



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

HELOÍSA VALARINE BATTAGIN

ANÁLISE DOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE PEIXES SALGADOS
COMERCIALIZADOS NO COMPLEXO DO VER-O-PESO E O IMPACTO DO
PROCESSO DE SALGA NO CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS E NA
FORMAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

Belém - PA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

HELOÍSA VALARINE BATTAGIN

ANÁLISE DOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE PEIXES SALGADOS
COMERCIALIZADOS NO COMPLEXO DO VER-O-PESO E O IMPACTO DO
PROCESSO DE SALGA NO CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS E NA
FORMAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues

Belém - PA

2017

**ANÁLISE DOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE PEIXES SALGADOS
COMERCIALIZADOS NO COMPLEXO DO VER-O-PESO E O IMPACTO DO PROCESSO
DE SALGA NO CRESCIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS E NA FORMAÇÃO DE
AMINAS BIOGÊNICAS**

Por

HELOÍSA VALARINE BATTAGIN

DATA: _____

CONCEITO: _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues (PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória (UFMG)

Profa. Dra. Consuelo Lúcia Sousa de Lima (ITEC/UFPA)

Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo (ITEC/UFPA)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B335a Battagin, Heloísa Valarine
 Análise dos aspectos microbiológicos de peixes salgados comercializados no complexo do Ver-o-Peso e o impacto do processo de salga no crescimento de micro-organismos e na formação de aminas biogênicas :
Dissertação de mestrado / Heloísa Valarine Battagin. — 2017
82 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
1. pescado. 2. histamina. 3. bactérias halofílicas. 4. boas práticas de manipulação. I. Rodrigues, Antonio Manoel da Cruz, *orient.* II. Título
-

CDD 664.07098115

A meus pais, Sérgio e Sueli, meus avós e
meus anjinhos Augusto, Alexandre e Léo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e bênçãos em minha vida;

A minha mãe, Sueli, meu exemplo de coragem e força, pelo amor, carinho e sacrifícios para me dar a melhor vida possível e por nunca ter me deixado desistir de qualquer coisa;

A meu pai, Sérgio, pelo amor, pela dedicação ao transmitir todos os conteúdos importantes da escola e pelo carinho ao me ensinar os valores em que acredita;

A meu marido, Augusto, por todo o amor, confiança, apoio, compreensão, carinho, por ter sido a razão de muitas das minhas escolhas corretas e por me fazer uma pessoa melhor;

A meu irmão, Alexandre, por sempre saber quando eu preciso ouvir sua voz e ter as palavras certas, pelo amor e companheirismo;

A meus avós, Florinda e Nino, por cuidarem de mim mesmo há milhares de quilômetros; e Julieta e Alexandre, por cuidarem de mim “pessoalmente”;

A meus amigos e padrinhos, Camila e Keni, que se empenharam muito além do esperado para me auxiliar na minha dissertação e por enriquecerem minha vida diariamente;

Às amigas Doris e Rafaela, sem as quais eu não teria desenvolvido minha pesquisa;

Às minhas “mães postiças”, Sandra e Lurdinha, que cuidam e torcem por mim como se eu fosse um de seus filhos;

Aos colegas do LAMEFI, por terem me ensinado muito mais do que eu poderia imaginar, pela paciência e por terem me respeitado desde o primeiro dia;

Aos professores Antonio Manoel e Luíza, por me aceitarem em seu grupo de trabalho mesmo desconhecendo minha capacidade e personalidade e por me orientarem;

Ao professor Hamilton, por me dar o exemplo de profissional que eu gostaria de ser;

À professora Maria Beatriz Abreu Glória, pela grande ajuda nas análises de aminas bioativas;

Ao PPGCTA, UFPA e funcionários que contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

“De um lado há luminosidade, confiança, fé,
a beleza da terra; do outro, escuridão, dúvida,
descrença, a crueldade da terra, a capacidade
das pessoas de fazer o mal. Quando escrevo,
o primeiro é real; quando não, o segundo”

Czesław Miłosz

RESUMO

BATTAGIN, Heloísa Valarine. **Análise dos aspectos microbiológicos de peixes salgados comercializados no complexo do Ver-o-Peso e o impacto do processo de salga no crescimento de micro-organismos e na formação de aminas biogênicas**, 2017, 82 f., Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará, Belém.

O mercado Ver-o-Peso é o principal ponto de desembarque, beneficiamento e comercialização de peixe salgado da região metropolitana de Belém e abastece inúmeros municípios no entorno. Levando isso em conta, em prol de melhores condições de vida dessas comunidades, o presente estudo teve como objetivo analisar os aspectos higiênico-sanitários da comercialização do peixe salgado no complexo do Ver-o-Peso. Neste trabalho foram estudadas as variações causadas pelos processos de salga e manipulação de três espécies de peixe: pescada gó (*Macrodon ancylon*), cambéua (*Notarius grandicassis*) e piramutaba (*Branchyplastystoma vaillantii*), que são de grande interesse comercial na região. Associado a isso estudou-se o impacto da aplicação do processo de salga no crescimento de micro-organismos e na formação de aminas biogênicas na espécie xaréu (*Caranx hippos*). Embora de fácil aplicação, notou-se que o processo de salga realizado por pescadores e manipuladores de peixe do complexo do Ver-o-Peso é conduzido de maneira inadequada, sem precauções higiênico-sanitárias, e proporciona a elaboração de produtos de baixo valor comercial e sem padronização das características finais. Os procedimentos erroneamente aplicados nas fases de salga e comercialização favorecem também o crescimento de micro-organismos, como estafilococos e coliformes termotolerantes, e a produção de aminas bioativas, o que sugere que o consumidor pode sofrer danos à saúde. Sendo assim, observou-se a necessidade de padronização dos procedimentos de salga e treinamento dos trabalhadores acerca de boas práticas de manipulação de alimentos. Analisando-se as interações de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em xaréus salgados sob condições controladas, concluiu-se que esses micro-organismos se comportam de maneiras distintas em diferentes concentrações de NaCl, de modo que os grupos que apresentaram maior crescimento se envolveram na produção de maiores concentrações de histamina, devido a *quorum sensing*. Comprovou-se ainda que o processo de secagem foi positivo na redução do teor de aminas e que sua associação ao uso de 25% NaCl gerou produtos de melhor qualidade em relação à umidade, atividade de água e perfil de aminas quando comparado à salga com 15% NaCl.

Palavras-chave: pescado, histamina, bactérias halofílicas, boas práticas de manipulação.

ABSTRACT

BATTAGIN, Heloísa Valarine. **Analysis of microbiological features of salted fish from Ver-o-Peso Market and impact of salting process on growth of microorganisms and accumulation of biogenic amines**, 2017, 82 f., Thesis (Master). Graduate Program in Food Science and Technology. Federal University of Pará, Belém.

