do kit para aminoácidos da Waters® AccQ•Tag® e forma preparados de acordo com o estabelecido pelo fabricante.

4.2.2 Análise da produção de Bases Voláteis Totais

Para a análise de Bases Voláteis Totais, utilizou-se o método de Microdifusão em Placas de Conway®, descrito no Manual do LANARA (BRASIL, 1981). Foram homogêneos 10 g da amostra com 10 mL de solução de Ácido Tricloroacético

(TCA) 10% seguido de filtração a vácuo em funil de “Buchner” com papel Whatman® acoplado à um Kitasato, sendo assim obtido o extrato.

Na placa de microdifusão de Conway uma alíquota de 2 mL do extrato foi colocada no compartimento externo e no compartimento interno, 2 mL da solução de ácido bórico de Conway. Nas bordas da placa foi colocada vaselina sólida e sobre esta uma placa de vidro deixando uma pequena área aberta para a adição de 2 mL de solução saturada de carbonato de potássio (K_2CO_3) ao compartimento externo, junto com o extrato. Rapidamente, a placa foi tampada, girando-se suavemente o conjunto, com a finalidade de homogeneizar o conteúdo externo. As placas permaneceram por 2 horas em estufa à 36 °C, seguido de titulação de neutralização através da solução de ácido clorídrico 0,1 N.

De cada coleta foram feitas duas extrações de amostras diferentes e cada extração foi feita uma duplicata da captação e titulação das bases.

4.2.3 Percentual de cloretos

A quantificação do teor de cloretos foi realizada pelo método de Möhr, seguindo os procedimentos descritos no Manual do LANARA (BRASIL, 1981).

Foram utilizados de 2 a 5 g da amostra anotando o valor numérico desta pesagem, para ser empregado posteriormente na fórmula matemática de cálculo do percentual de cloreto. Esta massa foi colocada em cadinho de porcelana para carbonização em bico de Bunsen (Figura 13), e posteriormente em forno mufla a 550°C para incineração.



Figura 13 – Carbonização de amostra em cadinho de porcelana.

Três gotas de solução de Ácido Nítrico P.A. e água destilada quente (1:9) foram adicionados ao conteúdo do cadinho duas para facilitar a dissolução das cinza e mais 10 mL de água destilada quente. Filtrou-se o conteúdo em papel Whatman ® para erlenmeyer de 250 mL seguido da aferição do pH do filtrado, corrigindo-o para 8,0 com solução de hidróxido de sódio 0,1N.

Adicionou-se à solução filtrada 1 mL da solução de Cromato de Potássio (K_2CrO_4) a 5% e titulou-se com solução de Nitrato de Prata ($AgNO_3$) 0,1N até o aparecimento da coloração vermelho tijolo.

O cálculo do percentual de cloretos foi feito com a utilização das variáveis V (volume de $AgNO_3$ 0,1N gasto na titulação) e P (peso inicial da amostra) na fórmula que também utiliza o fator de correção (f) e a normalidade (N) da solução de $AgNO_3$ 0,1N, descrito a seguir:

$$\% \text{ Cloretos} = \frac{V \times f \times N \times 0,0585}{P} \times 100$$

4.2.4 Avaliação do pH.

A determinação do potencial hidrogeniônico foi realizada segundo a metodologia oficial descrita no Manual do LANARA (BRASIL, 1981).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização das análises bacteriológica e físico-químicas foram coletadas amostras de, no mínimo, 500g de acordo com Brasil (2003).

4.3.1 Tratamento estatístico dos resultados

Os dados coletados do monitoramento do lote de fabricação de sardinha anchovada resultante das análises bacteriológicas e físico-químicas, em triplicata, foram transformadas em médias para a realização de análises de regressão utilizando o programa estatístico. Graph Pad Prism® (RADUSHEV, 2007).

5 DESENVOLVIMENTO

5.1 EVALUATION OF HISTAMINE PRODUCTION IN SARDINES MATURATED IN SATURATED BRINE

Este primeiro artigo foi submetido à revista Food Additives & Contaminants (Apêndice 1).

EVALUATION OF HISTAMINE FORMATION IN SARDINES MATURATED IN SATURATED BRINE.

Cecília Riscado Pombo^{1*}; Eliane Teixeira Mársico²; Robson Maia Franco²; Micheli Ferreira¹; Daniel Filisberto Schulz³; Ronoel Luiz de Oliveira Godoy³.

¹ Ph.D. Student at the Veterinary Hygiene and Animal Products Technological Processing Pos Graduate School Program at the Fluminense Federal University - UFF *cissapombo@yahoo.com.br; Vital Brazil Filho, 64. CEP 24230-340 Vital Brazil, Niterói - RJ. Brazil. +55 21 99424501

² Department of Food Technologies at the Veterinary College - UFF

³ EMBRAPA Agroindústria de Alimentos (Brazilian Agricultural Research Company – Food Agribusiness) – Guaratiba – RJ

Abstract

The brining process of sardines (*Sardinella brasiliensis*) consists in the maturation by the action of tissular and bacterial enzymes in saturated brine. As a function of the prolonged period of maturation and the high concentration of free histidine in sardine muscle tissues, the process enables the production of biogenic amines, in particular, the histamine, resultant from the action of bacterial decarboxylation. The concentration of enzymes is influenced by the partial or total presence or absence of viscera. The objective of this study was to evaluate the production of histamine in products originated from three different brining processes, at the beginning and end

of the commercial validity period of them. The quantification of histamine was performed by the Spectrofluorimetry (AOAC, 2002) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods (Pombo, 2010). In addition, bacteriological tests for the assessment of the presence of coliforms, *Enterococcus* spp. and the isolation and identification of *Salmonella* spp. were also performed. The process A presented the lowest levels of histamine ($21.78 \pm 3.65 \text{ mg.Kg}^{-1}$). When comparing the results for the production of histamine among the quantitative methods at the end of the expiration date, it was noted that the average levels in mg.Kg^{-1} in the analysis of the products by HPLC in process A (45.08 ± 15.39), B (255.94 ± 6.79) and C (203.17 ± 9.83) did not differ statistically ($p > 0.05$) from the results obtained by spectrofluorimetry (41.38 ± 24.65 ; 252.36 ± 14.71 and 201.41 ± 12.28 , respectively). *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Proteus* spp. were identified. However, *Salmonella* spp. was not isolated. The characteristic growth of *Enterococcus* spp. was not observed however Gram positive tetrad cocci were observed. There was no coliform counting. In conclusion, the production of histamine continues during the commercial validity period. The process with the pre-brine phase (A) is the most suitable for preventing the formation of histamine. The results for the quantification of histamine by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the spectrofluorimetry methods did not differ statistically.

Key Words: *Sardinella brasiliensis*; Brined Sardine; Histamine; HPLC; Spectrofluorimetry.

1 Introduction

Sardines (*Sardinella brasiliensis*) maturation in saturated brine consists in a slow preservation process, where tissue autolytic enzymes and microbiological enzymes act over several subcomponents which produce substances that prevent decomposition. Those enzymes act over the hydrocarbons and proteins, giving foods special texture and flavors. Chemical compounds, like biogenic amines, are formed providing the sensory characteristics of the product.

Biogenic amines are nitrogen organic bases with low molecular weight present in animals, plants and microorganisms. It is formed in food by bacterial enzymes that promote decarboxylation of amino acids.

A range of biogenic amines can be found in cheeses, meats, wines, fermented and matured products (Rossano et al., 2006) and fish, especially in pelagic fish (Contreras-Guzmán, 1994). Brined and matured sardines (*S.*

brasiliensis) may contain high concentrations of histamine besides the presence of other biogenic amines, like putrescine and cadaverine (Pombo et al., 2006; Pombo et al., 2009).

The analysis of histamine formation is important in the fish industry because of its thermo stability. Additionally, the presence of putrescine and cadaverine may potentiate the toxicity of histamine. The presence of histamine in food is a great concern due to the toxicological implications to the human health when ingested in amounts that may cause adverse reactions. These quantities are related to the sensitivity of each individual and the presence of other biogenic amines (Lehane & Olley, 2000).

The histidine decarboxylation enzyme can be present in genera *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* and *Lactobacillus* (Halász et al., 1994). The main bacteria responsible for histamine formation belong to the family Enterobacteriaceae (Halász et al., 1994; Lehane & Olley, 2000). However, other bacteria also produce decarboxylation enzymes such as the lactic acid bacteria (Suzzi & Gardini, 2003) where *Enterococcus* spp. (Gardini et al., 2001; Giraffa, 2002) and *Tetragenococcus muriaticus* (Satomi et al., 1997; Kuda et al., 2007) are included.

The aim of this study was to quantify and compare the presence of histamine in sardines matured in saturated brined product ready for consumption at the beginning and end of the commercial validity period of the product to verify the continuous formation of histamine. Additionally, the study sought to compare the results from histamine quantification between the Spectrofluorimetry and HPLC techniques.

2 Material and Methods

The quantification of histamine was made in products ready for consumption originated from three different experimental technological processes: the usual processing method to matured sardines in saturated brine and two other technological alternatives of production. The experimental technological processes were made in a local factory in Ubatuba city, São Paulo. Those methods were: the usual industrial processing ('A'), a technological processing method with maturation of the whole fish ('B') and a technological processing method with maturation of the eviscerated fish ('C').

2.1 Usual industrial processing ('A')

After selecting and washing the sardines in hyper chlorinated water (5 ppm) the whole sardines are placed on layers (alternating with coarse salt and ice) in 250 kg fish capacity rigid plastic containers, initiating the pre-salting phase for 7 to 10 days. Then, sardines are decapitated, gutted and placed in a similar clean container for the maturation phase (90 days) and kept at 19°C (controlled room temperature). The salt concentration of the brine is maintained at 24 °Bé. After the maturation period the sardines are removed from the brine, their skin is manually extracted and the excess of the brine is withdrawn. Next, the sardines are hand-filleted, packed, weighed, covered with edible oil and vacuum closed. There is no thermal treatment by heat during the technological process classifying this product as a semi-preserve.

2.2 Entire fish fermentation method ('B')

The difference between technological processing method B and the usual industrial method A is that in B process the pre-salting phase is skipped and the maturation phase is carried out with the whole sardine.

2.3 Gutted fish fermentation method ('C')

Technological processing method C differs from the usual industrial method A in the pre-salting phase, and from processing method B in the evisceration. In C, the sardines are matured wholly gutted and decapitated without pre-salting phase.

2.4 Sample collection

Three blocks of stocks were collected from each of those experimental technological processes for bacteriological and physics-chemical analyses at the beginning and end of the commercial validity period of the products. One block contains 24 jars in a total of 72 jars per block of stock. From these 72 jars, 36 were used to make the analysis at the beginning of the commercial validity and the other 36 at the end of this period.

2.5 Methods of analysis

The bacteriological analyses were based on the resolution RDC N° 12 (Brazil, 2001) and on the Normative Instruction N° 62 (Brazil, 2003). Coliforms enumeration (Merck, 2002 modified by Franco & Mantilla, 2004), isolation and identification of *Salmonella* spp. (Pignato et al., 1995) and *Enterococcus* spp. colony enumeration (Merck, 2002 modified by Franco & Leite, 2005) were performed.

At the beginning of the commercial validity the bacteriological analyses cited and the quantification of histamine by the Spectrofluorimetric method (AOAC, 2002) was conducted.

At the end of the commercial validity analyses of the histamine content were conducted by the Spectrofluorimetric (AOAC, 2002) and HPLC (Pombo et al., 2010) methods. The samples were stocked under the same marketing conditions.

The spectrofluorimetric method is based on the reaction from the histamine extracted from the sample with methanol, purified by an ion exchange resin (Dowex[®] 1X8-100-Cl) and subsequent reaction with ortho-phthalaldehyde (OPT) forming a fluorescent compound. The reading was performed in a fluorometer (Sequoia-Turner[®] Model 450).

The analyses by HPLC used a Waters[®] Alliance[®] 2695 chromatographer and a Kinetex C18, 2,6 μm , 50 X 2,10 mm Phenomenex[®] column. Mobile phase acetonitrile: acetate buffer (pH 5.5), from 4 to 50%. Flow of 0,51 mL/min and fluorescence detector (excitation at 254 nm, emission at 395 nm). The aliquots taken according to the spectrofluorimetric method were filtered in a 0,22 μm Millex[®] filter and derivatized with AccQ•Tag[®].

The ANOVA analysis of variance and the Tukey test for the comparison of the averages with 5% of significance were used to analyze the results.

3 Results and discussion

The quantification of histamine results by the spectrofluorimetry method at the beginning and end of the commercial validity period (processes A, B and C) are expressed in mg.Kg^{-1} and presented in Table 1.

At the beginning of the commercial validity period of the product, a significant statistical difference was observed ($p < 0.05$) between the average levels of histamine generated by technological processes A, B and C ($21.78 \pm 3.65 \text{ mg.Kg}^{-1}$; $45.03 \pm 21.50 \text{ mg.Kg}^{-1}$; $31.83 \pm 7.37 \text{ mg.Kg}^{-1}$). At the end of commercial validity period, histamine levels generated by technological processes A ($41.33 \pm 24.65 \text{ mg.Kg}^{-1}$), B ($252.36 \pm 14.71 \text{ mg.Kg}^{-1}$) and C ($201.41 \pm 12.28 \text{ mg.Kg}^{-1}$) also presented statistical difference ($p < 0.05$).

The results demonstrate that there was an increase in the average levels of histamine in all technological processes. This fact can be explained by the lack of a heat treatment during the processes used, allowing the decarboxylation enzymes to continue acting on the histidine substrate.

Analyzing the results collected from process A (Table 1), it is possible to establish that the pre-brine phase appears to exert a positive effect on the control of histamine production, since this process presented the smallest difference between

the initial and final levels of histamine in the commercial validity period of the product. The action of the decarboxylation enzymes in the pre-brine phase seems to be more intense however at the same time it is believed that other enzymes are produced and are involved in the control of histamine formation through its own degradation, which is also suggested by Mah & Hwang (2009).

At the end of the commercial validity period of products, histamine levels were quantified by HPLC (Pombo et al., 2010) and spectrofluorimetry (AOAC, 2002). Results are shown in Table 2.

Samples from A, B and C processes analyzed by HPLC at the end of the commercial validity period presented the following average levels of histamine, respectively: $45.08 \pm 15.39 \text{ mg.Kg}^{-1}$, $255.94 \pm 6.79 \text{ mg.Kg}^{-1}$ and $203.17 \pm 9.83 \text{ mg.Kg}^{-1}$. The results obtained by Spectrofluorimetric method were $41.33 \pm 24.65 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (A), $252.36 \pm 14.71 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (B) and $201.41 \pm 12.28 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (C). No statistical difference was observed ($p > 0.05$) between the quantification by the two methods regardless of the technological process used (Table 2).

The stability of the reagents used for derivatization in the Spectrofluorimetry (Ortho - phthalaldehyde - OPT) and in the HPLC (6 - aminoquinolil - N - hydroxysuccinimidyl - carbamate - AQC) can represent one factor of interference in the quantification because AQC promotes more stable chemical bonds when compared to OPT. The chemical bond between amine and AQC is stable at room temperature for one week (Millipore Corporation, 1993). In AOAC (2002) method, it is recommended that the reading of the reacted sample with OPT has to be performed within the first 30 minutes. The instability of the chemical bond between histamine and OPT has also been reported by Önal (2007) in a review of analytical methods for the determination of biogenic amines in food.

Growth of *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp. and *Proteus* spp. were observed in samples from the A and B processes incubated in the Rambach[®] media. This media was used for the isolation and identification of *Salmonella* spp., but no *Salmonella* spp. was isolated.

The Gram-negative selective pre-enrichment methodology described by Pignato et al. (1995) may be related to the growth of *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp. and *Proteus* spp. observed. This fact may also explain the presence of colonies indicative of *Escherichia* spp. even in the absence of positivity in the coliforms count by the elected method. *Klebsiella* spp. has been previously reported in fish by

Auerswald et al. (2006), Hálósz et al. (1994) and Yoshinaga & Frank (1982) as being involved in the formation of histamine. Erkan & Özden (2008) evaluated the presence of enterobacteria in eviscerated and whole sardines and demonstrated that there was a greater count of these bacteria in whole sardines, supporting the isolation of *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp. and *Proteus* spp. in the A and B but not in the C process utilized in this study.

