

# Caracterização físico-química e bacteriológica de peixes anchovados

## Physical-chemical and bacteriological characterization of anchovy fish

Cecília Riscado Pombo,\* Eliane Teixeira Mársico,\*\* Robson Maia Franco,\*\* Carlos Frederico Marques Guimarães,\*\*  
Núbia C. da Silva Aguiar,\*\*\* Henrique Silva Pardi,\*\* Geraldo Abreu de Oliveira\*\*

### Resumo

Este estudo objetivou avaliar a qualidade de peixes anchovados de diferentes marcas e origens comercializadas no mercado varejista de Niterói-RJ. Foram estudadas através de parâmetros bacteriológicos e físico-químicos, 17 amostras processadas no Brasil, Peru, Itália, Argentina e Marrocos. Os resultados demonstraram que os valores de N-BVT extrapolaram, em 100% das amostras, o limite oficial (30mgN/100g) variando entre 42,84 – 203,80 mg N/100g. Todas as amostras apresentaram histamina, sendo que em 76,47% (13 amostras), o limite oficial (10mg/100g) foi extrapolado. Somente em três amostras não foram observadas a presença de putrescina e cadaverina. Os valores de pH variaram entre 5,08 e 5,73, de Atividade de água entre 0,55 e 0,70. O percentual de cloretos observado foi de 9,78 a 17,50. Quanto aos parâmetros bacteriológicos, as amostras analisadas encontram-se dentro do padrão oficial, no que se refere à análise qualitativa de *Salmonella* spp. Para coliformes termotolerantes também se encontram adequados à legislação. Dentre as amostras analisadas, somente duas estão inadequadas quando avaliada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo. A enumeração de *Enterococcus* spp., no produto analisado não é prevista pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Entretanto, os resultados obtidos sugerem uma relação entre a presença desta bactéria e a produção de histamina. Conclui-se que os produtos expostos à venda caracterizam um potencial risco à saúde pública, sendo necessário um alerta às autoridades sanitárias quanto ao risco do consumo destes produtos.

**Palavras-chave:** qualidade, anchovados, histamina, amins biogênicas, *Enterococcus* spp.

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the quality of anchovy fish of different marks and origins commercialized in the retail marks of Niterói- RJ. Bacteriological and Physical chemistry parameters were studied through 17 processed samples from Brazil, Peru, Italy, Argentina and Morocco. The results had demonstrated that the values of N-BVT had surpassed in 100% of the samples the official limit (30 mgN/100g) varying between 42.84-203.80 mg N/100g. All the samples had presented histamine and in 76.47% (13 samples) the official limits (10 mg/100g) was surpassed. It was not observed the presence of putrescine and cadaverine in three samples. The values for pH had varied between 5.08 and 5.73, the Activity of water values varied from 0.55 to 0.70. The percentage of chlorides observed was of 9.78 to 17.50. The bacteriological parameters of the analyzed samples were inside the official standard for *Salmonella* spp. In addition, thermo-tolerant coliforms is adequate to the legislation. Among the analyzed samples, two were inadequate when is only evaluating the presence of positive *Staphylococcus* coagulase. The enumeration of *Enterococcus* spp is not foreseen by legislation, however, the results suggest a relation between the production of histamine and the presence of this bacterium. We can conclude that the displayed products for sale characterize a potential risk to public health, being necessary an alert to the sanitary authorities to the risk of the consumption of these products.

**Keywords:** quality, histamine, anchovies, biogenic amines, *Enterococcus* spp.

### Introdução

A anchovagem do pescado consiste, fundamentalmente, em um processo misto, no qual as enzimas tissulares e microbianas compartilham suas ações sobre os diversos subcomponentes. O produto é rico em protídeos e aminoácidos formados pela autólise da proteína do peixe, pela ação de microrganismos anaeróbios e enzimas (Oetterer, 1999).