Ver-o-Peso market is the main point of landing, processing and trading of salted fish in the metropolitan region of Belém and supplies several counties around. Thus, in order to provide better living circumstances for these communities, the present study aimed to analyze the hygienic/sanitary conditions of salted fish trading in the Ver-o-Peso market. Salting and manipulation processes of three fish species (king weakfish (*Macrodon ancylon*), thomas sea catfish (*Notarius grandicassis*) and laulao catfish (*Branchyplastystoma vaillantii*)) were evaluated. These species have huge commercial importance in the northern region of Brazil. The impact of salting processes on growth of microorganisms and biogenic amines accumulation was carried out in crevalle jack species (*Caranx hippos*). Although salting processes are simple to handle, when carried out by fishermen and fish handlers of Ver-o-Peso market the hygienic/sanitary conditions are not achieved, and management is inadequate, resulting in low-value products. The procedures mistakenly applied in fish salting and commercialization can afford the growth of microorganisms (such as staphylococci and thermotolerant coliforms) and the production of bioactive amines, which suggests the consumer may fall ill. Therefore, standardizing salting procedures and training fish handlers are necessary. The analysis of interactions among Gram-positive and Gram-negative bacteria in salted crevalle jacks (under controlled conditions) concluded these microorganisms behave in different manners under different concentrations of NaCl. The groups which presented more growth became involved in the production of higher concentrations of histamine, due to quorum sensing. In addition, drying process was positive in reducing the level of amines. Considering moisture, water activity and profile of amines, the association of salting and drying processes produced better quality products when applying 25% NaCl rather than 15% NaCl.

Key words: sea food, histamine, halophilic bacteria, good handling practices.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química de algumas aminas.....	24
Figura 2. Formação de amina por descarboxilação de aminoácido.....	24
Figura 3. Descarboxilação da histidina.	26
Figura 4. Vias metabólicas de formação de aminas bioativas.....	27
Figura 5. Procedimentos de inoculação de bactérias, salga e análises	37
Figura 6. . Porcentagem de adequação das condições de manipulação dos peixes salgados no complexo do Ver-o-peso	41
Figura 7. Vestimentas de um dos manipuladores no mercado Ver-o-Peso.....	44
Figura 8. Produtos suscetíveis a contaminação	46
Figura 9. Produtos expostos para venda sem cobertura e identificação	47
Figura 10. Teores máximos de aminas detectados após salga e secagem de filés de xaréu, em base úmida.....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Teores de cloreto, cinzas, umidade e atividade de água em cambéuas, pescadas gó e piramutabas salgadas coletadas no Complexo do Ver-o-Peso	49
Tabela 2. Composição de proteínas e lipídios em base úmida em cambéuas, pescadas gó e piramutabas salgadas coletadas no Complexo do Ver-o-Peso.	50
Tabela 3. Avaliação microbiológica de cambéuas, pescadas gó e piramutabas salgadas provenientes do Complexo do Ver-o-Peso.....	51
Tabela 4. Teor de aminas bioativas (mg/kg) em piramutabas, pescadas gó e cambéuas salgadas provenientes do Complexo do Ver-o-Peso.	54
Tabela 5. Teor de cloreto, atividade de água, umidade e contagem de bactérias em xaréus salgados com NaCl nas concentrações 15 e 25% (p/p)	57
Tabela 6. Teores, em base seca, de tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina e feniletilamina em xaréus salgados com NaCl na concentração 15% (p/p).....	60
Tabela 7. Teores, em base seca, de tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina e feniletilamina em xaréus salgados com NaCl na concentração 25% (p/p).....	61

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1	Recurso pesqueiro.....	16
3.2	Peixe salgado	18
3.3	Micro-organismos associados à deterioração de peixes salgados	21
3.4	Aminas bioativas.....	23
3.5	Métodos de determinação de aminas bioativas em peixes.....	27
3.6	Avaliação das práticas de manipulação no local de comercialização.....	29
4	METODOLOGIA	32
4.1	Avaliação de peixes salgados comercializados no mercado Ver-o-peso.....	32
4.1.1	Coleta de amostras de peixes salgados	32
4.1.2	Análise das condições de manipulação e armazenamento de peixes comercializados salgados	32
4.1.3	Análises microbiológicas.....	33
4.1.4	Análises físico-químicas.....	35
4.1.5	Determinação de aminas bioativas	35
4.2	Estudo da relação da quantidade de sal empregada na salga mista com parâmetros microbiológicos e produção de aminas biogênicas.....	36
4.2.1	Coleta.....	37
4.2.2	Preparo das amostras	37
4.2.3	Preparo do inóculo.....	38
4.2.4	Inoculação de bactérias.....	38
4.2.5	Salga e secagem.....	38
4.2.6	Análises microbiológicas.....	39
4.2.7	Análise de aminas bioativas	39
4.2.8	Análises físico-químicas.....	39
4.3	Análise estatística	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Análise dos peixes salgados adquiridos no mercado Ver-o-Peso.....	41
5.1.1	Condições de manipulação e armazenamento	41

5.1.2	Análises físico-químicas dos peixes salgados	48
5.1.3	Análises microbiológicas.....	51
5.1.4	Aminas bioativas	54
5.2	Análises de peixes salgados sob condições controladas	56
6	CONCLUSÃO	66
7	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O consumo de peixe representa uma fonte relativamente acessível de proteínas e ácidos graxos insaturados, por isso seu consumo vem sendo estimulado. Na região amazônica, a pesca artesanal tem valor substancial não apenas no aspecto nutricional, mas também como fonte de renda para as comunidades locais (ISAAC et al., 2015). Na cidade de Belém, o mercado Ver-o-Peso é um dos pontos de maior comercialização do pescado paraense. Diversos estudos foram executados envolvendo pescado comercializado na região amazônica, porém poucos avaliam a qualidade dos produtos comercializados neste local, especialmente de peixes salgados (MOURÃO et al., 2009; NUNES et al., 2012; AMARO, 2014; ISAAC et al., 2015).

Devido à atividade microbiana, umidade elevada e riqueza de nutrientes, peixes frescos são facilmente perecíveis e a salga é uma técnica de conservação bastante comum, uma vez que dificulta o crescimento microbiano pela redução na atividade de água do produto (YANAR et al., 2006). No entanto, uma alta concentração de sal pode favorecer oxidação lipídica (CHAIJAN, 2011), desnaturação de proteínas, contração do músculo e desidratação (FAN et al., 2014), afetando as estruturas intra e extracelulares do pescado (NGUYEN et al., 2011).