No *Enterococcus* spp. characteristic growth was observed in the used media (Chromocult®) however the turbidity in the media indicated bacterial growth. Thus, by using the technique of Gram staining of smears on microscope slides, Gram positive tetrad cocci very similar to the ones reported by Satomi et al. (1997) were observed. This author identifies a Lactic Acid Bacterium (LAB), moderately halophilic, belonging to the *Tetragenococcus* genus and involved in the formation of histamine (Satomi et al., 1997; Konagaya et al., 2002).

In a study carried out by Auerswald et al. (2006), the results of histamine quantification in industrialized fish meal was 76 mg.Kg⁻¹. In these same samples there was no isolation of bacteria. Therefore, the absence of bacterial growth in some samples from this study does not indicate absence of decarboxylation enzymes because the microorganism may have temporarily lived in the food, produced the enzyme, released it in the environment but did not endure the conditions of high salinity. Since the brined sardine is a semi-preserved product, the enzyme is not denatured, because there is no heat treatment during the technological process and it may remain active after the product is ready.

5 Conclusions

It is concluded that the production of histamine continues during the commercial validity period of the product in all technological processes studied.

The process that includes a pre-brine phase (A) is the most suitable for preventing the formation of histamine besides developing more stable products with less histamine formation along the commercial validity period.

More studies are needed focusing on the biochemical reactions during the pre-brine phase in the technological process A.

The results for the histamine quantification by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and spectrofluorimetry methods did not differ statistically.

6 References

- Auerswald, Lutz; Morren Carel; Lopata, Andreas L. (2006) Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood. *Food Chem.*, 98, 231-239.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists (2002) *Official Methods of Analysis*. (17th ed.) Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- Brazil. (2001) Ministry of Health. Sanitary Vigilance National Agency. *Resolution n° 12*. January, 2nd, 2001.
- Brazil. (2003) Ministry of Agriculture. *Normative Instruction n° 62*. August, 26, 2003. *Official analytical methods for microbiological analysis to control animal origin products and water*. Brasília, DF.
- Contreras – Guzmán, E. S. (1994) *Fish and fisheries biochemistry*. Jaboticabal: FUNEP.
- Erkan, Nuray; Özden, Özkan (2002) Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardinella pilchardus*) stored in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43, 1549 - 1559.
- Gardini, F.; Martuscelli, M.; Caruso, M. C.; Galgano, F.; Crudele, M.A.; Favati, F.; Guerzoni, M.E.; Suzzi, G. (2001) Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 105 –117.
- Giraffa, G. (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 163-171.
- Halász, A.; Baráth, A.; Simon - Sarkadi, L.; Holzapfel, W. (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 42-48.
- Konagaya, Y.; Kimura, B.; Ishida, M.; Fujii, T. (2002) Purification and properties of a histamine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 1136-1142.
- Kuda, T.; Mihara, T.; Yano, T. (2007) Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. *F. Control.* 18, Jun.
- Lehane, L.; Olley, J. (2000) Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.*, 58, 1-37.
- Mah, Jae-Hyung; Hwang, Han-Joon. (2009) Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *F. Control.* 20, 796–801.

Merck, 2002, modified by: Franco, R. M.; Mantilla, S. P. S. (2004) *Escherichia coli* em cortes de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade de antimicrobianos aos sorovares predominantes. XIV Seminário de Iniciação Científica e Premio UFF Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia.

Merck, 2002, modified by: Franco, R. M.; Leite, A. M. O. (2005) Enumeração e identificação de *Enterococcus* spp. e cepas de *Escherichia coli* patogênico em coxas de frango e estudo de atividade antimicrobiana das cepas isoladas. XV Seminário de Iniciação Científica e Premio UFF Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia.

Merck (2002) *Microbiology Manual*, Berlin. Germany.

Millipore Corporation. (1993) *Waters AccQ.Tag Chemistry Package. Insytuction Manual*. Millipore Corporation: Massachusetts.

Önal, Armagan. (2007) A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *F. Chem.* 103, 1475-1486.

Pignato, S.; Marino, A. M.; Emanuele, M. C.; Iannota, V.; Caracappa, S.; Giammanco, G. (1995) Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonellae* in foods. *Appl. Env. Microbiol.* 61, 5, 1996-1999.

Pombo, Cecília Riscado; Mársico, Eliane Teixeira; Franco, Robson Maia; Guimarães, Carlos Frederico Marques; Aguiar, Núbia C. Da Silva; Pardi, Henrique Silva; Oliveira, Geraldo Abreu. (2006) Physical-chemical and bacteriological characterization of anchovy fish. *Brazilian J. Vet. Sci.*, 13, 3, 170-173.

Pombo, Cecília Riscado; Mársico, Eliane Teixeira; Franco, Robson Maia; Guimarães, Carlos Frederico Marques; Cruz, Ana Maria Paschoal Da; Pardi, Henrique Silva. (2009) Salted and fermented fish processes evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44, 2100-2105.

Pombo, C.R.; Mársico, E.T.; Schulz, D.F.; Godoy, R.L.O.; Pacheco, S. (2010) Desenvolvimento de novo método de análise de histamina, putrescina e cadaverina por clae utilizando derivatização com 6-aminoquinoliln-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC). *3º Simpósio de Segurança Alimentar*. Florianópolis, Santa Catarina. Mai/Jun. Available in: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/873320> Accessed: 26 set. 2011.

Rossano, L.; Mastrangelo, Lungaro, N; Riccio, P. (2006) Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis*

encrasicholus. (L., 1958): A study by capillary eletrophoresis. *J. Chromatogr., B*, 830, 1, 161-164.

Satomi, Masataka; Kimura, Bon; Mizoi, Michico; Sato, Tsuneo; Fujii, Tateo. (1997) *Tetragenococcus muriaticus* sp. Nov., a New Moderately Halophilic Latic Acid Bacterium Isolated from Fermented liquid Liver Sauce. *Int. J. Sist. Bacteriol.*, Jul., 832-836.

Suzzi, G.; Gardini, F. (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 41-54.

Yoshinaga, Derrick H.; Frank, Hilmer A. (1982) Histamine-producing bacteria in decomposing Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl.Env. Microbiol*, 44, 447-452.

Table 1 – Average Levels of histamine (mg.Kg⁻¹) by Spectrofluorimetry of different technological processes (A, B and C) at the beginning and end of the commercial validity period (one year) of brined sardines.

Technological Processing	Histamine content (Spectrofluorimetry)	
	Beginning of the validity period	End of the validity period
A Pre-brine + Maturation	21.78 ± 3.65 ^a	41.33 ± 24.65 ^x
B Maturation with viscera	45.03 ± 21.50 ^b	252.36 ± 14.71 ^y
C Maturity without viscera	31.83 ± 7.37 ^c	201.41 ± 12.28 ^z

Averages followed by different letters (rows and columns) are different according to the Tukey Test (p < 0.05). DMS_(start A X end A) = 11.75; DMS_(start B X end B) = 12.28; DMS_(start C X end C) = 6.75; DMS_(start A x B x C) = 6.80; DMS_(end A x B x C) = 8.39

Table 2 – Comparison between the average histamine content (mg.Kg⁻¹) by Spectrofluorimetry and HPLC in the different technological processes (A, B and C) at the end of the commercial validity period (one year) of brined sardines.

Technological Processing	Histamine content (at the expiration date)	
	Spectrofluorimetry	HPLC
A Pre-brine + Maturation	41.33 ± 24.65 ^a	45.08 ± 15.39 ^a
B Maturation with viscera	252.36 ± 14.71 ^b	255.94 ± 6.79 ^b
C Maturity without viscera	201.41 ± 12.28 ^c	203.17 ± 9.83

Averages followed by different letters (rows and columns) are different according to the Tukey Test ($p < 0.05$). DMS_(Spectrofluorimetry A x B x C) = 8.39; DMS_(HPLC A x B x C) = 5.76.

5.2. ARTIGO 2: CLOSTRIDIOS SULFITO REDUTORES EM SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADA

O referido artigo foi encaminhado para submissão à Revista do Instituto Adolfo Lutz e está em fase de avaliação pelo corpo editorial conforme indicado no Apêndice 2.

CLOSTRIDIOS SULFITO REDUTORES EM SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADA

SULPHITE REDUCERS CLOSTRIDIOS IN BRINED SARDINES (*Sardinella brasiliensis*)

Cecília Riscado POMBO^{1,*}; Robson Maia FRANCO²; Eliane Teixeira MÁRSICO², Rafael Sharmann MONTEIRO³; Ana Maria Paschoal DA CRUZ⁴

¹ Programa de Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64. Vital Brazil, Niterói – RJ. CEP 24230-340. * cissapombo@yahoo.com.br

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

³ Biólogo Autônomo.

⁴ Fiscal Agropecuária do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura

RESUMO

A sardinha anchovada consiste em um produto submetido a cura prolongada em salmoura saturada. O trato intestinal do pescado pode conter o gênero *Clostridium* como microbiota normal do pescado sendo o *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* espécies patogênicas anaeróbias formadoras de esporos pertencentes deste gênero. Objetivou-se avaliar a penetração de cloreto de sódio (método de Mörh) no pescado na fase de pré-salga verificando a influência deste evento na presença de Clostrídios Sulfito Redutores. Avaliou-se bacteriológica e físico-quimicamente a matéria prima e constatou-se estar em boa qualidade. Não houve isolamento de colônias suspeitas de Clostrídios sulfito redutor em nenhuma das etapas de produção e durante o período de validade comercial. O percentual de cloreto, ao fim da etapa de pré-salga, foi superior a 13% e durante a maturação variou entre 15,55 % e 17,52 %. No produto pronto, a concentração de sal variou entre 12,68 % e 14,10 %. Conclui-se que a fase de pré-salga em sardinhas inteiras não evisceradas não foi determinante para o crescimento e desenvolvimento de Clostrídio sulfito redutor e o elevado percentual de cloreto de sódio junto com o controle da temperatura no ambiente de processamento foram fatores importantes para o controle deste grupo bacteriano.

PALAVRAS CHAVE: Clostrídios Sulfito Redutores; *Clostridium botulinum*; *Clostridium perfringens*; Sardinha maturada; *Sardinella brasiliensis*.

ABSTRACT

Sardines can be matured in saturated brine after pre-salting them whole and ungutted. The intestinal tract may contain the genus *Clostridium* as normal microbiota of fish. Belonging to this genus, *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens* are anaerobic pathogenic spore-forming species. The aim of the study was to evaluate the penetration of sodium chloride (Mörh's method) in fish during pre-salting phase to check the influence of this event in the presence of sulphite reducers *Clostridium*. The raw material was evaluated by bacteriological and physico-chemical analysis and found to be in good quality. There was no isolation of colonies suspected of sulphite reducing *Clostridium* in any of the stages of production and

during the period of trade. The percentage of chloride at the end of the pre-salting phase was over 13% and during maturation varied between 15.55% and 17.52%. In the finished product, the salt concentration ranged between 12.68% and 14.10%. It was concluded that the pre-salting whole and ungutted sardines was not crucial for growth and development of *Clostridium*. In addition, the high percentage of sodium chloride together with the temperature control in the processing environment were important factors for the control this bacterial group.

KEYWORDS: sulphite reducers *Clostridium*; *Clostridium botulinum*; *Clostridium perfringens*; maturated sardines; *Sardinella brasiliensis*.

INTRODUÇÃO

A sardinha anchovada consiste em um produto submetido a cura prolongada em salmoura saturada, no qual as enzimas tissulares e microbianas compartilham ações sobre os componentes da matriz alimentar. Algumas enzimas são capazes de produzir substâncias bloqueadoras de decomposição e atuam sobre os hidratos de carbono e proteínas, conferindo aos alimentos aspecto e aromas especiais.^{1,2}

O princípio do processamento tecnológico consiste no aumento da pressão osmótica utilizando o cloreto de sódio, mantendo o processo em anaerobiose, e inibindo os processos bioquímicos fermentativos. Conseqüentemente, ocorre diminuição da atividade de água, controlando o crescimento microbiano.¹

De forma simplificada, o processo tem início pela etapa de seleção e lavagem. Em seguida, é realizada a pré-salga das sardinhas inteiras não evisceradas por período de 7 a 10 dias, com formação de salmoura. A temperatura inicial é de 2°C, com elevação durante a etapa de pré-salga ao máximo de 19 °C. Durante este período, há troca gradual dos agentes conservantes, a medida que a temperatura da sardinha vai se elevando, o cloreto de sódio vai penetrando e saturando a musculatura do pescado. Posteriormente, as sardinhas são evisceradas e a salmoura formada na fase de pré-salga é filtrada e utilizada na fase de maturação com duração mínima de 90 dias. Em seguida, as sardinhas são filetadas e embaladas, não havendo esterilização comercial, o que justifica este estudo.

A matéria prima deste processamento tecnológico pode ser veiculadora de uma grande variedade de microrganismos patogênicos, a maior parte dos quais em função da contaminação ambiental. Porém, no trato intestinal pode haver a presença do gênero *Clostridium* que faz parte da microbiota normal do pescado.^{3,4,5}

Os Clostrídios Sulfito Redutores são bacilos Gram positivos formadores de esporos, uma estrutura de resistência na qual o material genético fica protegido quando o ambiente é desfavorável à multiplicação bacteriana. Estas formas resistentes ao calor, radiação ionizante, compostos químicos, desidratação e congelamento podem voltar à forma vegetativa quando encontram o ambiente favorável à sobrevivência. A multiplicação pode levar a deterioração do alimento ou produção de toxinas.⁶

O *Clostridium botulinum* pode ser classificado em função de suas toxinas que vão do tipo A ao G⁷. Porém, somente as estirpes produtoras de toxinas não-proteolíticas do tipo B, E e F, as quais são termolábeis e sensíveis a presença de NaCl, têm o ambiente aquático como habitat natural⁸.

As toxinas produzidas pelo *C. botulinum* do tipo A, B, E e F são causadoras de botulismo humano. A doença, conseqüente da ingestão da toxina através do alimento contaminado, pode provocar náuseas e vômito podendo evoluir para sintomas neurológicos. Em casos mais graves a intoxicação pode ser fatal em 24 Horas⁷.

O *Clostridium perfringens* produz proteínas biologicamente ativas, algumas com atividade tóxica e outras com atividade enzimática. São cinco estirpes para classificação do *C. perfringens* (A, B, C, D e E), porém, somente os tipos A, C e D são produtores de enterotoxinas sendo o tipo A o mais envolvido em toxinfecções alimentares⁶.

Pelo fato de não haver esterilização comercial do produto e haver a fase de pré-salga das sardinhas inteiras não evisceradas, a possibilidade da presença do gênero *Clostridium* na trato intestinal das sardinhas gera preocupação.

Objetivou-se avaliar o comportamento da penetração de cloreto de sódio na porção muscular do pescado durante a fase de pré-salga verificando a influência deste evento na presença de Clostrídios Sulfito Redutores ao longo das etapas do processamento tecnológico e validade comercial do produto pronto.

MATERIAL E MÉTODOS

Na linha de produção separou-se um lote composto por 250 kg de sardinhas que foi acompanhado ao longo de todo o processo de anchovagem através de análises físico-químicas e bacteriológicas. Em seguida, amostras do produto pronto desse lote foram avaliadas durante a validade comercial.

A obtenção das amostras durante o processamento tecnológico foi baseada nas especificações da Resolução RDC nº12⁹, que considera uma amostra indicativa aquela que contem 500g do alimento a ser analisado. As amostras da matéria prima sardinha (*S. brasiliensis*), em triplicata, foram coletadas e embaladas em saco plástico esterilizado, adicionados de gelo para manutenção da refrigeração e encaminhadas aos laboratórios onde foram realizados os procedimentos analíticos.

Juntamente com amostras da matéria prima foi encaminhado um recipiente contendo 20 Kg de sardinhas (*S. brasiliensis*) inteiras não evisceradas sob salmoura saturada para acompanhamento, em laboratório, da fase de pré-salga. A sardinha em salmoura saturada foi mantida em ambiente com controle de temperatura a 19 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

A ação conservante da baixa temperatura promovida pelo gelo adicionado à salmoura foi gradualmente sendo substituída pela ação conservante do sal presente na salmoura. Assim, a medida que a temperatura da salmoura se eleva ocorre a penetração de cloreto de sódio na musculatura da sardinha (*S. brasiliensis*).