Na indústria do pescado, além de microrganismos patogênicos, é importante lembrar que um dos Pontos Críticos de Controle é a produção de histamina, pelo fato de ser termorresistente e ter sua ação potencializada pela presença de outras amins biogênicas.

As amins biogênicas são compostos vasoativos que podem alterar a pressão sanguínea causando fortes dores de

\* Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado) – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. E-mail: cissapombo@yahoo.com.br

\*\* Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64, 242230-340, Niterói, RJ.

\*\*\* Discente – Bolsista PIBIC. Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Autor para correspondência: Eliane Teixeira Mársico. E-mail: elianee@vm.uff.br.

cabeça, hipertensão, intoxicação renal e, em alguns casos, hemorragia intracerebral, levando o indivíduo à morte (Kuhn e Lovenberg, 1982). A presença de aminas biogênicas em alimentos pode também ser responsável por problemas gástricos, intestinais e alérgicos (Ozkaya et al., 2000). Também é relatada uma série de outros sintomas como prurido, náusea, erupção cutânea e sensação de calor na boca. Taylor et al. (1989) fazem referência a complicações cardíacas e respiratórias que podem ocorrer em indivíduos predispostos a reações alérgicas a esta amina biogênica.

Presente em peixes, ela pode rapidamente aumentar durante o crescimento bacteriano. Peixes da família Scombridae, como a cavala, cavalinha e os atuns, e também da família Clupeidae, como a sardinha, são freqüentemente relacionados com intoxicações histamínicas. Estes peixes possuem um teor relativamente alto de histidina na sua musculatura e, no *post mortem*, a histidina, ao ser liberada e descarboxilada, se torna responsável pelo aumento da concentração da histamina. O controle do alto nível de histamina presente nestas espécies deve ser monitorizado a fim de prevenir intoxicações no consumidor (Rossano et al., 2005; FAO, 1985).

No Brasil, o pescado fermentado ainda não se tornou um hábito de consumo significativo e, pela falta de padrões oficiais que regulamente seu processamento tecnológico, existe uma dificuldade para a classificação ou normatização do produto. Na revisão do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Origem Animal – RIISPOA (Brasil, 1997a) foram introduzidos alguns itens referentes ao pescado fermentado até então inexistentes.

Tendo em vista os fatores supracitados, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade de peixes anchovadas comercializados no mercado interno, de origem nacional e internacional, através de parâmetros físico-químicos e bacteriológicos.

## Material e métodos

Foram obtidas, no mercado varejista de Niterói-RJ, 17 amostras de peixes anchovados de diferentes marcas e origens, as quais foram transportadas nas condições de comercialização e encaminhadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos e, posteriormente, ao Laboratório de Controle Físico-químico de Alimentos, ambos pertencentes ao Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Para os procedimentos analíticos bacteriológicos, obtiveram-se duas subamostras de 25 gramas pesadas assepticamente, acondicionadas em envelope de “stomacher” e homogeneizadas em aparelho específico por dois minutos em velocidade normal, homogeneizando-se com solução salina peptonada a 1% e a outra com o caldo base Salmosyst. Após o preparo das diluições foram realizados os seguintes procedimentos analíticos bacteriológicos: Enumeração de Coliformes e *Escherichia coli* (MERCK, 2002, modificado por Franco e Mantilla, 2004); enumeração de *Enterococcus* spp. (Merck, 2002, modificado por Franco e Leite, 2005); contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva (Brasil, 2003); isolamento e identificação de *Salmonella* spp. (Pignato et al., 1995; Brasil, 2003). Os resultados foram comparados com os padrões de identidade e qualidades vigentes (Brasil, 2001).