A absorção do sal pelo peixe depende de diversos fatores, incluindo espécie, tipo do músculo, espessura do filé, peso, composição, estado fisiológico, proporção entre peixe e sal, temperatura e método de salga (GALLART-JORNET et al., 2007), e acarreta variações em fatores como atividade de água, umidade, pH, coloração, conteúdo de ácidos graxos e solubilidade de proteínas (CHAIJAN, 2011; NGUYEN et al., 2011). A degradação de proteínas gera como produtos aminoácidos e segundo Chang et al. (2008), quando há aminoácidos livres na presença de micro-organismos capazes de produzir enzimas descarboxilase e temperatura adequada, pode haver formação de aminas bioativas.

Dentre essas aminas, a histamina pode causar intoxicação alimentar e é frequentemente associada ao consumo de peixes escombroides, apesar de haver relatos de incidentes causados por peixes não escombroides, queijos e vinhos (LEHANE & OLLEY, 2000). A intoxicação por histamina em peixes é uma forma alérgica de intoxicação alimentar e um grande problema na segurança de frutos do mar, uma vez que está relacionada às más práticas de manipulação e conservação do pescado (HUNGERFORD, 2010). Nos EUA, o teor máximo permitido de histamina em peixes escombroides é de 50 mg/kg (US FDA, 2001). No Brasil, a tolerância é de 100 mg/kg (BRASIL, 1997a).

Além do perigo proporcionado pela histamina, outras amins também representam risco: cadaverina, espermidina e espermina podem reagir com nitrito e formar compostos carcinogênicos (MAH et al., 2002), tiramina pode causar vasoconstrição periférica e elevação da glicose sanguínea (LADERO et al., 2006), triptamina estimula a liberação de catecolaminas no cérebro e coração (GLÓRIA, 2005).

Em relação à quantidade de histamina permitida pela legislação, espécies de grande interesse no mercado paraense, como a pescada gó (*Macrodon ancylon*), cambéua (*Notarius grandicassis*), piramutaba (*Branchyplastystoma vaillantii*) e xaréu (*Caranx hippos*) não são contempladas, apesar de também apresentarem os aminoácidos precursores da histamina e de outras amins em suas composições. Dessa forma, o aprofundamento dos estudos voltados a amins biogênicas nestas espécies pode oferecer subsídios à indústria pesqueira e órgãos de saúde pública.

Devido ao interesse dos consumidores brasileiros, que vêm se mostrando cada vez mais exigentes quanto à segurança dos alimentos, é importante que o manipulador de alimentos também tenha conhecimento acerca daquilo que manuseia. Para tanto, além do foco principal do estudo proposto, que é relacionar a formação de amins biogênicas às condições de salga, armazenamento e aspectos físico-químicos do peixe, é importante avaliar também as condições de manipulação nos locais de comercialização.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Os objetivos deste estudo foram direcionados a analisar os aspectos sanitários da comercialização do peixe salgado no complexo do Ver-o-Peso, as variações nos processos de salga e manipulação de três espécies peixe, a saber, pescada gó (*Macrodon ancylon*), cambéua (*Notarius grandicassis*) e piramutaba (*Branchyplastystoma vaillantii*), que são de grande interesse comercial na região, e associado a isso estudar o impacto da aplicação do processo de salga no crescimento de micro-organismos e na formação de aminas biogênicas, efetuado na espécie xaréu (*Caranx hippos*).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições de manipulação de peixe salgado no mercado Ver-o-Peso;
- Realizar a caracterização físico-química das espécies de peixe salgado selecionadas;
- Estudar os aspectos microbiológicos das espécies de peixe salgado selecionadas, isolando bactérias halofílicas;
- Salgar peixes frescos em condições controladas de tempo, temperatura e concentração de NaCl e inocular as bactérias halofílicas previamente isoladas;
- Determinar o teor de aminas biogênicas das amostras de peixe salgado adquiridas no mercado Ver-o-Peso e nos peixes salgados sob condições controladas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Recurso pesqueiro

"Pescado" é o termo usado para qualquer organismo aquático de origem fluvial, marinha ou estuarina, destinado à alimentação humana, como peixes, moluscos, crustáceos, mamíferos e algas. Os peixes representam um importante componente nutricional na dieta humana, por serem fonte de proteínas de alta qualidade, ácidos graxos poli-insaturados e componentes bioativos (GONÇALVES, 2011; IKUTEGBE; SIKOKI, 2014).

Na região Norte do Brasil, observa-se amplamente a pesca artesanal, ou de pequena escala, devido à importância fundamental do pescado no fornecimento de proteína animal e também na manutenção da renda das comunidades locais (ISAAC et al., 2015). A bacia amazônica abriga cerca de 1.300 espécies catalogadas e o litoral amazônico, que inclui a costa do estado do Pará, é um ambiente rico para a exploração de recursos pesqueiros, pois a presença de matéria orgânica e sedimentos na água, que são provenientes da decomposição de florestas de mangue, favorece a alta produtividade da fauna (TUNDISI & TUNDISI, 2008; MOURÃO et al., 2009). Ao longo do tempo, a realidade da pesca na costa norte brasileira vem sendo baseada somente no princípio do aspecto econômico, o qual privilegia o lucro fácil e que em certos casos incentiva métodos e práticas predatórias de captura (DIEGUES, 2001).

O Estado do Pará possui 562 km de litoral, cujo percurso vai do Cabo Norte à Foz do rio Gurupi, compreendendo 70.000 km² de plataforma arrastável (PONTES, 2000), permitindo diversas formas de exploração de seus recursos naturais, o que corresponde a quase 50% do pescado de toda Região Norte. Todo esse potencial pesqueiro permite a exploração marítima, fluviolacustre, costeira e estuarina, resultado da captura do pescado artesanal e industrial, sendo que a pesca artesanal direciona em torno 90% de sua produção a abastecer o mercado interno/regional, desembarcando sua produção no complexo do Ver-o-Peso (AVIZ, 2006).

Entre as inúmeras espécies de peixes comercializados no complexo do Ver-o-Peso destacam-se os da família *Sciaenidae*, *Pimelodidae* e *Ariidae*. Na família *Sciaenidae* (pescadas), destacaram-se a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) e a pescada branca (*Plagioscion squamosissimus*). Entre os *Pimelodidae* (grandes bagres de água doce), as espécies mais frequentes são a dourada (*Brachyplatistoma flavicans*), piramutaba (*Brachyplatistoma vaillantii*), cambéua (*Notarius grandicassis*) e o filhote (*Brachyplatistoma*

filamentosum). Outras espécies com considerável ocorrência são a pescada gó (*Macrodon ancylodon*) e o xaréu (*Caranx hippos*) da família dos *Carangidae*. Com exceção feita à piramutaba, todas essas espécies são capturadas de forma artesanal (ROCHA & ROCHA, 2007).