Nas amostras de sardinha (*S. brasiliensis*) fresca foram realizadas análises bacteriológicas e físico-químicas para avaliação da qualidade da matéria prima. De acordo com a legislação vigente, procedeu-se a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva¹⁰, presença de *Salmonella* spp¹¹, contagem de Clostridium Sulfito Redutores a 46 °C¹⁰, avaliação de pH¹², quantificação de Bases Voláteis Totais pelo método de Microdifusão em Placas de Conway¹² e quantificação de histamina pelo método da Espectrofluorimetria¹³.

Na fase de pré-salga, foram coletadas amostras com 24 horas de salga, seguidas de coletas com 72 horas, 7 dias e 10 dias de salga. Nestas amostras, procedeu-se a Contagem de Clostrídio Sulfito Redutor a 46 °C¹⁰, acompanhamento do pH¹² e verificação do percentual de cloretos pelo método de Mörh¹².

Durante a fase de pré-salga, acompanhou-se o comportamento da penetração de sal na musculatura das sardinhas inteiras pelo método de Mörh. Para este procedimento três porções distintas dos espécimes foram analisadas: a mais externa (A), a intermediária (B) e a mais interna (C), sendo possível acompanhar a penetração do sal na musculatura ao longo do período de pré-salga.

Após 10 dias de pré-salga, as amostras foram descabeçadas e evisceradas no laboratório, utilizando-se as mesmas técnicas realizadas na indústria. A salmoura foi filtrada e reutilizada na fase de maturação. Para manutenção da saturação da

salmoura adicionou-se sal (NaCl) e os procedimentos analíticos citados na fase de pré-salga foram realizados após 15 dia de maturação.

Amostras do produto em períodos distintos da fase de maturação na indústria foram encaminhadas aos laboratórios, tomando-se o cuidado de coletar amostras do mesmo lote produzido com a matéria prima enviada anteriormente para análises de qualidade. Foram coletadas amostras aos 30, 60 e 90 dias de maturação.

Com 90 dias de maturação, o produto apresentou as características sensoriais adequadas e específicas do produto pronto. Nestas amostras foram realizados os mesmos procedimentos analíticos da fase de pré-salga, adicionando-se a análise de Bases Voláteis Totais.

Nos produtos prontos referentes ao lote acompanhado foram realizadas as análises em amostras coletadas mensalmente por 7 meses.

Para a análise do comportamento dos dados foi utilizado o programa estatístico Graph Pad Prism® realizando-se análises de regressão ¹⁴.

RESULTADOS

Nas análises realizadas na amostra de sardinha (*S. brasiliensis*) fresca não se observou presença de Clostrídios Sulfito Redutores, *Staphylococcus* coagulase positivo e *Salmonella* spp.

Observando a Tabela 1 é possível verificar o aumento gradual da concentração de Cloreto de sódio (NaCl) nas porções estudadas. Nas primeiras 24 horas de pré-salga, verificou-se diferentes valores percentuais de cloretos entre as porções musculares (externa, intermediária e interna) demonstrando a penetração de sal na musculatura da sardinha.

Com 72 horas de pré-salga os valores entre as porções mais externa (A) e intermediária (B) foram semelhantes (15,41% e 15,39%). Na porção mais interna (C) os valores foram inferiores quando comparado às outras duas porções, porém, com percentual superior a 13%.

Para avaliação da qualidade da matéria prima foram realizadas a quantificação de histamina (0,0 mg.Kg⁻¹), verificação do pH (6,3) e Bases Voláteis Totais (13,9 mg N-BVT/ 100g). A contagem de Clostrídios Sulfito Redutores foi negativa.

Durante o período de pré-salga e maturação não foram isoladas colônias suspeitas de Clostrídios Sulfito Redutores (Tabelas 1 e 2) .

Na fase de maturação os valores de pH apresentaram-se entre 5,36 e 5,73 e os valores percentuais de cloretos variaram entre 15,55 e 17,52%.

Com relação ao produto pronto, durante os sete primeiros meses de validade comercial, não foram isoladas colônias suspeitas de Clostrídios sulfito redutores no produto pronto (Tabela 3). Durante esse período o pH variou entre 5,23 e 5,89 e o percentual de NaCl entre 12,68% e 14,10%. O comportamento dos valores de pH mensurados durante o processamento tecnológico e a validade comercial de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas podem ser observados nos gráficos 1 e 2.

O comportamento dos valores percentuais de cloretos durante o processamento tecnológico de sardinhas anchovadas (*S. brasiliensis*) constam no gráfico 3. Na equação consta a cinética de associação em primeira ordem da interação entre o cloreto de sódio e seus receptores na musculatura da sardinha. Durante cada intervalo de tempo uma fração dos receptores é ocupada, mas à medida que há passagem do tempo, menos receptores estão disponíveis e a curva torna-se uma reta.

DISCUSSÃO

A matéria prima com boa qualidade é fundamental para a obtenção de produto com qualidade. Por esta razão, foram realizadas análises bacteriológicas e físico-químicas em amostras de sardinha fresca para averiguação destes parâmetros.

Na Portaria n° 185 ¹⁵ constam como valor máximo para a concentração de histamina em peixe fresco, 100 ppm (10 mg.100g⁻¹). Para o mesmo produto, no FDA ¹⁶ o padrão mencionado é de 50 ppm (5 mg.100g⁻¹). Na Comunidade Européia, 200 ppm (20 mg.100g⁻¹) de histamina ¹⁸ é o valor limítrofe máximo para produtos da pesca de espécies de peixes associadas ao elevado teor de histidina. Com base nas análises realizadas, a matéria prima obtida para a elaboração da sardinha anchovada apresentou-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação nacional e internacional. Não foi observado presença de histamina na matriz *in natura* e a concentração de Bases Voláteis Totais foi 13,9 mg de N/ 100g da amostra caracterizando um produto de boa qualidade. No RIISPOA ¹⁷ e na Portaria n° 185 ¹⁶ constam que o valor de 30 mg de N/ 100g da amostra como limítrofe para Bases Voláteis Totais em peixe fresco.

Dentre as bactérias patógenas associadas ao consumo de peixes e seus derivados destacam-se: *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* entre outras ¹⁹. Usando como referência a Resolução da Diretoria Colegiada nº12 ⁹ a matéria prima estava bacteriologicamente adequada para entrar na linha de produção das sardinhas anchovadas.

A não observância de isolamento de Clostrídios sulfito redutor pode ser interpretada como a não veiculação de *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* pela matéria prima demonstrando que, se houve rompimento do trato intestinal da sardinha, não gerando contaminação por este microrganismo.

Adicionalmente, o pH da sardinha fresca (6,3) estava dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação ¹⁶. O pescado que possuir pH entre 5,8 e 6,4 é considerado apto pra consumo. Assim, todos os parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade da matéria prima demonstraram que a sardinha fresca estava adequada para a elaboração de sardinhas anchovadas.

Durante a fase de pré-salga, pôde ser acompanhada a penetração do cloreto de sódio na porção muscular das sardinhas. Observou-se que, nas primeiras 24h, a porção externa alcançou valores percentuais de cloretos (3,85 %) superiores ao valor citado por Huss ⁸ como mínimo para a inibição da produção de toxina botulínica (3%). Com 72h de salga, o valor percentual de cloreto de sódio na porção mais interna da musculatura das sardinhas alcançou 13,11%, demonstrando que este período inicial de salga eleva a concentração de cloreto de sódio (NaCl) a níveis considerados eficientes para a inibição da produção de toxina pelo *Clostridium* spp.

A “Food and Agriculture Organization”, citado por Huss et al ⁷, descreve os fatores limitantes para o crescimento de bactérias patogênicas em pescado, incluindo entre eles a concentração entre 3 a 5 % de NaCl como suficiente para limitar a produção de toxinas não proteolíticas e valores de 10 % de NaCl para limitar a produção de toxinas proteolíticas, ambas oriundas do gênero *Clostridium*. Comparando estes dados aos encontrados no presente estudo verifica-se que ao fim da fase de pré-salga (10 dias), os valores de NaCl na porção mais interna chegam a 15,66% sendo este teor eficiente para inibir não somente a produção de toxina como o desenvolvimento de Clostrídios sulfito redutor.

Jay ⁴ relata que mesmo havendo esporos de *C. botulinum* no alimento, as interações entre pH, temperatura e concentrações variadas de NaCl são capazes de bloquear a produção da toxina. As seguintes condições foram estudadas: (1) pH menor que 6,5, 4% de sal e 20°C de temperatura; (2) pH menor que 5,0, 1% de sal e 30°C de temperatura; (3) pH menor que 5,5, 3% de sal e 30°C de temperatura; (4) pH menor que 6,0, 4% de sal e 30°C de temperatura. Em nenhuma delas houve produção de toxina. As condições de elaboração de sardinhas anchovadas do presente estudo foram ainda mais rigorosas quanto à saturação da salmoura (26 °Bé) e temperatura (inferior a 19°C). Assim, as condições para o crescimento e multiplicação de bactérias do gênero *Clostridium* não foram favoráveis mesmo havendo a presença das vísceras na fase de pré-salga. Acredita-se que por esta razão não foram isoladas colônias suspeitas de Clostrídios sulfito redutores em nenhuma das análises realizadas. Conseqüentemente, acredita-se não ter havido a formação de toxinas.

O “Codex Alimentarius” ²⁰ afirma que o processo de salga associado a temperatura controlada é suficiente para prevenir o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*. Porém, somente salmouras estáveis podem ser utilizadas para o processo de maturação e devem ser elaboradas com água potável de boa qualidade e a saturação da salmoura deve ser controlada e avaliada periodicamente e ajustada sempre que necessário.

Nas análises realizadas em amostras do produto pronto pode-se inferir que a concentração mínima de 12% de cloreto de sódio tenha sido o principal fator limitante para o não isolamento de colônias suspeitas de Clostrídios sulfito redutores.

Com estes dados, conclui-se que a presença das vísceras na fase de pré-salga não foi determinante no crescimento e desenvolvimento de Clostrídios sulfito redutores durante o processamento tecnológico e durante a validade comercial do produto pronto.

Adicionalmente, os valores percentuais de cloreto de sódio e a temperatura ambiente controlada foram fatores importantes para o não desenvolvimento e crescimento de Clostrídios sulfito redutor em sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas.

AGRADECIMENTO

À CAPES pelo apoio financeiro. À Indústria e Comércio de Conservas Ubatuba Ltda pela colaboração com o presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oetterer, O processo de fermentação do pescado (Anchovamento). USP/ESALQ. LAN.662. Disponível em: www.esalq.usp.br Acesso em: 01 de outubro de 2005.
2. Pombo, C. R.; Mársico, E. T.; Franco, R. M.; Guimarães, C. F. M.; Cruz, A. M. P.; Pardi, H. P. Salted and fermented fish processes evaluation. *Int. J Food Sci Technol.*(2009) v. 44, p. 2100-2105.
3. Ogawa, M. e Maia, E. L. Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Livraria Varela, 1999.
4. Jay, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
5. Ordonez, J.A. Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005.
6. Franco, B. D. G. M. e Landgraf, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 1996,
7. Huss, H. H.; Alabouch, L.; Gram, L. Assessment and manegement of seafood safety and quality. Roma: FAO, 2004.
8. Huss, H. H. Garantia da Qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO, 1997.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001.
10. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 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] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2003.
11. Pignato, S.; Marino, A. M.; Emanuele, M. C.; Iannota, V.; Caracappa, S.; Giammanco, G. Valuation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonella* in foods. *Appl. Env. Microbiol.* (1995) v. 61, n. 5, p. 1996-1999.

12. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físico-Químicos. Brasília, DF, 1981.
13. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA. 17 ed., 2002.
14. Radushev, D. Prism 5 for windows versão 5. Graphpad Software, Inc. 2007.
15. Brasil. 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.
16. FDA. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance: Scombrotxin (Histamine) Formation (A Chemical Hazard). Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4g.html>. Acessado em: 13 de setembro de 2007, 2007.
17. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto número 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos número 1255 de 25 de julho de 1962, número 1.236 de 02 de setembro de 1994, número 1812 de 08 de fevereiro de 1996 e número 2.224 de 04 de junho de 1997. 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, 1997.
18. CE (Comunidade Européia). Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005. Relativo à critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. J O União Européia. L.338. 2005.
19. Novotny, L.; Dvorska, L.; Lorencova, A.; Beran, V.; Pavlik, I. Fish: a potencial source of bacterial pathogens for human beings. Vet Med República Tcheca. (2004) v. 49, n. 9, p. 343-358.
20. FAO. Code of Practice for Fish and Fisheries Products. Codex Alimentarius. First Edition. Rome: FAO. 2009.

TABELAS

Tabela 1 – Resultados das análises físico-químicas e bacteriológica realizadas em amostras de sardinha (*S. brasiliensis*) fresca e em fase de pré-salga durante 10 dias.

Análise/ Amostra	Clostridio sulfito redutor	pH	% Cloretos		
			A (externo)	B (intermediário)	C (interno)
fresco	SC	6,3	-	-	-
24 horas	SC	-	3,85	2,55	0,70
72 horas	SC	5,83	15,41	15,39	13,11
7 dias	SC	5,87	16,75	15,76	15,76
10 dias	SC	5,63	-	16,55	15,66

SC – Sem Crescimento

Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas e bacteriológica realizadas em amostras de sardinha (*S. brasiliensis*) em fase de maturação.

Análise/Amostra	Clostridio sulfito redutor	pH	Cloretos (%)
15 dias	SC	5,59	16,80
30 dias	SC	5,36	17,52
60 dias	SC	5,73	15,55
90 dias	SC	5,61	17,03

SC – Sem Crescimento

Tabela 3– Resultados das análises físico-químicas e bacteriológica realizadas em amostras de sardinha (*S. brasiliensis*) anchovada durante os sete (7) primeiros meses de validade comercial.

Análise/Amostra	Clostridio sulfito redutor	pH	Cloretos (%)
1º mês	SC	5,84	13,94
2º mês	SC	5,89	12,88
3º mês	SC	5,49	13,18
4º mês	SC	5,23	13,46
5º mês	SC	5,33	14,10
6º mês	SC	5,44	13,66
7º mês	SC	5,40	12,68

SC – Sem Crescimento

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comportamento do pH durante o processamento tecnológico de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas.

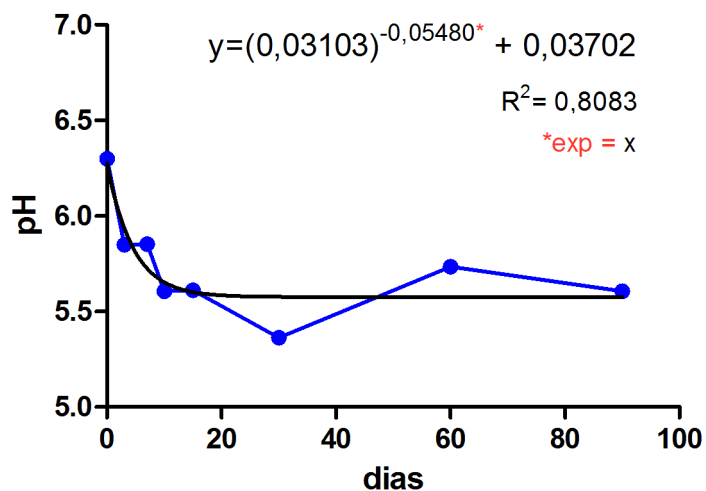


Gráfico 2 – Comportamento do pH durante a validade comercial de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas .

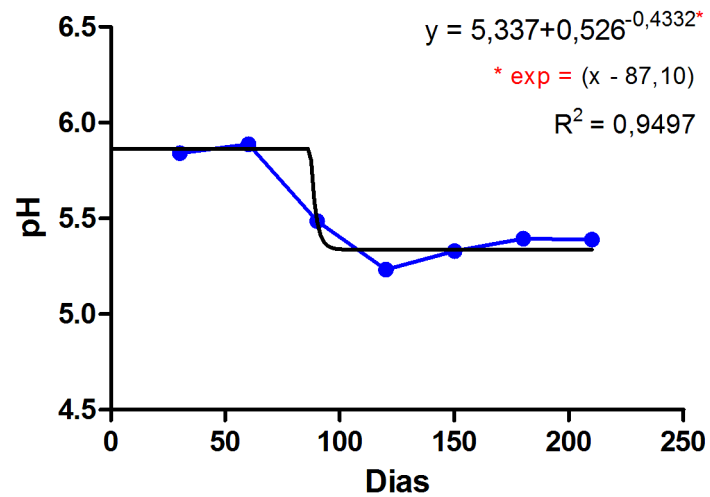
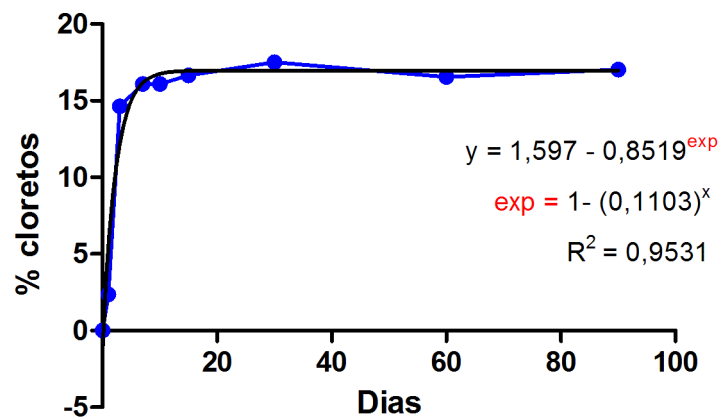


Gráfico 3 – Comportamento do percentual de cloretos durante o processamento tecnológico de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas.



5.3. ARTIGO 3: CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE SARDINHAS (*Sardinella brasiliensis*) ANCHOVADAS.

O artigo a seguir está aceito para publicação na Revista Brasileira de Ciência Veterinária – *Brazilian Journal of Veterinary Science* (Apêndice 3).

Caracterização do processamento tecnológico e validade comercial de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) anchovadas.

Technological process and shelf life characterization of brined and matured sardines (*Sardinella brasiliensis*)

Cecília Riscado Pombo^{4*}; Robson Maia Franco²; Eliane Teixeira Mársico²

Resumo

A sardinha anchovada é uma semiconserva resultante do processo de maturação da sardinha (*Sardinella brasiliensis*) sob a ação de enzimas tissulares e microbianas. O processo ocorre em meio anaeróbico com elevada pressão osmótica causada por altas concentrações de sal. Como a matéria prima pertence à família *Clupeidae* a formação de histamina ao longo do processamento tecnológico pode ocorrer. Objetivou-se acompanhar a qualidade deste produto obtido em condições experimentais a partir de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, ao longo do processamento tecnológico e da validade comercial de sardinhas anchovadas.

⁴ Programa de Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64. Vital Brazil, Niterói – RJ. CEP 24230-340.

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

* A quem enviar a correspondência. E- mail: cissapombo@yahoo.com.br

Foram realizados a determinação de Bases Voláteis Totais (BVT), pH, percentual de cloretos, quantificação de histamina, enumeração de *Enterococcus* spp., pesquisa de *Tetragenococcus* spp., contagem de bactérias halófilas e contagem de Enterobactérias. A produção de BVT foi crescente com valor inicial de 13,90 mgN/100g no início do processamento tecnológico chegando ao máximo de 87,32 mgN/100g durante a validade comercial. Observou-se uma associação de primeira ordem de interação entre o cloreto de sódio (NaCl) e a matriz alimentar, a formação de histamina foi crescente e o pH decaiu. Houve identificação do crescimento do gênero *Pediococcus*. Desta forma, concluiu-se que o crescimento bacteriano foi inibido pelo elevado percentual de cloretos e pelos baixos valores de pH durante o processamento tecnológico, diminuindo a formação de histamina e favorecendo o desenvolvimento de *Pediococcus* spp.

Palavras-Chaves: Sardinha anchovada; *Sardinella brasiliensis*; Histamina; Enterobacteriaceae.

Abstract

Brined and maturated sardines are a semi preserve fisheries product resulted of the action of tissue and microbial enzymes. The process occurs in anaerobic medium with high osmotic pressure caused by high salt concentrations. As the raw material belongs to the family *Clupeidae* the formation of histamine during the technological processing may occur. The aim of the study was to follow physico-chemical and microbiological parameters during the technological process and shelf life of the product. Were carried out the determination of total volatile bases (TVB), pH, percentage of chlorides, quantification of histamine, enumeration of *Enterococcus* spp., *Tetragenococcus* spp. research, count of halophilic bacteria and count of

Enterobacteria. The TVB production initiates with 13.90 mgN/100g, getting to the maximum of 87.32 mgN/100g during shelf life. There was an association of the first order interaction between the sodium chloride (NaCl) and the food matrix, the formation of histamine was increased and the pH undergoes a decay in a single phase. There was identification of the genus *Pediococcus*. Thus, we concluded that bacterial growth was inhibited by the high percentage of chlorine and the pH values during the technological process, decreasing the formation of histamine and favoring the development *Pediococcus* spp.

Keywords: Histamine; Enterobacteriaceae; *Sardinella brasiliensis*; brined sardines.

Introdução

A sardinha anchovada é o produto resultante do processo de cura prolongada da sardinha (*Sardinella brasiliensis*), no qual as enzimas tissulares e microbianas compartilham suas ações sobre os componentes da matriz alimentar (Oetterer, 2011). Estas enzimas atuam sobre os hidratos de carbono e proteínas, conferindo aspecto e aromas especiais ao produto, além de produzirem substâncias bloqueadoras da decomposição do pescado. Este produto é tecnologicamente descrito como uma semi conserva pelo fato de não ser submetido à esterilização comercial ao longo do processamento (Pombo et al., 2009).

A matéria prima utilizada para o processamento tecnológico pode ser veiculadora de microrganismos patogênicos, a maior parte originada da contaminação ambiental (Ogawa e Maia, 1999; Jay, 2006). Além do mais, o manejo inadequado do pescado é outra fonte importante de contaminação, desde o momento da captura, ainda nos barcos pesqueiros, até seu destino final, após passar por inúmeras etapas de processamento e transporte.

A histamina é considerada o maior ponto crítico da indústria de pescado pelo potencial alergênico e pelo fato de ser termoestável (Huss, 1997; Karovičová e Kohajdová, 2005). Adicionalmente, o potencial alergênico causado pela ingestão de pequenas concentrações de histamina pode ser potencializado pela presença de outras aminas biogênicas tais como a putrescina e cadaverina (Lehane e Olley, 2000).

Peixes da família *Scombridae*, como a cavala, cavalinha, atuns, e também da família *Clupeidae*, como a sardinha, são freqüentemente envolvidos em surtos de intoxicação histamínica. Este fato está associado aos elevados níveis de histidina presentes na musculatura destas espécies (Ogawa e Maia, 1999).

O princípio da tecnologia de anchovagem consiste em um processo onde há aumento da pressão osmótica do meio com uso de sal combinado com um sistema em anaerobiose (Oetterer, 2011). A redução da atividade de água controla o crescimento microbiano (Pombo et al., 2009) e a anaerobiose diminui os processos bioquímicos que poderiam provocar a deterioração do pescado (Oetterer, 2011). Em complementação a ação do sal, segundo Sikorski (1990), o cloreto de sódio é um dos componentes mais importantes na maturação, tanto para a determinação do sabor como para que os processos químicos ocorram adequadamente.

As principais bactérias responsáveis pela formação de histamina pertencem à família *Enterobacteriaceae* (Halász et al., 1994; Lehane; Olley, 2000). No entanto, outras bactérias produzem enzimas descarboxilases, podendo ser citadas algumas bactérias ácido lácticas (Suzzi e Gardini, 2003) como o *Enterococcus* spp. (Gardini et al., 2001; Giraffa, 2002) e o *Tetragenococcus muriaticus* (Kuda et al., 2006; Satomi et al., 1997). De acordo com Halász et al. (1994) os gêneros *Escherichia*,

Salmonella, *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacillus* também possuem a capacidade de produzir histidina descarboxilase.

Durante o processo de maturação, os aminoácidos livres no músculo e os produzidos pela decomposição de proteínas podem ser degradados por ação de enzimas descarboxilases e desaminases (Pombo et al., 2009; Oetterer, 2011). Entretanto, alguns fatores parecem interferir na formação de histamina e de outras aminas biogênicas como, a disponibilidade de substrato, o pH e a concentração de sal (Bover-Cid et al., 2001; Gökuğlu, 2003).

Pelo exposto e aliado ao fato de não haver legislação brasileira específica para peixes anchovados, o presente estudo objetivou acompanhar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, ao longo do processamento tecnológico e da validade comercial de sardinhas anchovadas.

Material e Métodos

Para realização deste estudo utilizou-se 250 Kg de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) formando um lote experimental de processamento de sardinha anchovada elaborada por uma indústria nacional com Inspeção Federal.

O processamento tecnológico iniciou-se pela seleção e lavagem da matéria prima. Em seguida, foi realizada a pré-salga das sardinhas inteiras não evisceradas colocando-as em camadas alternadas de sardinha, sal grosso e gelo por um período de sete a dez dias, com formação de salmoura. A temperatura inicial foi de 2°C, aumentando em um limite de 19°C durante a etapa de pré-salga. Posteriormente, as sardinhas foram evisceradas e a salmoura formada na fase de pré-salga foi filtrada para utilização na fase de maturação e complementada com a adição de salmoura saturada fresca. A fase de maturação durou 90 dias (período mínimo). Em etapa

seguinte retirou-se a pele das sardinhas que foram prensadas, filetadas, embaladas, coberta com óleo comestível e lacradas a vácuo.

As amostras foram coletadas nas fases de processamento tecnológico e validade comercial do produto pronto. Ao longo do processamento tecnológico, amostras da matéria prima fresca foram coletadas, em seguida amostras da pré-salga (um, três, sete e dez dias) e, mensalmente, durante a maturação (30, 60 e 90 dias). A cada amostragem, acondicionava-se o produto e em recipientes isotérmicos com gelo e encaminhava-se, imediatamente, via terrestre, para os laboratórios de Controle Microbiológico e Controle Físico-químico de Alimentos.

Ao final do processamento tecnológico do lote experimental alocado na indústria, uma caixa contendo 24 embalagens do produto pronto foi encaminhada para os laboratórios. Ao longo da validade comercial foram coletadas amostras, mensalmente, para a realização das análises físico-químicas e bacteriológicas.

Foram realizados a determinação de Bases Voláteis Totais (BVT), pH e percentual de cloretos (método de Mörh) (Brasil, 1981), quantificação de histamina pelo método de espectrofluorimetria (AOAC, 2002), enumeração de *Enterococcus* spp. (Merck, 2002), pesquisa de *Tetragenococcus* spp. a 7 e 15% de NaCl através de adaptação da metodologia utilizada por Kobayashi et al. (2004), contagem de bactérias halófilas (Brasil, 2003) e contagem de Enterobactérias (Brasil, 2003).

Todas as análises foram realizadas em triplicada e os dados analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism® por análise de regressão (Radushev, 2007).

Resultados e Discussão

A produção de Bases Voláteis Totais (BVT) demonstrou um comportamento crescente dos valores durante a fase de processamento tecnológico, com um valor

de 13,9 mg N-BVT/100g no início do processo, alcançando o valor máximo de 87,32 mg N-BVT/100g no quinto mês da validade comercial, como pode ser observado na figura 1.

Durante o processamento tecnológico de sardinhas anchovadas há ação de enzimas sobre os componentes da matriz alimentar resultando na formação de compostos nitrogenados, como a amônia, a trimetilamina e a dimetilamina (Oetterer, 2003). Pelo fato de não ser submetido a esterilização comercial a ação das enzimas permanece durante a validade comercial do produto pronto.

Pombo et al. (2009), ao compararem diferentes processamentos tecnológicos para a elaboração de sardinhas anchovadas, avaliaram a produção de bases voláteis encontrando valores crescentes durante a fase de fabricação da mesma forma como ocorrido na presente pesquisa durante o mesmo período.

Os resultados referentes a análise de cloretos são demonstrados a partir da equação apresentada na figura 2, onde observa-se uma associação de primeira ordem de interação entre o cloreto de sódio (NaCl) e a matriz alimentar durante o processamento tecnológico. Após 24h de salmoura, as amostras analisadas apresentaram média de 2,37% de NaCl, chegando ao máximo de 17,52% aos 30 dias de maturação. A cada intervalo de tempo ocorrido entre a coleta das amostras, uma fração percentual de NaCl se liga a porção muscular da sardinha (*S. brasiliensis*). Contudo, com o avanço do tempo parece ocorrer saturação da porção muscular fazendo com que a curva do gráfico se torne uma reta.

Na figura 3 pode ser observado o comportamento da concentração de cloreto, envolvendo as etapas de produção e validade comercial, tanto o período de processamento tecnológico quanto a validade comercial. Através da equação apresentada observa-se que os percentuais de cloreto apresentam comportamento

linear seguido de uma fase de decaimento ao longo do período de estudo. A fase linear representa a saturação da porção muscular das sardinhas no período de processamento tecnológico. Durante o processamento tecnológico, o excesso de salmoura absorvido pela porção muscular é retirado na etapa de prensagem o que explica o decaimento da concentração percentual de cloreto.

A alta concentração de cloreto de sódio (NaCl) influencia o metabolismo bacteriano e gera progressiva alteração nas membranas. Concentrações de 3,5 a 5,5% de NaCl podem inibir a formação de histamina (Henry e Koehler, 1986).

A formação de histamina, em mg.Kg^{-1} , foi crescente durante todo o período de processamento, mantendo esse comportamento durante a validade comercial (Figura 4). Pelo fato de ser classificado como semi-conserva, o produto não é submetido a tratamento térmico pelo calor durante o processamento tecnológico o que permite inferir que as enzimas histidina descarboxilases continuem atuando. Pombo et al. (2009) também observaram aumento dos teores de histamina, entretanto esse comportamento foi avaliado somente durante o processamento tecnológico de sardinhas anchovadas.

No entanto, o valor máximo observado nas amostras analisadas (340 mg.Kg^{-1}) foi abaixo do limite de 400 mg.Kg^{-1} estabelecido pela legislação européia (CE, 2005) utilizada como referência no Brasil. Esta legislação estabelece padrão de qualidade, com relação a presença de histamina, para produtos da pesca que tenham sido submetidos a tratamento de maturação enzimática em salmoura fabricados a partir de espécies de peixes que possuem elevados teores de histidina.

Ao longo do estudo, não houve isolamento de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, principal grupo relacionado à formação de histamina (Nahla et al., 2005; Rodtong et al., 2005). Este fato parece estar relacionado aos valores de

histamina encontrados terem sido inferiores ao limite estabelecido pela legislação européia. Entretanto, a literatura faz referência a casos de intoxicação histamínica com níveis de 50 mg.Kg⁻¹ (Lehane e Olley, 2000). A ausência de crescimento bacteriano também ocorreu nos meios de Chromocult®, utilizado para enumeração de *Enterococcus* spp., e no meio de MRS adicionado de 15% de NaCl para averiguação da presença de *Tetragenococcus* spp., sendo estes gêneros bacterianos também relacionados com a formação de histamina (Satomi et al., 1997; Gardini et al., 2001; Giraffa, 2002; Kuda et al., 2006).

Contudo, bactérias halofílicas foram observadas aos 30 dias de maturação e, posteriormente, no primeiro e sétimo mês de validade comercial do produto pronto. A contagem destas colônias foi inferior a 3 UFC/g da amostra, mas a identificação do gênero bacteriano foi realizada através da caracterização morfotintorial e posteriormente por provas bioquímicas. No esfregaço corado pelo método de Gram foi observada a presença de cocos Gram positivos, alguns em tétrades. As provas bioquímicas que se seguiram foram baseadas em Koneman (2005) e no Manual Bergey (1994). Além do crescimento de colônias em meio contendo 7% de NaCl, que demonstram a característica halofilia dos microrganismos isolados, o resultado da catalase foi negativo. Houve crescimento bacteriano em meio BHI 7% de NaCl nas temperaturas de 10°C, 35°C e 45°C, sendo que o crescimento bacteriano a 35°C foi maior, seguido de 45°C e 10°C. Outras provas bioquímicas foram realizadas indicando que o gênero bacteriano isolado foi o *Pediococcus* ssp.. Este mesmo gênero foi identificado no meio MRS contendo 7% de NaCl, aos 30 dias de maturação e no sétimo mês de validade comercial. Pelo fato das amostras analisadas serem compostas por exemplares de sardinhas favorece o isolamento de microrganismos em alguns pontos de coleta e não em outros.