As análises físico-químicas foram realizadas após a retirada das subamostras necessárias para a realização das análises bacteriológicas. Avaliou-se a produção de Bases Voláteis Totais (BVT), pelo método de Microdifusão em Placas de Conway, a determinação do pH e a quantificação de cloretos pelo método de Mohr descritos no Manual do LANARA (Brasil, 1981). Para avaliar a produção das aminas biogênicas, foi utilizado o método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), seguindo a metodologia proposta por Schutz et al. (1976). Para histamina, após o procedimento realizado por CCD, foi realizada a metodologia quantitativa fluorimétrica como determina a AOAC (2002).

## Resultados e discussão

Os resultados são encontrados nas Tabelas 1 e 2, onde é possível observar os valores obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas respectivamente.

Na Tabela 1 observa-se que todos os resultados referentes à produção de bases voláteis estão acima do preconizado pela Portaria nº 185 (Brasil, 1997b) que estabelece o limite de 30mg de N/100g de amostra para o pescado fresco. Na mesma tabela, encontram-se os valores obtidos nas análises de histamina observando-se que das 17 amostras analisadas, somente duas estavam dentro do limite preconizado pela legislação (ibid). Entretanto, nestas amostras, apesar da menor quantidade de histamina, foi identificada a presença de outras aminas, o que caracteriza a possibilidade de potencialização da ação tóxica da histamina.

Segundo Suzzi e Gardini (2003), o pH é um fator de grande influência na atividade de descarboxilação das enzimas formadoras de aminas biogênicas. Na Tabela 1, observa-se que a relação entre o pH ácido e a presença de histamina nas amostras encontra-se na mesma faixa das análises procedidas por estes autores. Há mais de setenta anos, Koessler et al. (1928), citado por Suzzi e Gardini (2003), sugeriram que a formação de aminas biogênicas seria um mecanismo fisiológico das bactérias em resposta ao meio ácido. Buncic et al. e Maijala et al., ambos em 1993, afirmam que a alta produção de histamina pode estar relacionada com o decréscimo inadequado do pH nos primeiros dias da maturação do produto.

A formação de níveis significativos de aminas biogênicas tem sido observada em muitos alimentos onde ocorre o crescimento bacteriano de *Enterococcus* spp (Giraffa et al., 1995). No entanto, existem alguns fatores que podem influenciar na formação de aminas biogênicas por estas bactérias tais com a temperatura, o pH e a concentração de sal (Gardini et al., 2000).

Os parâmetros físico-químicos acima citados parecem influenciar na formação de aminas biogênicas, fato sugerido nos estudos realizados por Gardini et al. (2000), com leite desnatado adicionado com diferentes concentrações de cloreto de sódio, onde a produção de aminas biogênicas foi menor quando a concentração de NaCl era maior. Somando a este fato, a produção de aminas mostrou-se menor ainda na ocorrência de menores valores de pH.

Segundo a RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001), as amostras analisadas encontram-se dentro do padrão estabelecido para as semiconservas de

**Tabela 1:** Resultados obtidos nas análises de Bases Voláteis Totais (BVT) (mg N/g), histamina (mg/g), outras amins biogênicas, pH, atividade de água (Aa) e cloretos (%) em peixes anchovados provenientes do mercado interno e externo

Amostra	Origem	BVT	Histamina	Outras amins biogênicas	pH	Aa	Cloreto
1	Brasil	52,92	~ 10	Presente	5,17	0,68	10,90
2	Desconhecida	42,84	> 10	Presente	5,73	0,67	17,50
3	Peru	203,80	>> 10	Ausente	5,64	0,68	14,49
4	Peru	63,00	>> 10	Presente	5,31	0,66	14,50
5	Itália	108,36	>> 10	Presente	5,23	0,67	14,80
6	Itália	102,06	> 5 e < 10	Presente	5,08	0,67	14,86
7	Itália	124,74	~ 10	Presente	5,32	0,67	14,66
8	Marrocos	99,54	>> 10	Ausente	5,49	0,67	16,14
9	Argentina	107,1	>2 < 5	Presente	5,55	0,55	14,70
10	Marrocos	80,33	>10	Presente	5,67	0,70	15,11
11	Argentina	113,4	>> 10	Presente	5,35	0,70	14,74
12	Brasil	88,2	> 10	Presente	5,37	-	12,45
13	Brasil	59,22	> 10	Presente	5,30	-	9,78
14	Brasil	71,82	>> 10	Presente	5,46	-	13,90
15	Perú	71,82	> 10	Ausente	5,40	-	13,02
16	Argentina	66,78	>> 10	Presente	5,55	-	15,67
17	Brasil	56,70	~ 10	Presente	-	-	13,88