A pescada gó (*Macrodon ancylodon*) se destaca em termos de volume de desembarque, sendo seu principal meio de captura as redes de emelhar por deriva e por currais. A espécie se distribui em zonas estuarinas e marinhas de regiões tropicais e subtropicais, sobre substratos brandos, em profundidades de até 60 m. Sem hábitos migratórios e pouco veloz, a pescada gó tem corpo longo, dorsal e ventralmente arqueado e coloração acinzentada e amarelada. A cabeça é pontuda e comprida, a boca é grande e oblíqua. A mandíbula é projetada para frente da maxila, e os dentes são arredondados (CHAO, 1978; CERVIGÓN, 1993; GONÇALVES, 2011). A dieta se baseia majoritariamente em crustáceos nos estágios juvenis e peixes na fase adulta (JURAS & YAMAGUTI, 1985).

A Cambéua (*Notarius grandicassis*) possui corpo amarelo-amarronzado, esbranquiçado ventralmente, e é encontrada em regiões estuarinas demersais, em profundidades de 1 a 20 m com fundos lodosos de águas salobras. Se reproduz no período entre os meses de maio e junho (TAYLOR & MENEZES, 1978).

A Piramutaba (*Branchyplatystoma vaillantii*) é um peixe de couro, de água doce, e a única espécie do gênero que forma grandes cardumes, podendo ser capturada em enormes quantidades ao longo da calha do Solimões/Amazonas e no estuário nas proximidades da Baía do Marajó. É um peixe muito bem aceito pelo consumidor pelo sabor agradável e qualidade nutricional satisfatória (LUNDBERG & LITTMANN, 2003).

O Xaréu (*Caranx hippos*) é uma espécie marinha que vive em regiões neríticas e pelágicas. De águas tropicais, alguns adultos também ascendem estuários e rios de águas salobras e lodosas. Têm hábitos alimentares carnívoros, com base em peixes, crustáceos e invertebrados planctônicos. Esses peixes se agrupam em cardumes junto à costa, geralmente em profundidades de até 350 m (LUQUE & ALVES, 2001).

Variações ambientais como o volume de chuvas, temperatura da água e salinidade influenciam diretamente a composição do músculo do pescado, mais acentuadamente o teor de lipídios. A quantidade de lipídios também se altera conforme fatores intrínsecos (espécie, sexo, idade e dieta) e métodos de manipulação e conservação. Sendo assim, a qualidade do peixe é

resultado de uma gama de variáveis que interferem sobre ele desde o momento em que está em seu ecossistema até chegar ao consumidor (GONÇALVES, 2011; CHAIJAN, 2011).

Os efeitos benéficos do consumo de peixes à saúde humana têm atraído a atenção de acadêmicos, no entanto a vida de prateleira desses produtos é limitada usualmente por deterioração microbiológica e/ou química. Para preservar esses produtos são empregadas diversas técnicas, como refrigeração, congelamento, defumação e salga (HASSOUN & KAROUI, 2016).

3.2 Peixe salgado

O Brasil é um dos principais consumidores mundiais de peixe salgado e seco (LIMA & SANT'ANA, 2011). No entanto, mesmo sendo um processo de fácil emprego, a salga praticada na região Amazônica é empírica, não havendo técnica ou princípios higiênico-sanitários bem definidos, o que dificulta a produção de produtos de boa qualidade (LOURENÇO et al., 2001; NUNES et al., 2012).

A qualidade desses produtos se associa à da matéria-prima, método de captura, método de salga e variações de temperatura e umidade no transporte e comercialização (BRASIL, 2007; FAN et al., 2014). Lourenço et al. (2002) e Nunes et al. (2012) descrevem a salga realizada na região Amazônica: geralmente ainda na embarcação, os peixes capturados são eviscerados e espalmados, submetidos ao método de salga mista, sendo comum também a salga tardia de peixes que não foram comercializados frescos, sem haver critérios de higiene estabelecidos, tampouco critérios tecnológicos.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de peixe salgado e peixe salgado seco do MAPA, peixe salgado é definido como

"o produto elaborado com peixe limpo, eviscerado, com ou sem cabeça e convenientemente tratado pelo sal (cloreto de sódio), com nível de saturação de 100%, com ou sem aditivos, não podendo conter mais de 50% de umidade para as espécies consideradas gordas, tolerando-se 5% a mais de umidade para as espécies consideradas magras" (BRASIL, 2000).

A salga tem por função diminuir a atividade de água do pescado, ou seja, menos água fica livre no músculo para favorecer reações enzimáticas e crescimento microbiano (YANAR et al., 2006), devido ao aumento da concentração de sal promover interações proteína-proteína e provocar diminuição entre interações proteína-água (JITTINANDANA et al., 2002). Esse

método apresenta a vantagem de ser eficiente e ter baixo custo, quando comparado a outros métodos de conservação (NATES et al., 2014). No entanto, peixes são inclinados à oxidação lipídica durante a estocagem, por terem alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, e isso afeta a coloração, *flavour*, textura e, sobretudo, o seu valor nutricional (KARPINZKA-TYMOSZCZYC, 2014). A salga pode induzir a oxidação lipídica quando há alta concentração de NaCl, e os produtos então gerados podem interagir com as proteínas, formando radicais proteicos que reagem para formar agregados (CHAIJAN, 2011). A absorção do sal pelo peixe depende de diversos fatores, incluindo espécie, tipo do músculo, espessura do filé, peso, composição, estado fisiológico, proporção entre peixe e sal, temperatura e método de salga (GALLART-JORNET et al., 2007).

Métodos de salga são aplicados artesanalmente e também em escala industrial, por três formas díspares: salga seca, salga úmida e salga mista (BASTOS, 1988). Na seca, os peixes são empilhados, intercalando camadas de peixe e sal, e a salmoura formada na perda de umidade pelos peixes é drenada. Na salga mista advém o mesmo processo, todavia permite-se que o pescado se mantenha imerso na salmoura formada. Finalmente, na salga úmida os peixes ficam submersos em salmoura saturada previamente preparada (BASTOS, 1988; LINS, 2011; CHAIJAN, 2011).

Quanto à concentração de sal, há uma uniformidade nas concentrações indicadas pela literatura, de níveis entre 20 e 25% de NaCl em relação ao peso dos peixes a serem salgados (TANASUPAWAT et al., 2009; CHAIJAN, 2011; THORARINSDOTTIR et al., 2011a; LIN et al., 2012; NATES et al., 2014). Quando muito alta a concentração de NaCl, o sal pode suscitar a desnaturação de proteínas e fomentar ligações proteína-proteína mais fortes, contração do músculo e desidratação (JITTINANDANA et al., 2002; THORARINSDOTTIR et al., 2011b; FAN et al., 2014).