O gênero *Pediococcus* faz parte do grupo de bactérias denominada Bactérias Ácido Láticas (BAL) (Manual Bergey, 1994; Jay, 2006). A ação de enzimas proteolíticas como a tripsina e pepsina (Oetterer, 2011a) degradam proteína gerando metabólitos que são utilizados com fonte de energia para o crescimento de BAL (Cosansu et al., 2010).

Os valores de pH analisados durante o processamento tecnológico são apresentados na figura 5. A equação resultante da análise de regressão destes dados demonstra que o pH decai de forma inversa a concentração de cloretos durante o mesmo período (figura 2). Este fato parece estar relacionado a ionização do NaCl na salmoura. Os valores de pH durante o processamento tecnológico variaram entre 6,3 e 5,36, semelhantes aos encontrados por Kiline et al. (2006) e Pombo et al. (2009) o que valida o fato de que com o processamento, há queda do valor do pH favorecendo o crescimento de BAL, além de promover a inibição da microbiota acompanhante (Franco e Landgraf, 1996).

A figura 6 contém os dados relativos ao pH durante o processamento tecnológico e validade comercial.

O pH do pescado maturado tende a ser acidificado em função da presença de substâncias resultantes da degradação da matriz, podendo estar presentes os aminoácidos histidina, alanina, leucina, fenilalanina, prolina e ácido glutâmico entre outros componentes como ácido indol acético, ácido indol butírico e ácido hidroxifenil pirúvico (Oetterer, 2011).

Relacionando a formação de histamina com os valores de pH, pode-se sugerir que a faixa de pH durante o processamento tecnológico parece ter relação com a formação da histamina. Koessler et al. (1928) citado por Halasz et al. (1994) sugerem que a formação de aminas biogênicas é um mecanismo de defesa das

bactérias a um meio muito ácido. Entretanto, Caccioppoli et al (2006), estudando aminas biogênicas em salames tipo italiano, constatou a inexistência de correlação significativa entre os valores de pH e os teores de aminas biogênicas nesse estudo porém afirma que a velocidade de redução do pH é mais relevante do que o pH final na formação destas aminas.

O pH é um fator importante na formação de aminas biogênicas, pois interfere na descarboxilação dos aminoácidos, que ocorre em maior concentração em meio ácido. O valor ótimo de pH para a formação de AB está entre 2,5 e 6,5, pois nesta faixa a bactéria é estimulada a produzir mais descarboxilases como forma de defesa ao meio (Halasz et al., 1994).

Entretanto, Gardini et al. (2001) estudou os efeitos do pH, temperatura e concentração de NaCl na cinética de crescimento, atividade proteolítica e produção de aminas biogênicas pelo *Enterococcus faecalis*, e apresentou resultados que demonstraram que a produção de aminas biogênicas foi maior com o aumento do pH (5,4 – 7,0) e diminuição do percentual de NaCl.

Zaman et al (2009), em revisão sobre a produção de aminas biogênicas em molhos a base de pescado, concluíram que o pH na faixa de 5,0 a 7,1, a temperatura (ótimo de 37 °C) e a concentração de sal (5 a 20%) são fatores que interferem no crescimento bacteriano e, conseqüentemente, na produção de aminas biogênicas.

Conclusão

O crescimento bacteriano dos principais gêneros relacionados à formação de histamina foi inibido pelo elevado percentual de cloretos e baixos valores de pH ao longo do processamento tecnológico e validade comercial de sardinhas (S.

brasiliensis) anchovadas. Este controle permitiu que a formação de histamina fosse inferior ao limite preconizado pela legislação européia.

Os valores de pH durante o processamento tecnológico e validade comercial inibiram o crescimento dos gêneros bacterianos estudados porém favoreceram o desenvolvimento de *Pediococcus* spp.

A produção de Bases Voláteis Totais (BVT) foi crescente até o quinto mês de validade comercial seguido de decaimento das bases em função da ação enzimática continua sobre o produto pronto por não haver tratamento térmico pelo calor durante o processamento tecnológico.

Em função dos resultados obtidos é importante que seja feito um alerta para os consumidores deste produto sobre a intoxicação histamínica por pessoas com maior sensibilidade alérgica.

Agradecimento

A CAPES pelo apoio financeiro. À Indústria e Comércio de Conservas Ubatuba Ltda. pela colaboração com o presente estudo.

Referências

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

BOVER-CID, S.; HUGAS, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. International Journal of Food Microbiology. v. 66, p.185-189, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físico-Químicos. Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 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.

CACCIOPPOLI, J.; CUSTÓDIO, F.B.; VIEIRA, S.M.; COELHO, J. V.; GLORIA, M.B.A. Aminas bioativas e característica físico-químicas de salame tipo italiano. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.58, n.4, p.648-657, 2006.

CE (Comunidade Europeia). Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005. Relativo à critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. J O União Europeia. L.338. 2005.

COSANSU, S.; MOL, S. ; ALAKAVUK, D. U. Effects of *Pediococcus* culture on the sensory properties and ripening of anchovy marinade at 4°C and 16 ° C. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. V.10, p. 373 – 380, 2010.

FRANCO, B. D. G. M. E LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CARUSO, M. C.; GALGANO, F.; CRUDELE, M.A.; FAVATI, F.; GUERZONI, M.E.; SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl

concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology, n. 64, p.105–117. 2001.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. FEMS Microbiology. v 26, p.163-171. 2002.

GÖKUĞLU, N. Changes in biogenic amines during maturation of sardine (*Sardina pilchardus*) marinade. Fisheries Science. v. 69. p. 823-829, 2003.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON - SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends of Food Science and Technology, 5, 42-48. 1994

HENRY, K. D.; KOEHLER, P. E. Effects of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation. Journal of Food Protection. v.49. p.423-427, 1986.

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

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

KILINE, B.; CAKLI, S.; TOLASA, S.; DINCER, T. Chemical, microbiological and sensory changes associated with fish sauce processing. European Food Research Technology, n. 222, p. 604-613, 2006.

KOBAYASHI, T.; KAJIWARA, M.; WAHYUNI, M.; HAMADA-SATO, N.; IMADA, C.; WATANABE, E. Effecte of culture conditions on latic acid production of *Tetragenococcus* species. *Journal of Applied Microbilology*. n. 96, p 1215 -1221, 2004.

KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amine in food. *Chemical Papers*. v. 59, n.1, p 70-79. 2005.

KOESSELER, K. K.; HANKE, M. T.; SHEPPARD, M. S.. Production of histamine, tyramine, brochospastic and arteriospastic substance in blood broth by pure culture of microorganisms. *Journal of Infectious Diseases*. v.3, p. 363-377, 1928.

KONEMAN, E. W. Parte II: Streptococci, Enterococci, and the “Streptococcus – like” Bacteria. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins: Estados Unidos, p. 704 – 765. 2005.

KUDA, T.; MIHARA, T.; YANO, T. Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. *Food Control*. v. 18, Jun. 2007.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisted. *International Journal of Food Microbiology*. v. 58, p.1-37. 2000.

MANUAL BERGEY. Gram-positive cocci. In: *Bergey’s Manual os determinative bacteriology*. 9 ed. Balltmore: Editora Willians e Wilkins. Cap. 17. p. 527-558. 1994.

MERCK. Microbiology Manual. Berlin, Germany. 407 p. 2002.

NAHLA, T. K.; HASSEN, EL- S. M. F. Histamine and histamine producing bacteria in some local and importes fish and theis public Elath significance. Research Journal of Agriculture and Biological Science. v. 1, n. 4, p. 329 – 336. 2005.

OETTERER, M.; PERUJO, S. D.; GALLO, C. R.; ARRUDA, L. F.; BORGUESI, R.; CRUZ, A. M. Monitoring the sardine (*Sardinella brasiliensis*). Fermentation process to obtain anchovies. Ciencia Agrícola, v. 60, n.3, p. 511-517, Jul/Set, 2003.

OETTERER, M. O processo de fermentação do pescado (Anchovamento). USP/ ESALQ. LAN.662. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacaodopescado.pdf>

Acessado em: 24 de novembro de 2011.

OETTERER, M. Tecnologia do Pescado. USP/ ESALQ. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Tecnologiadopescado.pdf> Acessado em: 28 de novembro de 2011, 2011a.

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

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

RADUSHEV, D. Prism 5 for windows versão 5. Graphpad Software, Inc. 2007.

RODTONG, S.; NAWONG, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Microbiology. v.22, n. 5, p. 475 – 482. 2005.

SATOMI, MASATAKA; KIMURA, BON; MIZOI, MICHICO; SATO, TSUNEO; FUJII, TATEO. *Tetragenococcus muriaticus* sp. Nov., a New Moderately Halophilic Lactic Acid Bacterium Isolated from Fermented liquid Liver Sauce. International Journal of Systematic Bacteriology, Jul., p. 832-836. 1997.

SIKORSKI, Z. E. Tecnologia de los productos del mar: recursos, composicion nutritiva y conservacion. Editora Acribia: Zaragoza,1990. 330 p.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. International Journal of Food Microbiology, v. 88, p. 41-54. 2003.

ZAMAN, MUHAMMAD ZUKHRUFUZ; ABDULAMIR, A.S.; BAKAR, FATIMAH ABU. A review: Microbiological, Physicochemical and Health Impact of High Levels of Biogenic Amines in Fish Sauce. American Journal of Applied Sciences. v. 6, n. 6, p. 1199-1211, 2009.

Ilustrações

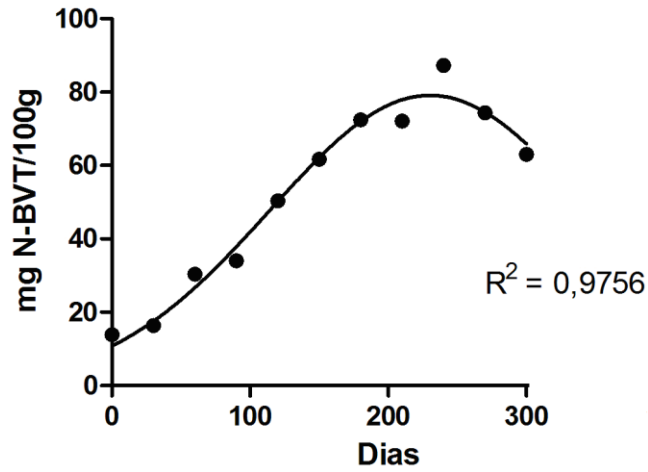


Figura 1 Comportamento da concentração de Bases Voláteis Totais (BVT), em N-BVT/100g da amostra, de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante processamento tecnológico e parte da validade comercial do produto pronto.

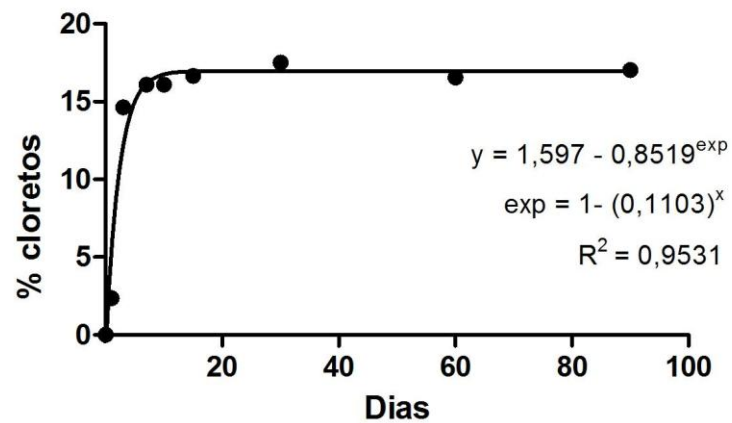


Figura 2: Regressão linear do percentual de cloretos de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante processamento tecnológico.

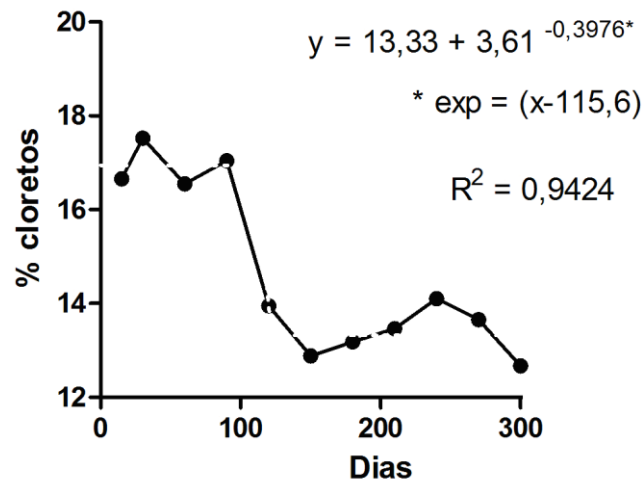


Figura 3 – Representação gráfica do percentual de cloretos durante as fases de produção e validade comercial de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas.

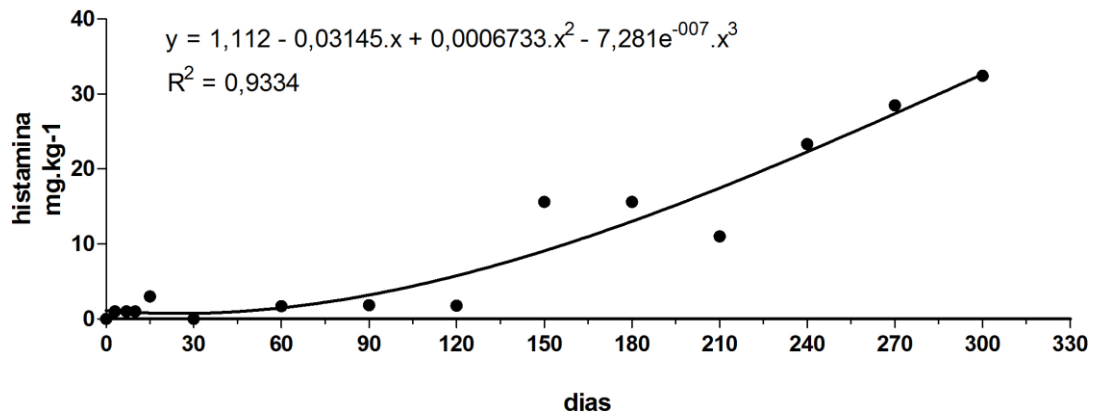


Figura 4 – Teor e Histamina, em mg.Kg^{-1} , durante processamento tecnológico e validade comercial de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas.

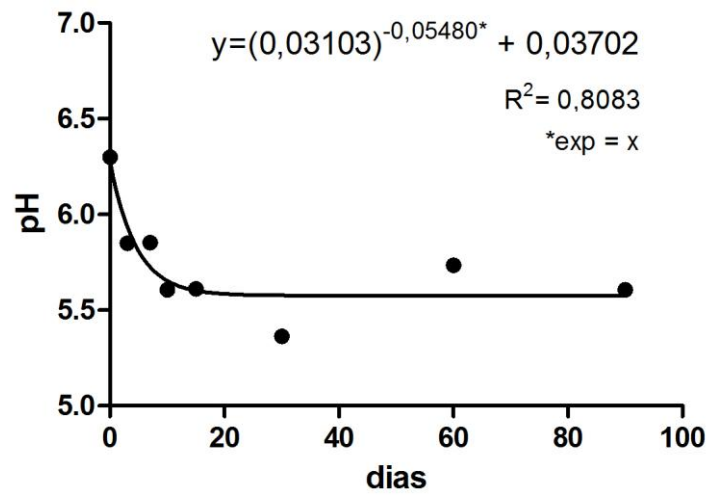


Figura 5 - Comportamento do pH de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante processamento tecnológico.

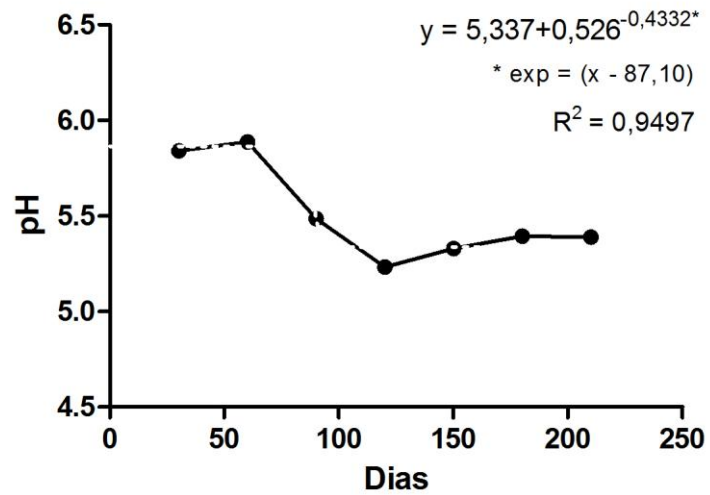


Figura 6 - Comportamento do pH de sardinhas (*S. brasiliensis*) anchovadas durante a validade comercial do produto pronto.