> maior que; >> muito maior que; ~ aproximadamente, - não realizado.

**Tabela 2:** Resultados referentes à contagem de coliformes totais e fecais (NMP/g), *Staphylococcus* coagulase positivo (UFC/g) e *Enterococcus* spp. (NMP/g) em peixes anchovados provenientes do mercado interno e externo

Amostra	Coliforme		<i>Staphylococcus</i> Coagulase +	<i>Enterococcus</i> sp
	Total	Fecal		
1	-	-	-	-
2	Aus	Aus	1,9 x 10 <sup>3</sup>	-
3	Aus	Aus	Ausente	-
4	< 3	<3	Ausente	2,0 x 10 <sup>1</sup>
5	< 3	<3	7,0 x 10 <sup>2</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>
6	< 3	Aus	Ausente	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>
7	< 3	Aus	Ausente	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>
8	< 3	Aus	Ausente	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>
9	Aus	Aus	Ausente	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>
10	<3	Aus	Ausente	Sem crescimento
11	<3	Aus	Ausente	Sem crescimento
12	Aus	Aus	Ausente	3,0 x 10 <sup>1</sup>
13	Aus	Aus	Ausente	3,0 x 10 <sup>1</sup>
14	Aus	Aus	Ausente	3,0 x 10 <sup>3</sup>
15	Aus	Aus	Ausente	7,0 x 10 <sup>4</sup>
16	Aus	Aus	Ausente	Sem crescimento
17	Aus	Aus	Ausente	7,0 x 10 <sup>4</sup>

+ positivo, < menor que; > maior que; - não realizado.

UFC: unidade formadora de colônia; NMP: número mais provável; Aus: ausente.

## Referências

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

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 físicos e químicos. Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Ministério da Agropecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de Março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1255 de 25 julho de 1962, nº 1.236 de 2 de setembro de 1994, nº 1812 de 8 de fevereiro de 1996 e número 2.224 de 4 de junho de 1997. Aprova o

pescado, no que se refere à análise qualitativa de *Salmonella* spp. uma vez que em todas as amostras analisadas não foi detectada a presença desta bactéria. Utilizando a mesma legislação como referência, os resultados das análises realizados para coliformes termotolerantes também se encontram adequados à legislação. Dentre as amostras analisadas, somente duas estão inadequadas ao consumo quando avaliada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, pois, a RDC nº 12 (ibid) estabelece como valor limítrofe máximo 5x10<sup>2</sup> UFC/g para a presença do microrganismo em questão.

A enumeração de *Enterococcus* spp., no produto analisado, não é prevista pela RDC nº 12 (ibid). Entretanto, os resultados obtidos até o momento sugerem uma relação entre a produção de histamina e a presença desta bactéria. Gardini (2000) sugere que a maior influência na formação de amins biogênicas é da atividade proteolítica do *Enterococcus* spp. e das

enzimas de descarboxilação presentes neste microrganismo. Ao observar a Tabela 2, é possível perceber que o crescimento bacteriano desta microbiota foi bastante relevante. Certamente, mais estudos serão necessários para que seja possível correlacionar os fatores que influem na qualidade deste produto.

## Conclusão

A produção de amins biogênicas é um fenômeno extremamente complexo e depende de muitas variáveis como a cinética de crescimento bacteriano, sua respectiva atividade de descarboxilação além do pH e da concentração de cloreto de sódio do produto.