Mantendo-se fixas as variáveis concentração de NaCl, temperatura e granulometria do sal, a salga seca em relação à úmida promove mais rapidamente a absorção de sal pelo músculo e a queda de pH, bem como o alcance de um valor mais baixo de pH e aumento mais pronunciado na oxidação lipídica e descoloração (CHAIJAN, 2011). Na salga úmida há maior solubilização de proteínas (que migram para a salmoura) e a atividade enzimática é reduzida (NGUYEN et al., 2011). Além disso, peixes salgados em fase de *rigor mortis* perdem menos peso do que em estado de *autolysis*; músculos mais espessos e ricos em lipídios demoram mais a atingir o equilíbrio osmótico; e em maior umidade relativa e em maior temperatura o processo de salga é mais rápido (BASTOS, 1988).

Com relação à granulometria, partículas menores de NaCl permitem absorção mais rápida e grandes partículas podem lesar o músculo e, além disso, há os aspectos nutricionais: quantidades muito elevadas de NaCl se associam ao desenvolvimento de doenças coronarianas pelo consumidor, o que instiga o aprimoramento dos métodos de conservação, por exemplo com o emprego de KCl em substituição de 50% do NaCl (ARMENTEROS et al., 2009). Uma alternativa é a salga com quantidade reduzida de NaCl, seguida de complementação por outros métodos de conservação, como defumação ou secagem (BASTOS, 1988; CASTRO, 2009).

Diferentes métodos podem ser empregados em conjunto com a salga e, como o peixe fresco apresenta elevado teor de umidade, atividade de água e conteúdo de nutrientes, esses mecanismos de conservação complementares devem ser eficientes como barreiras à deterioração por questões oxidativas, microbiológicas e enzimáticas (YANAR et al., 2006; CHAIJAN, 2011; FAN et al., 2014, HASSOUN & KAROUI, 2016).

Em relação às questões oxidativas, a oxidação lipídica é uma causa comum da deterioração de alimentos e leva à desagregação dos ingredientes nutritivos, alterações do paladar, aroma e cor, o desenvolvimento de metabólitos tóxicos e uma diminuição na vida útil dos alimentos. Está associada à doação de elétrons de uma substância a outra, e é promovida na presença de oxigênio e metais, favorecendo a produção de radicais livres e, portanto, de alterações sensoriais e formação de peróxidos. Quanto mais insaturada a molécula de ácido graxo, maior a probabilidade de oxidação (BLASZCZYK et al., 2013 IKUTEGBE & SIKOKI, 2014).

Quanto à ação microbiana, é importante analisar o produto desde os momentos anteriores à salga, pois a decomposição de peixes na fase de *pos-mortem* é favorecida pela ausência de defesas naturais contra a penetração de micro-organismos na carne, o que existia enquanto músculo. Dependendo da microbiota, podem ocorrer processos de oxidação ou redução aeróbia e anaeróbia, e os principais produtos da decomposição são substâncias inorgânicas, hidrogênio, CO₂, amoníaco, compostos sulfurados, ácidos graxos de cadeia curta, ácidos aromáticos, bases orgânicas, monoaminas cíclicas e diaminas (SOARES & GONÇALVES, 2012).

A decomposição ocasionada por ação enzimática, por sua vez, está relacionada aos primeiros momentos após o abate do peixe, às fases de *pré-rigor*, *rigor mortis* e *pós-rigor*, com enzimas que partem dos sucos digestivos e tecidos do próprio animal (VIEIRA, 2004; LANDGRAF, 2008; GONÇALVES, 2011; SOARES & GONÇALVES, 2012). Observa-se no

peixe após a salga que a ação enzimática continua presente, e que os diferentes mecanismos de deterioração estão interligados, pois enzimas proteolíticas associadas à deterioração de peixes salgados são em parte produzidas por micro-organismos: bactérias que produzem descarboxilases (GLÓRIA, 2005; SILVA, 2008). Sendo assim, o binômio tempo x temperatura se revela como elemento de destaque para a proteção contra a deterioração, pois a velocidade com que ocorrem as reações de oxidação, autolíticas e microbianas depende do tempo que o peixe demora a ser eviscerado e submetido ao processo de conservação, bem como das condições em que isso ocorre (VIEIRA, 2004).

3.3 Micro-organismos associados à deterioração de peixes salgados

Dentre os micro-organismos existentes no peixe salgado, há bactérias halofílicas provenientes do sal e também aquelas oriundas do ambiente a que o peixe esteve exposto, do manipulador e até mesmo da flora do animal antes do abate (MOHAMED et al., 2009; SILVA et al., 2011). Nesse sentido, sabe-se que os peixes de águas tropicais tendem a ter uma microbiota mais rica em bactérias mesófilas e gram-positivas, enquanto os de água fria abrigam maior quantidade de bactérias gram-negativas (GONÇALVES, 2011).

Chamam-se halofílicos os micro-organismos que necessitam de concentração de sal maior que a da água do mar para se desenvolverem, sendo consideradas bactérias halofílicas moderadas aquelas que requerem em torno de 5 a 10 % de sal e extremas as que necessitam de concentração de 15 a 30 % (YEANNES et al., 2011). A presença dessas bactérias pode causar no peixe salgado o aparecimento da coloração avermelhada (BASTOS, 1988; YEANNES et al., 2006).

Observa-se que o uso de sal como mecanismo redutor da atividade de água do produto não o mantém livre de micro-organismos, sendo observado crescimento de bactérias halofílicas mesmo em peixes com atividade de água menor que 0,6 (LOURENÇO et al., 2011). Inclusive bactérias que não são do grupo das halofílicas e halotolerantes podem ser encontradas em produtos salgados, pela limitação do efeito do sal e também por cuidados insatisfatórios na higienização de utensílios e superfícies de contato (NATES et al., 2014).

Um fator de destaque quando se estudam micro-organismos em peixes é a preocupação com a formação de amins biogênicas, compostos nitrogenados formados principalmente devido às atividades de descarboxilação de aminoácidos por determinados micro-organismos

(HUNGERFORD, 2010). Esses compostos estão associados a intoxicações alimentares (com ênfase na histamina) e deterioração dos produtos (MAH et al., 2002; SILVA et al., 2011).

Gêneros de bactérias envolvidos na produção de uma ou mais aminas são *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Photobacterium* e bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, e *Streptococcus*) (MOHAMED et al., 2009). O gênero *Enterobacteriaceae* se associa à produção de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (MARINO et al., 2000). Enfatizando os gêneros de comportamento halotolerante há *Staphylococcus spp.*, *Vibrio spp.* e *Pseudomonas spp.*, identificadas como formadoras de histamina em produtos de pesca salgados (LIN et al., 2012).

Micro-organismos relacionados à produção de histamina em produtos de pesca são *Staphylococcus spp.*, *Vibrio spp.*, *Bacillus spp.*, *Morganella morganii*, *Klebsiella planticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter doacae*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas cepaciae*, *Hafnia alvei* e bactérias ácido-láticas (GLÓRIA, 2005, TSAI et al., 2006; KUNG et al., 2008; MOHAMED et al., 2009; BJORNSDOTTIR et al., 2009, LIN et al., 2012).