5.4. ARTIGO 4: DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM SARDINHAS ANCHOVADAS UTILIZANDO CLAE E DERIVATIZAÇÃO COM 6-AMINOQUINOLILN-HIDROXISUCCINIMIDIL CARBAMATO (AQC).

O artigo a seguir está em fase de elaboração para submissão à Revista Química Nova.

DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM SARDINHAS ANCHOVADAS UTILIZANDO CLAE E DERIVATIZAÇÃO COM 6-AMINOQUINOLILN- HIDROXISUCCINIMIDIL CARBAMATO (AQC).

Cecília Riscado Pombo⁵, Eliane Teixeira Mársico: Laboratório de Controle Físico-químico de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense Rua Vital Brazil Filho, 64. Vital Brazil, Niterói – RJ. CEP 24230-340.

Daniel Filisberto Schulz, Sidney Pacheco, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy: EMBRAPA – Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas, 29501. Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ. CEP 23020-470

⁵ cissapombo@yahoo.com.br

**DETERMINAÇÃO DE HISTAMINA EM SARDINHAS ANCHOVADAS UTILIZANDO
CLAE E DERIVATIZAÇÃO COM 6-AMINOQUINOLILN- HIDROXISUCCINIMIDIL
CARBAMATO (AQC).**

ABSTRACT

Matured foods, such as brined and matured sardines, may have high concentrations of histamine and other Biogenic Amines (BA) as consequence of enzymes action over the food during the technological processes. A HPLC method based on extraction of BAs with methanol and derivatizing with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) was used. Results demonstrated that the method is capable to separate, identify and quantify histamine, putrescine and cadaverine. This method generates few amounts of residues saving time and resources. Moreover, it allows making more analysis.

KEYWORDS: Biogenic Amines; AQC; HPLC

INTRODUÇÃO

As aminas biogênicas se formam nos alimentos pela ação de enzimas microbianas sobre aminoácidos precursores ou, nos seres vivos, como consequência dos processos metabólicos celulares normais.¹ São compostos orgânicos nitrogenados de caráter básico presentes em animais, plantas e microrganismos.²

A histamina é formada pela descarboxilação da histidina, aminoácido essencial para animais em crescimento, que está presente em concentrações mediana a alta em peixes pelágicos.³ Peixes da família *Scombridae*, como a cavala, cavalinha, atuns, e também da família *Clupeidae*, como a sardinha, estão relacionados a intoxicações histamínicas por terem elevadas concentrações de histidina livre na porção muscular.⁴

Em peixe fresco a presença desta amina biogênica não deve ultrapassar o limite de 100mg.Kg^{-1} ⁵, pois a ingestão dessa substância, em concentrações que variam com a sensibilidade individual, pode causar envenenamento escombróide, cujos principais sintomas são: dores abdominais, vômitos, diarreia, dor de cabeça, eritema, urticária e hipotensão, esta última podendo levar a morte, principalmente em idosos, crianças ou cardiopatas.^{6 7 8 9}

Alimentos fermentados como queijos, vinhos, salames e chucrutes¹⁰ e pescado maturado, como as sardinhas anchovadas¹¹, são alguns dos alimentos em que foram observadas concentrações elevadas de histamina.

Os alimentos maturados estão propensos a apresentarem maiores teores de histamina. Durante o processamento tecnológico, enzimas atuam sobre a matriz alimentar produzindo novas substâncias, inclusive aminas biogênicas as quais conferem o sabor e o aroma característicos do produto pronto.^{12 11}

A ação da histamina no organismo humano é potencializada pela ingestão concomitante de outras aminas biogênicas (AB) produzidas durante a maturação, como a putrescina e a cadaverina, que promovem uma inibição competitiva de enzimas pertencentes ao sistema de detoxificação da histamina.¹³

No Brasil, a histamina vem sendo analisada por técnicas semi-quantitativas, como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD)¹⁴, e quantitativas, como a Espectrofluorimetria¹⁵ e CLAE.¹⁶

O método semi-quantitativo geralmente é utilizado para o acompanhamento de processos de produção ou triagem de controle de qualidade. Através da CCD, é possível verificar a presença de histamina, putrescina e cadaverina de forma rápida. O método é baseado na comparação visual de manchas avermelhadas formadas pela presença de AB no alimento que são separadas por adsorção em placa de sílica e são reveladas por solução de Ninhidrina 3% sendo, posteriormente comparadas aos padrões das ABs estudadas.¹⁴

O método da Espectrofluorimetria¹⁵ é mais elaborado. Demanda mais tempo, maior quantidade de reagente e maior atenção na realização da análise. Além do mais, este método quantifica apenas a histamina por possuir uma etapa de purificação do extrato em resina de troca iônica. Desta forma, a histamina é selecionada e complexada com o agente derivatizante o-ftalaldeído. Todo o processo resulta numa análise demorada e com produtos de derivatização pouco estáveis, além de não quantificar outras aminas biogênicas potencializadoras da ação intoxicante da histamina.⁸

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) como método oficial para análise de aminas biogênicas em alimentos é recente no Brasil.¹⁶ Esta técnica permitir a quantificação de diferentes aminas biogênicas de um mesmo extrato,

concomitantemente, poupando tempo e permitindo a avaliação mais abrangente da qualidade do alimento analisado.

Diante dos fatos, a proposta deste trabalho foi utilizar uma metodologia para a análise de histamina, putrescina e cadaverina em sardinhas anchovadas por CLAE fazendo uso do agente derivatizante o 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC).¹⁷

O AQC é um carbamato heterocíclico que foi desenvolvido especialmente para a análise de aminoácidos. Este reagente converte aminoácidos primários e secundários em substâncias derivatizadas fluorescentes. É de fácil manipulação, reage rapidamente e produz adutos altamente estáveis.¹⁸

PARTE EXPERIMENTAL

As amostras utilizadas para a realização deste estudo foram adquiridas do processamento tecnológico de um lote experimental (250 Kg) de sardinhas anchovadas produzidas em indústria nacional com Inspeção Federal.

Foram coletadas amostras da matéria prima (sardinha frasca – *Sardinella brasiliensis*) e em diferentes pontos do período de pré-salga (três e sete dias) e do período de maturação (15, 60 e 90 dias). Do lote experimental foram analisadas amostras do produto pronto com um, dois e quatro meses de validade comercial.

Após coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração em embalagem isotérmica e encaminhadas para o Laboratório de Controle Físico-químico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde as amostras foram pesadas, identificadas, congeladas e encaminhadas para o laboratório de Cromatografia Líquida da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, em Guaratiba – RJ, para a realização do procedimento analítico.

A análise estatística dos teores de histamina encontrados nas amostras de sardinha anchovada foi feita através da análise regressão utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism®.¹⁹

Preparo das amostras

A extração foi realizada de acordo com o método da AOAC¹⁵ que consiste em homogeneizar 10g de amostra com 100 mL de metanol (Tedia®, grau HPLC) e submeter o extrato a banho-maria a 60°C, por 15 minutos. Em seguida o extrato foi filtrado (Whatman® n° 1) e transferido para balão de 100 mL, corrigindo o volume com metanol quando necessário. Uma segunda filtração foi procedida em filtro Millex® 0,22µM.

Preparo dos padrões

Para as soluções padrão foram utilizados o dicloridrato de histamina (pureza > 99,0%), dicloridrato de putrescina (pureza > 98,0%) e dicloridrato de cadaverina (pureza > 98,0%) da Sigma®. Foram preparadas soluções estoque 3,0 mM de cada um dos padrões em solução 20 mM de HCl. A concentração das soluções padrão injetadas foram 0,3 mM.

Procedimento de derivatização

Para promover a reação de derivatização, uma alíquota de 10µL do extrato duplamente filtrado foi transferida para um “vial” e colocado em dessecador acoplado ao vácuo. As pedras de sílica do dessecador foram aquecidas previamente em estufa a 105°C por 1 hora. O aquecimento das pedras de sílica associado ao vácuo promove a volatilização do metanol e obtenção do extrato seco em 1 hora.

O extrato seco foi ressuscendido por 20µL de solução de Ácido Clorídrico (HCl) 20mM seguido da adição de 60 µL de tampão borato (pH 8,5). Este último eleva o pH para uma faixa alcalina para que a reação de derivatização ocorra. O

AQC (20µL) foi colocado no “vial” sendo homogeneizado em vórtex por 15 segundos. A homogeneização deve ser iniciada o mais rápido possível para que a reação do AQC com a histamina ocorra efetivamente. O excesso de AQC presente na reação se degrada em meio aquoso produzindo o 6-aminoquinoline (AMQ), o N-hidroxysuccinimide (NHS) e dióxido de carbono (CO₂). Assim a degradação do excesso de AQC ocorre como demonstra a reação a seguir: $AQC + H_2O \rightarrow AMQ + NHS + CO_2$.¹⁸

A solução derivatizada foi transferida para um segundo “vial” com redutor de volume e colocada no cromatógrafo para análise.

Instrumentação e condições cromatográficas

Para a análise das alíquotas derivatizadas utilizou-se o cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695, com injetor automático, com filtro pré-coluna 0,5 µm Krud Katchen Ultra-In-Line®, coluna Phenomenex® 50 X 2,10 mm modelo Kinetex C18, 2,6µm, 100Å, em forno a 40°C e detector de fluorescência Waters® modelo 2475. O comprimento de onda de excitação foi de 254 nm e da emissão de 395 nm. Na tabela 1 observa-se o protocolo de gradiente utilizado na corrida cromatográfica. O equipamento permaneceu conectado a um computador e foi controlado pelo software Empower® da Waters®.

Reagentes e soluções padrão analíticas

A água ultra pura utilizada nos experimentos foi recém coletada do equipamento Milli-Q®, apresentando resistividade mínima de 18MΩ/cm e carbono orgânico total (TOC) máximo de 7 ppb.

A fase móvel foi composta por duas soluções: (A) Acetonitrila - Tedia® e (B) Tampão Acetato - Waters®, pH 5,5. O preparo da solução A foi feito através da

diluição de 50 mL do AccQ.Tag Eluente - Waters® concentrado para análise de aminoácidos em 500 mL de água Milli-Q®.

Os componentes para a preparação da solução derivatizante fazem parte do kit para aminoácidos da Waters® AccQ•Tag® e forma preparados de acordo com o estabelecido pelo fabricante.¹⁸

Tabela 1 – Protocolo de gradiente utilizado para separação de aminas biogênicas através de injeções de 1 µL com fluxo de 0,4 mL.min⁻¹.

Composição da fase móvel (%)		
Tempo (min)	Acetonitrila	Tampão Acetato
0	50	50
2	4	96
3,5	6	94
8	6	94
8,5	50	50

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em primeira etapa, as soluções padrão de histamina, putrescina e cadaverina foram derivatizadas e injetadas separadamente. Em segunda etapa, foi preparada uma mistura dos padrões das três aminas biogênicas estudadas. Na figura 1, pode-se observar que a separação dos padrões utilizados na mistura foi eficiente e os picos de histamina, putrescina e cadaverina puderam ser identificados.

Nas análises realizadas em amostras de sardinha fresca não foi constatada a presença de aminas biogênicas (histamina, putrescina e cadaverina) demonstrando que a matéria prima selecionada para a elaboração das sardinhas anchovadas estavam dentro do parâmetro estabelecido pela legislação vigente.^{5 16} Desta mesma partida de matéria prima, uma amostra da sardinha fresca foi mantida em condições

inadequadas de temperatura para que houvesse a formação de aminas biogênicas sendo posteriormente submetida ao mesmo método de análise (Figura 2).

Na figura 3 observa-se a curva padrão de histamina onde foi feita uma correlação entre a concentração de histamina e as áreas obtidas nos cromatogramas de cada solução padrão injetada (10, 100, 200, 300 e 400 mg.Kg⁻¹). Seguindo com as análises das amostras de sardinhas anchovadas, as alíquotas analisadas resultaram na equação polinomial de terceira ordem (figura 4) ($y = 0,9878 + 0,0809x - 0,0012x^2 + 4,987 \cdot 10^{-6}x^3$) relacionando a formação de histamina ao longo do processamento tecnológico e validade comercial do produto pronto.

O aumento dos teores de histamina nas amostras analisadas ocorre em função da ausência de esterilização comercial das sardinhas anchovadas ao longo do processo tecnológico, o que permite que as enzimas bacterianas e tissulares presentes durante a maturação do produto continuem agindo sobre a matriz alimentar. O mesmo comportamento dos teores de histamina foi demonstrado por Pombo et al.¹¹

Schulz²⁰ utilizou o AQC e coluna AccQ.Tag® Waters® para aminoácido para análise de histamina em atum obtendo um tempo de corrida médio de 22,3 minutos. Os resultados do presente estudo demonstram que a utilização da coluna Kinetex®, propiciou o desenvolvimento de um método com tempo de corrida cromatográfica de 10 minutos, com uma boa separação entre os picos dos analitos.

A diminuição do tamanho da partícula da coluna de ultra performance utilizada, além de aumentar a área da superfície, permite que haja um equilíbrio da superfície total mais rapidamente.²¹ A utilização deste tipo de coluna permite a utilização de fluxo baixo, assim as análises são mais rápidas e utilizam menor

volume de fase móvel gerando economia de tempo, material, equipamentos e reagentes.

O método estabelecido como oficial para a análise de histamina e outras aminas biogênicas pode ser encontrado na Instrução Normativa nº25 do Ministério da Agricultura.¹⁶ Ao comparar os tempos de corrida cromatográfica de ambos os métodos, observa-se que o método proposto reduz o tempo de análise de 30 minutos para 10 minutos.

Adicionalmente, é importante ressaltar que na metodologia proposta a etapa de extração é simples ocorrendo em uma única etapa de homogeneização da amostra com metanol e posterior aquecimento¹⁵ e dupla filtração.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que o método utilizado é capaz de separar, identificar e quantificar a histamina, a putrescina e a cadaverina presentes em amostras de sardinha anchovada utilizando-se de uma extração e derivatização simples. A análise é rápida e gera poucos resíduos quando comparada aos métodos tradicionais, o que permite economia de tempo e recursos, além de uma maior capacidade de análises.

AGRADECIMENTO

À CAPES pelo apoio financeiro. À EMBRAPA Agroindústria de Alimentos pela infra-estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sanches – Cascado, S.,P. *Tese de doutorado*. Faculdade de Farmácia, Universidade de Barcelona, Barcelona, 2005.

2. Brink, B.; Damirik, C.; Joosten, H. M. L. J.; Huis In't Veld, J. H. J. *Int. J. Food Microbiol.* **1990**, 11.
3. Contreras – Guzmán, E. S. *Bioquímica de pescado e derivados*. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
4. Ogawa, M.; Maia, E. L. *Manual de Pesca: ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430p. v. 1.
5. Brasil. 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.
6. Kuhn, D. M.; Lovemberg, W. *Lancet.* **1982**, 1, 1879.
7. Antila, P. *Kieler Milchwirtsch, Forschungsber.* **1983**, 35, 373-375.
8. Taylor, S. L.; Stratton, J. E.; Nordlee, J. A. *Clinical Toxicology.* **1989**, 62, 225-240.
9. Tsai, Y. H.; Lin, C. Y.; Chien, L. T.; Lee, T. M.; Wei, C.; Hwang, D.F. *Food Chemistry* **2006**. 98, 64-70.
10. Rossano, R.; Mastrangelo, L.; Ungaro, N.; Riccio, P. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 830, 1.