A concentração de histamina e a presença de outras amins biogênicas, nas amostras analisadas, geram grande preocupação no que se refere à saúde coletiva, pois a histamina produz intoxicações que podem ser potencializados com a presença de outras amins biogênicas.

É necessária a realização de mais estudos dos parâmetros que influem na formação de amins biogênicas em sardinhas anchovadas, além de estudos microbiológicos para avaliar a presença do *Enterococcus* spp.

novo Regulamento da 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, 1997a.

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, 1997b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 12 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos

- analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, Brasília, DF, 2003.
- BUNCIC, S.; PAUNOVIC, L.; RADISIC, D. VOJINOVIC, G.; SMILJANIC, D.; BALTIC, M., Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, n. 17, p. 303-309, 1993.
- FAO. Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. *Fisheries Technical Paper* 256, 1985.
- FRANCO, F.M.; MANTILLA, S.P.S. *Escherichia coli* em corte de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade de antimicrobianos aos sorovares predominantes. XIV Seminários de Iniciação Científica e Prêmio UFF – Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia, 08-12/11/2004. CD. 1º lugar na área de Ciências Agrárias.
- FRANCO, R.M.; LEITE, A.M.O. Enumeração e Identificação de *Enterococcus spp.* E cepas de *E. coli* patogênicas em coxas de frango e estudo da atividade antimicrobiana das cepas isoladas. XV Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF – Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia, 07-11/11/2005. CD.
- 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.; PEPE, G.; LOCCI, F.; NEVIANI, E; CARMINATI, D. Haemolytic activity, production of thermonuclease and biogenic amines by dairy enterococci. *Italian Journal of Food Science*, n. 4, p. 341-349, 1995.
- KOESSLER, K.K.; HANKE, M.T.; SHEPPARD, M.S. Production of histamine, tyramine, bronchospastic and arteriospastic substance in blood broth by pure cultures of microorganisms. *Journal of Infectious Diseases*, n. 3, p. 363-377, 1928.
- KUHN, D.M.; LOVENBERG, W. Tyramine in mine and beer. *Lancet*, v.1, p. 1879, 1982.
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.H.; AHO, M.A.; HIM, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*. n. 56, p. 125-129, 1993.
- MERCK, Microbiology Manual, Berlin.Germany, 407 p., 2002.
- 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, 353-354.
- OETTERER, M.; PERUJO, S.D.; GALLO, C.R.; ARRUDA, L.F. BORGHESI, R.; GRUZ, A.M.P. Monitoring the sardine (*Sardinella brasiliensis*). Fermentation Process to Obtain Anchovies. *Scientia Agricola*, v. 60, n. 3, p. 511-517, jul./set. 2003.
- OETTERER, M. O processo de fermentação do pescado (Anchovamento). USP/ESALQ.LAN.662. [on line] Disponível em: www.esalq.usp.br. Acesso em 1 de outubro de 2005.
- OGAWA, M.; MAIA, E.L.; *Manual de Pesca, Ciência e Tecnologia do Pescado*. São Paulo: Livraria Varela, 1999 430 p. v.I
- OZKAYA, F.D.; AYHAN, K.; VURAL, N. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from products. *Meat Science*, v. 58, p. 163-166, 2000.
- PIGNATO, S.; MARINO, A.M.; EMANUELE, M C.; IANNOTTA, V.; CARACAPPA, S.; GIAMMANCO, G. Evaluation 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.
- ROSSANO, L.; MASTRANGELO, LUNGARO, N.; RICCIO, P. Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus*. (L.1758): A study by capillary electrophoresis. *Journal of Cromatografy B* (2005).
- SCHUTZ, D.E.; CHANG, G.W.; BJELDANES, L.F. Decomposition in foods (chemical indexes). *Journal of Official Methods of the Association Official Analytical Chemists International*. v. 59, n. 6, p. 1224-1225, 1976.
- 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.