Sabe-se que o comportamento dos micro-organismos é dependente de fatores externos, como a presença de outras espécies de micro-organismos e componentes presentes nas matrizes. Segundo Turan et al. (2017), *quorum sensing* é descrito como a expressão de fenótipos por micro-organismos quando alcançam uma densidade populacional elevada. As células são capazes de enviar sinais entre si na forma de moléculas específicas para regular fatores como densidade celular, simbiose, virulência, motilidade, esporulação, resistência a antibióticos, bioluminescência, produção de proteases e formação de biofilmes, entre outras (MEDINA-MARTÍNEZ et al., 2006; JAHID et al., 2015; TURAN et al., 2017).

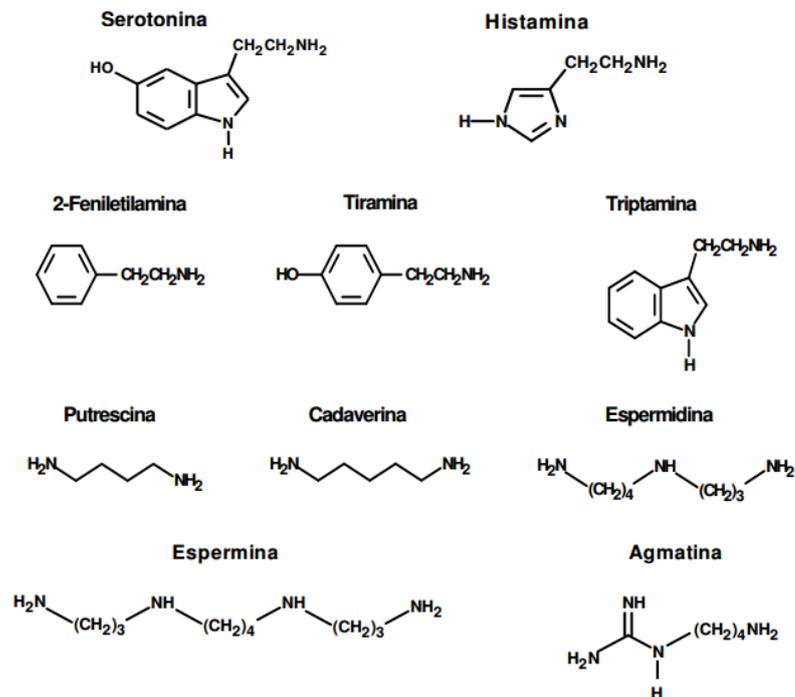
No entanto, compostos presentes nos substratos podem interferir na produção de sinais pelas bactérias, de forma a inibi-los ou potencializá-los, sendo o NaCl um exemplo, ainda que essas relações ainda são pouco entendidas quando se trata de alimentos (MEDINA-MARTÍNEZ et al., 2006; JAHID et al., 2015). *Quorum sensing* é descrito para muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas presentes em pescado, entre elas *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Edwardsiella* e *Vibrio* (GRAM & DALGAARD, 2002; MOROHOSHI et al., 2004; MEDINA-MARTÍNEZ et al., 2006; JAHID et al., 2015).

3.4 Aminas bioativas

Aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas derivadas da amônia, em que um, dois ou três átomos de hidrogênio foram substituídos por grupos alquila ou arila para gerar aminas. Formadas em processos metabólicos em animais, vegetais e microorganismos, podem ser encontradas também em alimentos (GLÓRIA, 2005).

Dentre as aminas bioativas presentes em alimentos putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina têm estrutura alifática, histamina, serotonina e triptamina têm estrutura heterocíclica e tiramina e feniletilamina têm estrutura aromática (MOHAMED et al., 2009), conforme a Figura 1. De acordo com os grupos amínicos, podem ser divididas em monoaminas (tiramina e fenilalanina) diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (agmatina, espermina e espermidina) (GLÓRIA, 2005; GIROTTO et al., 2010).

Figura 1. Estrutura química de algumas aminas.



Fonte: Silva, 2008.

Outra forma de classificação das aminas bioativas, conforme a função que exercem, as separa em poliaminas (que modulam o crescimento ao serem atuantes na manutenção do metabolismo celular) e em aminas biogênicas (que têm funções vasoativas e neuroativas) (BARDOCZ, 1995).

A respeito das vias biossintéticas, as amins podem ser naturais (formadas a partir de uma molécula simples, conforme são requeridas, como espermina e espermidina), ou formadas por reações de descarboxilação, hidrólise de compostos nitrogenados ou decomposição térmica (como histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (BARDÓCZ, 1995; SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005; HUNGERFORD, 2010). O mecanismo mais comum, de descarboxilação de aminoácidos, se apresenta na Figura 2.

Figura 2. Formação de amina por descarboxilação de aminoácido.



Fonte: Glória, 2005.

A histamina se destaca devido à associação com intoxicações alimentares, cujos principais sintomas são inflamações da face e pescoço, mas também náusea, desconforto respiratório, suor, palpitações, dor de cabeça, sensação de queima oral, hipo e hipertensão (MAH et al., 2002; SILVA et al., 2011). Altos níveis de histamina em alimentos podem ter importantes efeitos vasoativos em humanos, e sua toxicidade é devida à ação da amina em receptores de superfície presentes nas células-alvo, na membrana celular, conhecidos por receptores histamínicos H1, H2, H3 e H4 (LEHANE & OLLEY, 2000; RAI et al., 2009). O tempo para o início da intoxicação por histamina após a ingestão do peixe varia de minutos a 3 horas, quando a concentração é maior que 500 mg/kg de peixe (SILVA, 2011).

Pode ocorrer intoxicação alimentar quando a atividade de metabolização das amins no corpo humano é saturada, devido à ingestão de doses elevadas ou à diminuição da atividade metabólica na presença de inibidores específicos (MAH et al., 2002). No Brasil, a Portaria 185 de 13 de maio de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento permite um nível máximo de histamina de 100 ppm no músculo nas espécies de peixes pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombresocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* (BRASIL, 1997a; BRASIL, 2000). Nos Estados Unidos, o limite permitido é de 50 mg/kg em peixes escombrídeos (US FDA, 2011).