11. Pombo, C.R.; Mársico, E.T.; Franco, R. M.; Guimarães, C. F. M.; Cruz, A. M. P.; Pardi, H. S. *International Journal of Food Science and Technology*. **2009**. 44, 2100 – 2105.
12. [www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacao do pescado.pdf](http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacao_do_pescado.pdf), acessada em dezembro de 2011.
13. Lehane, L.; Olley, J. *International Journal of Food Microbiology*. **2000**. 58, 1-37.
14. Schutz, D. E.; Chang, G. W.; Bjeldanes, L. F. *Chemical indexes*.**1976**.
15. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA., 2002.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 25 de 02 de junho de 2011 aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescado e seus Derivados*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 03 de junho de 2011, Brasília, DF, 2011.
17. Pombo, C.R.; Mársico, E.T.; Schulz, D.F.; Godoy, R.L.O.; Pacheco, S. *Resumos do 3º Simpósio de Segurança Alimentar*. Florianópolis, Santa Catarina. 2010.
18. Millipore Corporation. *Waters AccQ.Tag Chemistry Package: Instruction Manual*. Manual Number WAT052874. Massachusetts: USA, 1993.

19. Radushev, D. *Prism 5 for windows versão 5*. Graphpad Software, Inc.,USA, 2007.

20. Schulz, D. F. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

21. Dadáková, E., Křížek, M., Pelikánová, T. *Food Chem.* **2009**, 116.

Figura 1 – Cromatograma da mistura de soluções padrão de Putrescina, Histamina e Cadaverina.

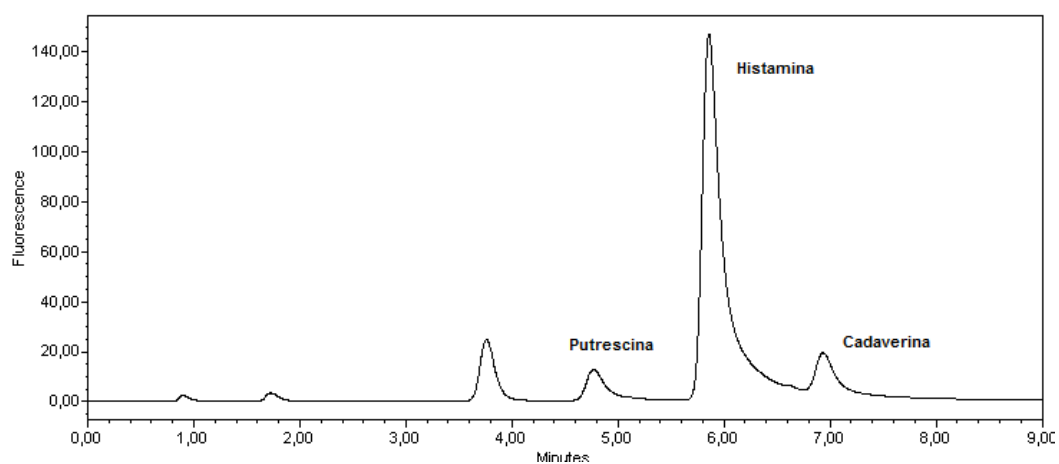


Figura 2 - Cromatograma de análise de sardinha fresca mantida em condições inadequadas de armazenamento (controle positivo).

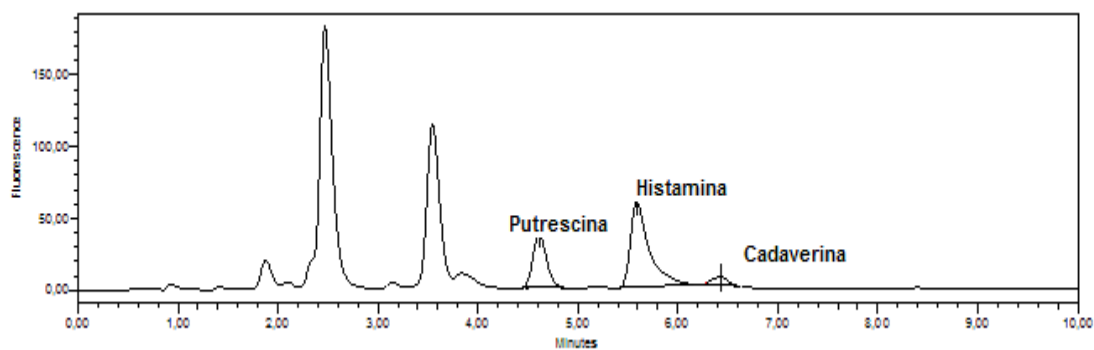


Figura 3 – Gráfico contendo a curva padrão da quantificação de histamina.

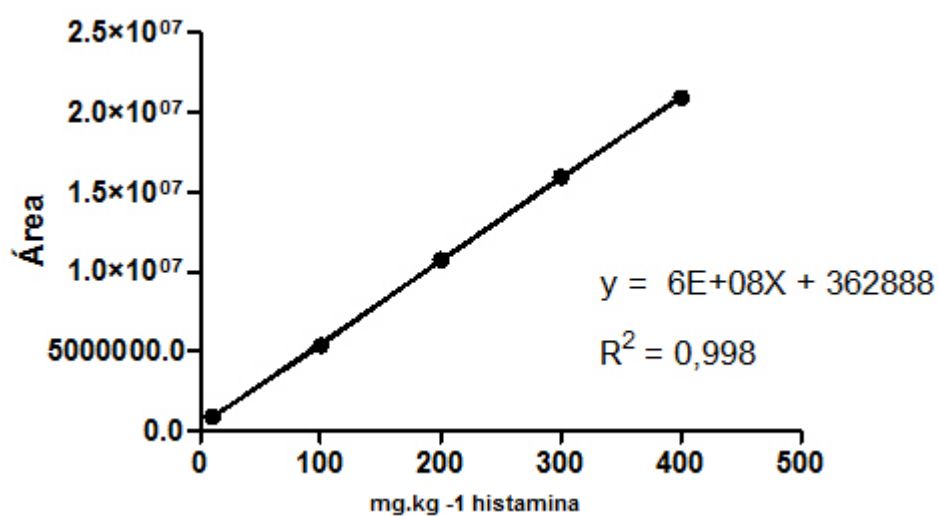
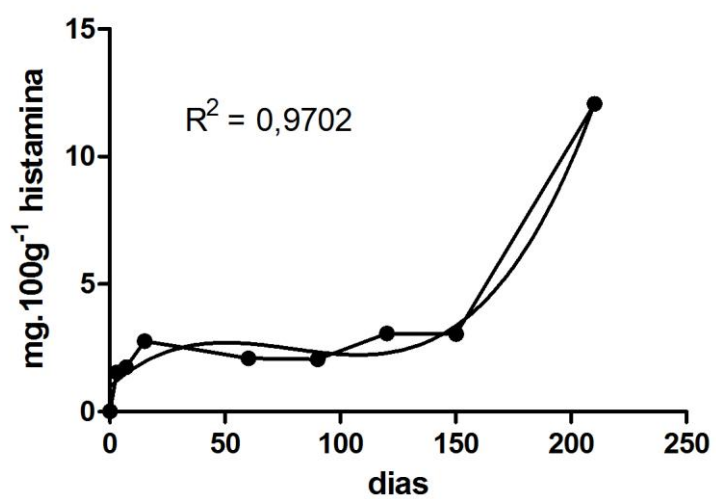


Figura 4 – Gráfico contendo a curva da quantificação de histamina das amostras de sardinha anchovada ao longo do processamento Tecnológico e início da validade comercial do produto pronto.



6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Com os resultados obtidos concluiu-se que fatores tecnológicos tais como a alta concentração de sal e baixa atividade de água controlam e diminuem o crescimento e multiplicação de microrganismos. No entanto, a utilização de sistemas de controle da matéria prima, do processo de produção e de higiene dos funcionários, equipamentos e ambiente são fundamentais para a obtenção de sardinhas anchovadas com qualidade.

Apesar do processamento tecnológico utilizado para a produção de sardinhas anchovadas não favorecer a multiplicação bacteriana dos gêneros relacionados a formação de histamina, a liberação de enzimas bacterianas e teciduais na fase inicial de processamento permite que haja formação de aminas biogênicas durante o processamento tecnológico e validade comercial do produto pronto. Por não haver esterilização comercial ao longo do processamento, estas enzimas continuam em atividade.

Atualmente, o pescado anchovado comercializado e/ou fabricado no Brasil, tem seu controle de qualidade baseado em legislações generalistas de produtos de origem animal. Entretanto, a elaboração de Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Pescado Anchovado mostra-se importante para a inclusão de parâmetros não previstos pelas legislações disponíveis objetivando um melhor controle da qualidade e segurança alimentar do produto nacional e importado adquirido pelo consumidor.

Acredita-se que mais estudos sobre o tema sejam necessários para aprofundar o conhecimento sobre a ação enzimática na fase de maturação do produto e os microrganismos envolvidos no processamento a fim de entender melhor como controlar a qualidade dos pescados anchovados.

Sugere-se um estudo das reações bioquímica e enzimáticas que ocorre na fase de pré-salga do processamento tecnológico proposto como mais eficiente na

obtenção de sardinhas anchovadas com qualidade. Acredita-se que nesta etapa há enzimas que poderiam ser identificadas como bloqueadoras do processo de degradação do pescado e enzimas de degradação de aminas biogênicas.

Sugere-se, ainda, que sejam realizados experimentos do processamento tecnológico de sardinhas anchovadas utilizando aditivos conservantes, antioxidantes e acidulantes.

7 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/appcc.htm>> Acessado em 18 de janeiro de 2012.

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

AQUINO NETO, FRANCISCO RADLER DE. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.

BAROSS, J.A. Halophilic and osmiphilic Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p. Cap. 17, p.187 – 193.

BEIRÃO, L. M. *Parâmetros de avaliação da fermentação de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) no processo de anchovagem*. São Paulo, 1976. 101 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1976

BORMAN, E. K.; STUART, C.A.; WHEELER, K.M. Taxonomy of the family Enterobacteriaceae. 1944. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373980/pdf/jbacter00697-0086.pdf> Acessado em: 14 de janeiro de 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto número 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos número 1255 de 25 de julho de 1962, número 1.236 de 02 de setembro de 1994, número 1812 de 08 de fevereiro de 1996 e número 2.224 de 04 de junho de 1997. Aprova o novo Regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1952.

_____, 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 Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físico-Químicos. LANARA. Brasília, DF, 1981.

_____, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 52. Aprova o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 29 de dezembro de 2000.

_____, 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. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 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. *Instrução Normativa nº 25 de 02 de junho de 2011 aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescado e seus Derivados*. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 03 de junho de 2011, Brasília, DF, 2011.

C.E. (Comunidade Européia). Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005. Relativo à critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Européia*. L.338.

COLLINS, M.D.; WILLIAMS, A.M.; WALLBANKS, S. The phylogeny of aerococcus and Pediococcus as determined by 16S r RNA sequences analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiology Lett.* n 70, p.255-262. 1990.

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

DISSARAPHONG, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. *Bioresource Technology*. Disponível em: <www.sciencedirect.com.> Acessado em: 24 de setembro de 2007.

DOMING, K.J.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.. 1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*. v. 88, p. 147-164, 2003.

DULFOS, GUILLAUME; DERVIN, CATHERINE; MALLE, PIERRE; BOUQUELET,STEPHANE. Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *Journal of AOAC International*. v. 82, n. 6, p. 1357-1363, 1999.

ENNAHAR, S.; CAI, Y. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.55, p.589-592. 2005.

FDA. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance: *Scombrototoxin (Histamine) Formation (A Chemical Hazard)*. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4g.html>> Acessado em: 13 de setembro de 2007, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora 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, dez, 2003.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CARUSO, M. C.; GALGANO, F.; CRUDELE, M.A.; FAVATI, F.; GUERZONI, M.E.; SUZZI, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. n. 64, p. 105 –117, 2001.

GELLI, D. S.; JAKABI, M; SOUZA, A. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982 -2001). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. V. 44, n. 6, p. 321 – 324. 2002,

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

GIROTO, JOSÉ MAURO; MASSON, MARIA LÚCIA; HARACEMIV, SÔNIA MARIA CHAVES. Aminas biogênicas em embutido cárneos e em outros alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.13, n.1,p.1-10, 2010.

GOULD, G. W.; JONES, M. V. *Combination of synergic effects*. Elsevier Applied Science: New York, 1989. 401 p.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends of Food Science and Technology*. v.5. p. 42-48, 1994.

HAGLER, L. C. M.; HAGLER, A. N. Microbiologia Aquática. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. *Tratado de microbiologia*: volume 2. São Paulo: Editora Manole, 1991. 126 p. Capítulo 4. p. 83-102.

HEIDI S. MARKS (RUPP); COLLIN R. ANDERSON. Determination of putrescine and cadaverine in seafood (finfish and shellfish) by liquid chromatography using pyrene excimer fluorescence. *Journal of Chromatography A*. v. 1094, p. 60-69, 2005.

HENRY, K. D.; KOEHLER, P. E. Effects of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation. *Journal of Food Protection*. v.49. p.423-427, 1986.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M. T. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v.88, p. 223-133, 2003.

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

HUSS, H. H.; ABABOUC, L.; GRAM, L. Assessment and management of Seafood Safety and Quality. *FAO Fisheries Technical Paper*, n 444, FAO: Rome, 2003.

ICMSF. *Guia simplificado para a compreensão e uso de objetivos de inocuidade de alimentos (FSO) e objetivos de desempenho (PO)*. Disponível em: <<http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoPO.pdf>.> Acessado em 23 de janeiro de 2012.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*. n. 101, p. 1285 -1289. 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Cap XVIII: *Pescado e Derivados*. 4ª ed., p. 641 – 644. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

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

JÜRGENSEN, C. A., JÜRGENSEN, L. D., Passivação de cobre, alternativa para a obtenção de condição de anerobiose. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. n. 2, 1982.

KIMURA, B.; KONAGAYA, Y.; FUJII. Nistamine formation BA *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. *International Journal of Food Microbiology*. n 70, p.71 -77, 2001.

KOBAYASHI, T.; KAJIWARA, M.; WAHYUNI, M.; HAMATA-SATO, N.; IMADA, C.; WATANABE, E. Effect os culture conditions on lactic acid production os *Tetragenococcus* species. *Journal of Applied Microbiology*. n. 96, p. 1215 -1221, 2004.

KOMPRDA, T.; SLÁDKOVÁ, P.; DOHNAL, V. Biogenic amine content in dry fermented sausages as influence by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripining. *Meat Science*. n. 83, p.534 – 542, 2009.

KONAGAYA, Y.; KIMURA, B.; ISHIDA, M.; FUJII, T. Purification and properties os a histidine decarboxilase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium. *Journal of Applied Microbiology*. n.92, p.1136 – 1142. 2002.

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. 676p. Cap. , p.69 – 82.

KUDA, T.; MIHARA, T.; YANO, T. Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. *Food Control*. v. 18, Jun. 2007.

KURT, SUKRU; ZORBA, OMER. The effect of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation in "sukuk" – A Turkish dry fermented sausage. *Meat Science*. n. 82, p. 179 – 184, 2009.

LADERO, V; FERNANDERS, M.; ALVAREZ, M.A. Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *International Dairy Journal*. n.19, p. 759 – 762, 2009.

LEE, M., KIM, M.K., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., KIM, S., KANG, M. S., LEE, S. *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. n.55, p.1409 – 1413, 2005.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Review: Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. v. 58, p 1-37, 2000.

LEITÃO, M. F. F.; BALDINI, V. L. S.; UBOLDI EIROA, M. N.; DESTRO, M. T. Bactérias produtoras de histamina em pescado de origem marinha. *Coleção ITAL*. v. 13, p. 83-98, 1983.

LOPES, J.L.C. Cromatografia em Camada Delgada. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos da Cromatografia*. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006. 453 p. Cap III, p.67 – 86.

LUPIN, H.M.; PARIN, M.A.; ZUGARRAMURDI, A. HACCP economics in fish processing plants. *Food Control*. v. 21, n.10, p. 1143-1149. 2010.

MALLE, PIERRE; VALLÉ, MICHEL. Assay os biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal of AOAC International*. v. 79, n. 1, p. 43 – 49, 1996.

MÁRSICO, ELIANE TEIXEIRA; OLIVEIRA, CÁTIA MARIA DE; FERREIRA, PATRÍCIA VIEIRA; ANTUNES, LEANDRO; SOBREIRO, LEILA GATTI. Avaliação da qualidade de sushis e sashimis comercializados em shopping centers. *Higiene Alimentar*. v. 20, n. 147, p. 63-65, dez. 2006.

MERCK, 2002, modificado por: FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S. *Escherichia coli* em cortes de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade de antimicrobianos aos sorovares predominantes. *XIV Seminário de Iniciação Científica e Premio UFF Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia*, 2004. 08-12 de novembro de 2004 – CD – 1º Lugar na área de Ciências Agrárias.