Apesar do teor máximo de histamina permitido ser preconizado na legislação, EFSA (2011) indicam que a quantidade máxima de histamina por refeição por pessoa sem causar

efeitos adversos pode variar de 25 a 50 mg, considerando-se pessoas saudáveis, enquanto que para indivíduos intolerantes, não deve atingir o limite detectável nas análises. Além disso a presença de outras aminas no mesmo produto pode ter papel potencializador da toxicidade. Cadaverina e putrescina potencializam a toxicidade da histamina e sua presença pode explicar casos em que peixes deteriorados se apresentam mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida isolada, pois inibem as enzimas diamina oxidase e histamina-N-metiltransferase, que metabolizam a histamina no intestino humano (MAH et al., 2002; CACCIOPPOLI et al., 2006). Cadaverina, espermidina e espermina são relacionadas também a compostos carcinogênicos, pois podem reagir com nitrito e ocasionar a produção de nitrosamina (MAH et al., 2002).

A tiramina pode causar a vasoconstrição periférica, elevação da glicose sanguínea e liberação de noradrenalina (McCABE-SELLERS et al., 2006; LADERO et al., 2010), a triptamina estimula a liberação de catecolaminas no cérebro e no coração (GLORIA, 2005), e a feniletilamina é neuromoduladora de catecolaminas (ZHOU et al., 2001). Devido a essas funções neuro e vasoativas, estão relacionadas a casos de dores de cabeça e enxaquecas (COSTA & GLÓRIA, 2003).

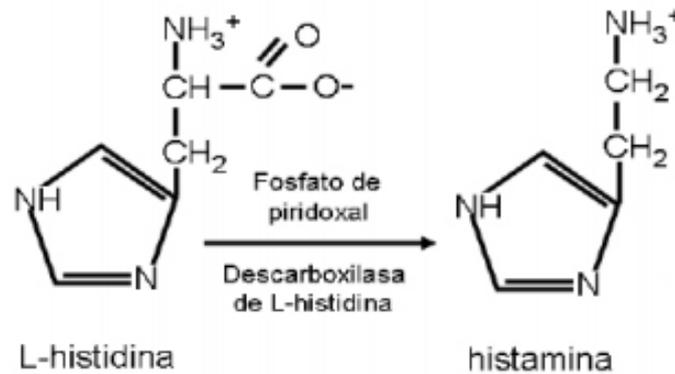
Essas aminas têm ainda a característica termorresistente (LIMA & GLÓRIA, 1999). Ao contrário de muitos patógenos bacterianos, as aminas biogênicas não são destruídas com cozimento, sendo necessário atender os requisitos de temperatura ao longo de todas as fases de produção para evitar que os compostos sejam formados (PARK et al., 2010).

A histamina e as demais aminas biogênicas não estão presentes no peixe no momento da captura, e três condições devem ser atendidas para que haja sua formação e acumulação: deve haver aminoácidos precursores em abundância no músculo, os micro-organismos que produzem enzimas descarboxilase também devem estar presentes, e o binômio tempo x temperatura deve colaborar com a produção e acúmulo das aminas biogênicas no peixe (CHANG et al., 2008).

Para a síntese de aminas biogênicas, as condições do ambiente devem ser favoráveis à ação microbiana, como temperatura, pH, tensão de oxigênio, presença de vitaminas, coenzimas e de carboidratos fermentáveis. Em pH de 2,5 a 6,5, estimula-se a produção de aminas pelo mecanismo de proteção da bactéria, pois estas são prejudicadas por pH muito baixos e sintetizam enzimas descarboxilases. As enzimas, por sua vez, são mais ativas em temperaturas menores que 30 °C, sendo inativadas acima de 40 °C, e têm atividade dependente do micro-

organismo entre 0 e 10 °C (GLÓRIA, 2005; SILVA, 2008). A reação que representa a descarboxilação da histidina, formando histamina, se apresenta na Figura 3.

Figura 3. Descarboxilação da histidina.



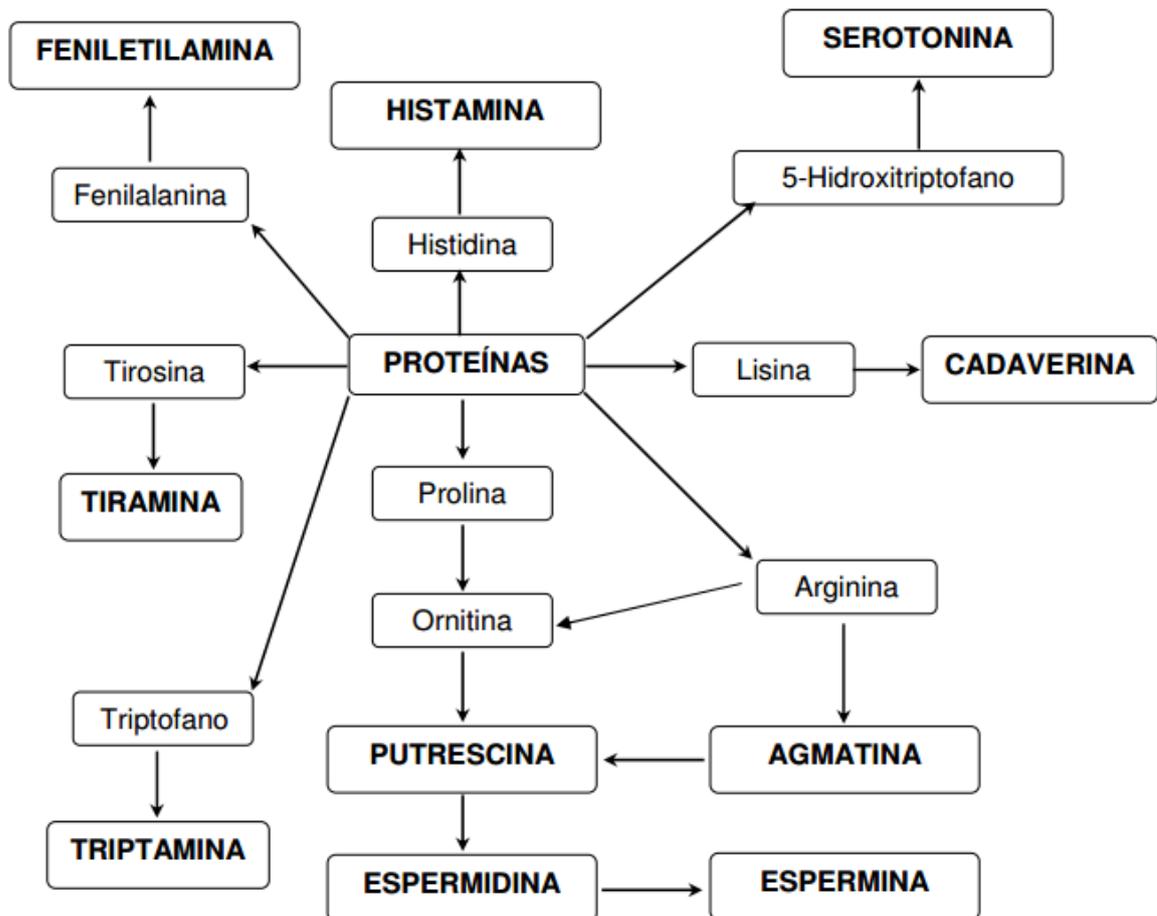
Fonte: Ramos-Jiménez et al., 2009.