_____, 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 de atividade antimicrobiana das cepas isoladas. *XV Seminário de Iniciação Científica e Premio UFF Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia*, 2005. 07-11 de novembro de 2005 – CD – Classificado entre os melhores trabalhos científicos da área de Ciências Agrárias.

MERCK, *Microbiology Manual*, Berlin. Germany, 2002. 407 p.

MONGAR, J.L., Effect of chain length of aliphatic amines on histamine potentiation and release. *British Journal of Pharmacology*. v 12, p. 140 – 148, 1957.

NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Fish: a potencial source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinární Medicína*, República Tcheca. v. 49, n. 9, p. 343-358, set. 2004.

OETTERER, M. Produtos fermentados de pescado. In: OGAWA, M.; MAIA, E. L. Manual de pesca: *ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430 p. seção 16.9, p. 353-354.

OETTERER, M. *O processo de fermentação do pescado (Anchovamento)*. USP/ESALQ. LAN.662. Disponível em: <[www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacao do pescado.pdf](http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacao%20do%20pescado.pdf)>, acessada em dezembro de 2011.

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

OREN, A. Bioenergetics aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Junho. p. 334 – 348, 1999.

PIGNATO, S.; MARINO, A. M.; EMANUELE, M. C.; IANNOTTA, V.; CARACAPPA, S.; GIAMMANCO, G. Valuation of new culture media for rapid detection and isolation of Salmonellae in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 61, n. 5, p. 1996-1999, 1995.

POMBO, CECÍLIA RISCADO; MÁRSICO, ELIANE TEIXEIRA; FRANCO, ROBSON MAIA; GUIMARÃES, CARLOS FREDERICO MARQUES; AGUIAR, NÚBIA C. DA SILVA; PARDI, HENRIQUE SILVA; OLIVEIRA, GERALDO ABREU. Caracterização Físico-química e bacteriológica de peixes anchovados. *Brazilian Journal of Veterinary Science*., v.13, n. 3, p.170-173. 2006.

POMBO, CECÍLIA RISCADO. *Avaliação físico-química e bacteriológica de peixes anchovados*. Niterói, 2007. 103 p. Dissertação de mestrado – Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, UFF, Niterói. 2007. Disponível em: <http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/cecilia_pombo_mestrado.pdf>. Acessado em 19 de janeiro de 2012.

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

POMBO, C.R.; MÁRSICO, E.T.; SCHULZ, D.F.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, S. *Resumos do 3º Simpósio de Segurança Alimentar*. Florianópolis, Santa Catarina. Mai/jun., 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25627/1/2010-055.pdf>> Acessado em 18 de janeiro de 2012.

PORTUGAL. Ministério do Mar. Instituto Português de Conservas e Pescado. *Normas Sanitárias de produção e comercialização dos produtos da pesca: diretiva do Conselho, de 22 de julho de 1991 (91/493/CEE)*. Lisboa: MAPA, 1991. 43 p.

QUATTROCCHI, O.;ABELAIRA, S.; LABA, R. *Introducción a la HPLC*. Aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA. 1992.

RAY, B. Control by a Combination of methods (Hurdle Theory). In: _____. *Fundamental Food Microbiology*. 3rd ed. Flórida: CRC Press, 2005. 625 p. Cap 40. p529 -533.

RADUSHEV, D. *Prism 5 for windows versão 5*. Graphpad Software, Inc. 2007

SATOMI, MASATAKA; KIMURA, BON; MIZOI, MICHICO; SATO, TSUNEO; FUJII, TATEO. *Tetragenococcus muriaticus* sp. Nov., a New Moderately Halophilic Lactic Acid Bacterium Isolated from Fermented liquid Liver Sauce. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Jul., p. 832-836. 1997.

SCOTT, V.N. Interaction of factors to control microbial spoilage of refrigerated food. *Journal of Food Protection*. v. 52. 1989.

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

SHAKILA, R. JEYA; VASUNDHARA, T.S.; KUMUDAVALLY, K.V. Comparison of TLC- densitometry and HPLC method for the determination od biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*, n. 75, p. 255-259. 2001.

SIGNORINI, M.L.; GUERRERO-LEGARRETA, L. Producción de aminas biogénicas en carne de bovino conservada en ácido láctico de origen químico y bacteriano. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. v.8, n.1, p. 41-49, 2009.

SILVEIRA, TÂNIA MARIA LEITE DA; SILVA, TARLIANE MARIA DA; FARAH, ADRIANA; GLÓRIA, MARIA BEATRIZ ABREU. Aminas bioativas em café robusta submetido a diferentes graus de torração – estudos preliminares. *Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil*. Águas de Lindóia: São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/1834/179995_Art245f.pdf?sequence=1>. Acessado em: 19 de janeiro de 2012.

SOARES, PATRÍCIA C.M.; MÁRSICO, ELIANE T.; FRANCO, ROBSON M.; SOBREIRO, LEILA G. Teor de histamina na musculatura branca e vermelha da sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v. 12, p. 131-136. jan/dez. 2005.

SPADARO, AUGUSTO CÉSAR C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos da Cromatografia*. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006. 453 p. Cap V, p.102– 137.

STRATTEN, J. E.; TAYLOR, S. L. Scombroid poisoning. In: WARD, D.R.; HACKNEY, C. R. *Microbiology of marine food products*. Van Nostrand Reinhold, p.331 -351. 1991.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. n. 88, p. 41-54, 2003.

TAYLOR, S.L.; STRATTON, J.E.; NORDLEE, J.A. Histamine poisoning (Scombroid Fish Poisoning): an allergy-like intoxication. *Clinical Toxicology*, v. 62, p. 225–240, 1989.

TENDOLKAR, P. M.; BAGHDAYAN, A. S.; SHANKAR, N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 60, p. 2622-2636, 2003.

VENTOSA, A.; NIETO, J. J.; OREN A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 62, n. 2, p. 504 – 544. 1998.

VINCE, G.; ANTONELLI, M.L. Biogenic amine: quality index of index in red and white meat. *Food Control*. v. 13, p. 519-524. 2002.

YLDIRIM, H.K; UREN. A.; UCEL, U. Evaluation of biogenic amines in organic and Non-organic wines by HPLC OPA derivatization. *Food Technology and biotechnology*. v.45, n.1, p. 62 – 68. 2007.

ZAMAN, M. Z.; ABDULAMIR, A.S.; BAKAR, F.A. A review: Microbiological, Physicochemical and Health Impact of High Levels of Biogenic Amines in Fish Sauce. *American Journal of Applied Sciences*. v.6, n.6, p.1199-1211, 2009.

8 APÊNDICES

8.1 SUBMISSÃO A REVISTA FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS



Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
TFAC-2011-459	EVALUATION OF HISTAMINE PRODUCTION IN SARDINES MATURATED IN SATURATED BRINE. [View Submission]	20-Oct-2011	20-Oct-2011	ED: Anklam, Elke EIC: Gilbert, John <ul style="list-style-type: none"> • Awaiting Referee Reports
				▲ top

8.2 SUBMISSÃO A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Segue e-mail enviado pelo corpo editorial da RIAL:

RES: Dúvida sobre publicação de artigo já submetido  1 Ocultar detalhes

DE: Rial Sexta-feira, 11 de Novembro de 2011 11:30

PARA: 'Cecilia Pombo' ★

Prezados autores

Informamos que o manuscrito encontra-se em análise, com os membros do Corpo Editorial da RIAL, assim que possível retornaremos, no momento não há necessidade de enviar declaração ou carta de apresentação.

Att,

Corpo Editorial da RIAL

Núcleo de Acervo
Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902 - São Paulo - SP
e-mail: rial@saude.sp.gov.br
pagina eletrônica: <http://revista.ial.sp.gov.br>
Tel/Fax (11) 3068-2869

 **REVISTA DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

8.3 ACEITE PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA

REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA

Brazilian Journal of Veterinary Science

Universidade Federal Fluminense

Faculdade de Veterinária

Rua Vital Brazil Filho, 24

Niterói, RJ - Brasil

CEP 24230-340

Tel.: (21) 2629-9549

e-mail: rbcv@vm.uff.br

home-page: www.uff.br/rbcv

Niterói, 23 de janeiro de 2011

Cecília Riscado Pombo; Robson Maia Franco; Eliane Teixeira Mársico

Cumpre-nos informar-lhe(s) que o artigo:

“Caracterização do processamento tecnológico e validade comercial de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) anchovadas”

Enviado para publicação nesta Revista, está no prelo, com previsão de publicação para o primeiro semestre de 2012 (volume 18, número 1, 2012).

Atenciosamente,

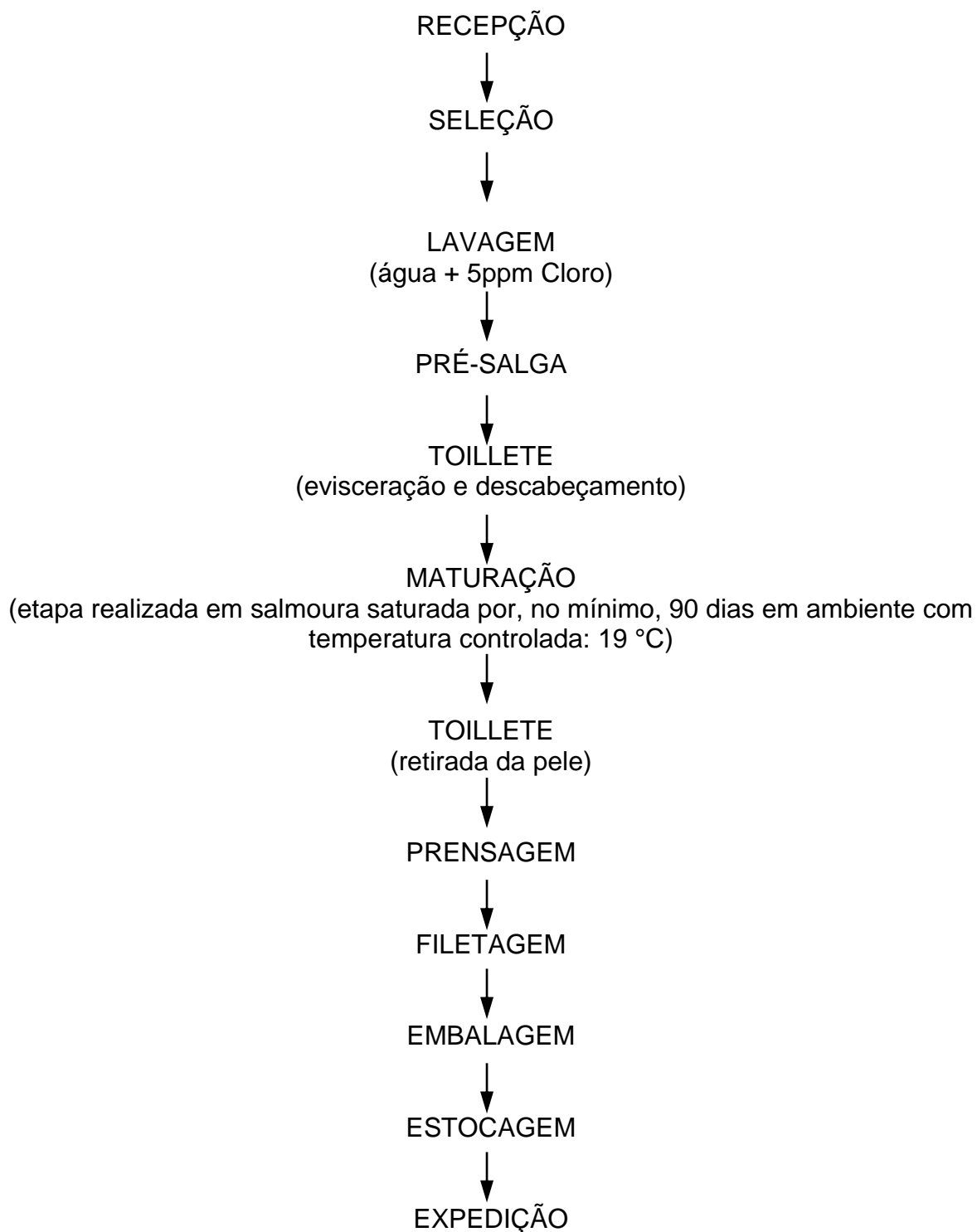


Prof. Felipe Zandonadi Brandão
- Editor Assistente -

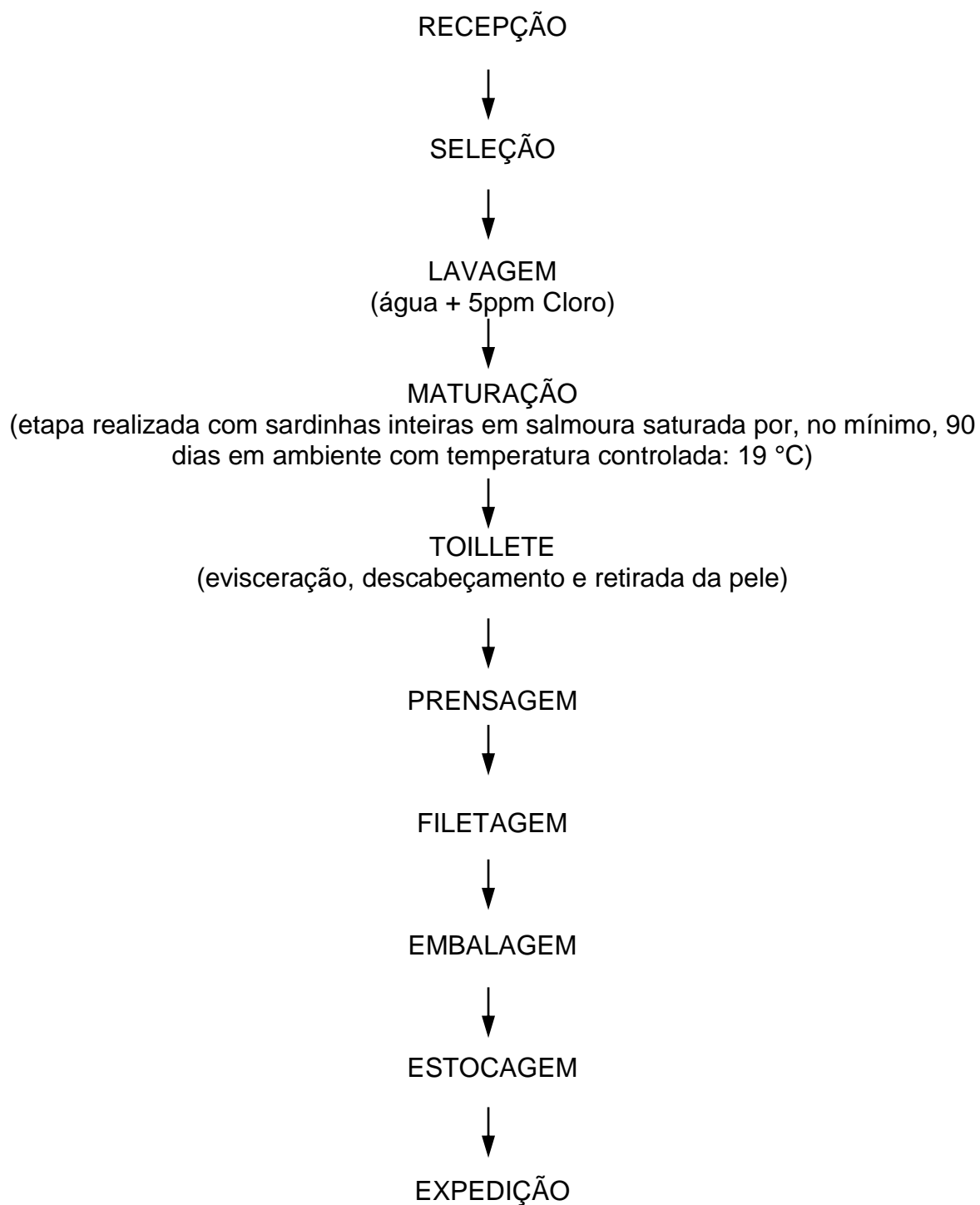
9 ANEXOS

FLUXOGRAMAS DE PROCESSAMENTO

9.1 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO A



9.2 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO B



9.3 PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO C