O composto piridoxal-fosfato, derivado da piridina e associado ao grupo da Vitamina B₆, funciona como coenzima para enzimas que catalisam reações envolvendo aminoácidos, como transaminação, desaminação, descarboxilação e condensação (HARVEY & FERRIER, 2012). No caso da formação da histamina, a reação mais comumente observada é a descarboxilação da histidina com a atuação da enzima histidina descarboxilase e da coenzima piridoxal-fosfato, formando também dióxido de carbono (CO₂) (RAMOS-JIMÉNEZ et al., 2009; HARVEY & FERRIER, 2012).

A composição de aminoácidos de certos alimentos não varia largamente, porém a composição de aminoácidos livres se altera consideravelmente após o processamento e armazenamento, além de ser dependente da época da captura do peixe e alimentação antes da captura (MOHAMED et al., 2009; LIN et al., 2012). Peixes escombroides se relacionam frequentemente a ocorrências de intoxicação por histamina quando não processados e armazenados adequadamente, justamente por apresentarem elevadas quantidades de histidina livre no músculo (LEHANE & OLLEY, 2000). Peixes de outras famílias também apresentam histidina no músculo (SOUZA et al., 2013), porém menos estudos sobre essas espécies são observados.

Da mesma forma, a produção de outras aminas depende da concentração dos respectivos aminoácidos precursores livres. É importante ressaltar que espermina e espermidina se classificam como naturais, pois são formadas partindo de uma molécula mais simples conforme são requeridas (LEHANE & OLLEY, 2000). Essas e outras vias metabólicas para a formação dessas aminas são apresentadas na Figura 4.

Figura 4. Vias metabólicas de formação de aminas bioativas



Fonte: Silva, 2008.

3.5 Métodos de determinação de aminas bioativas em peixes

A Instrução Normativa 25 de 2 de junho de 2011 (BRASIL, 2011) descreve a análise de aminas bioativas por derivatização pré-coluna com cloreto de dansila, separação e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ou HPLC. Este método também é exigido pela União Europeia para exportadores de pescado fresco e é mais seletivo e sensível que outros

métodos de separação de aminas, e permite a separação e quantificação simultânea (SILVA, 2008).

Para determinação de aminas em peixe por HPLC, inicia-se pela extração, seguindo com a derivação, a separação e a detecção (OLIVEIRA et al., 2004). Os métodos indicados pela União Europeia para exportadores de pescado fresco são MALLE et al. (1996) e DUFLOS et al. (1999). Visando praticar uma metodologia mais rápida de análise de aminas biogênicas, há métodos que se mostram pertinentes e mais efetivos, com redução no tempo de manipulação das amostras e no efeito de matriz, maior seletividade, precisão e exatidão na faixa de trabalho interessante para amostras de peixes (SILVA et al., 2011; FAN et al., 2014)

Iniciados pela extração, os métodos indicados pela legislação da União Europeia e do Brasil utilizam ácido perclórico como extrator (MALLE et al., 1996; DUFLOS et al., 1999; BRASIL, 2011), porém ele possui potencial explosivo, então a extração pode ser feita usando água, solventes orgânicos (para extrair aminas livres) ou reagentes ácidos (para extrair aminas ligadas a outros componentes da matriz) (SILVA, 2008). Para extração de aminas biogênicas em peixes, o ácido tricloroacético (TCA) 5% é o mais indicado, por ser simples, não explosivo e agir rapidamente (OLIVEIRA et al., 2004).

Após a extração das aminas das matrizes, a derivação é necessária devido ao fato de estarem presentes no pescado geralmente em baixas concentrações. Além disso, têm como características a baixa volatilidade e a falta de cromóforos: como a maioria delas não apresenta absorção no ultravioleta (UV) e fluorescência, a derivação permite o aumento da absorbância e, por consequência, a diminuição do limite de detecção (SILVA, 2008).

Malle et al. (1996) e Duflos et al. (1999), indicados pela legislação da União Europeia, assim como Brasil (2011b), usam como reagente de derivação o cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno sulfonila (dansil). O dansil reage com aminas primárias e secundárias, é estável e permite a detecção em ultravioleta ou por detector de fluorescência, assim como o benzoil (ÖNAL, 2007). Por outro lado, o dansil forma derivativos sensíveis à luz e tem reação demorada (TAHMOUZI et al., 2011), enquanto o *o*-phtalaldeido (OPA) reage facilmente com aminas primárias após 30 segundos em presença de agente redutor (Nacetilcisteína ou 2-mercaptoetanol), mas o derivado não é muito estável (ÖNAL, 2007).

A maioria dos métodos faz uso de detecção fluorimétrica com derivação pré ou pós-coluna. A derivação pré-coluna é fonte de perdas na recuperação, pois há manipulação excessiva da amostra, com possibilidade de erros (OLIVERA et al., 2004). Nesse sentido, a

derivação pós-coluna é recomendada por ser curto e padronizado o período de tempo entre a formação do complexo e a detecção. Nesse método, o OPA é o reagente mais utilizado, devido à grande seletividade para aminas (ÖNAL, 2007; SILVA, 2008). Independentemente da derivação ser realizada pré ou pós-coluna, ela é geralmente indicada, assim como o uso de HPLC com coluna de fase reversa para separação de histamina e outras aminas, que tem sido vista como uma técnica bastante adequada (OLIVEIRA et al., 2004; SILVA et al., 2011).

Colunas de fase reversa C18 permitem a separação em sistema isocrático ou com gradiente de eluição, podendo nesse caso usar água, metanol, acetato de amônia e acetonitrila (CHANG et al., 1985; BRASIL, 2011, IKONIK et al., 2013; FAN et al., 2014).

A boa definição dos picos de um cromatograma é determinada também pelo método de detecção usado. Detectores ultravioleta (UV), de arranjo de diodos (DAD), de fluorescência e espectrofluorimétrico se mostraram satisfatórios, por vezes mesmo sem a derivação da amostra, selecionando-se os comprimentos de onda conforme o agente derivante empregado (CINQUINA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; SILVA et al., 2011; BRASIL, 2011; LIN et al., 2012; FAN et al., 2014). No entanto, Silva (2008) afirma que o detector de fluorescência é mais sensível para o caso de aminas biogênicas.

Para calibração do detector, SILVA (2008) e Brasil (2011b) propõem o uso de solução padrão de cada amina a 1,0 g/L em HCl 0,1 mol/L, fazendo diversas diluições neste ácido até se obterem todas as concentrações desejadas para a curva de calibração, sendo interessantes 10 soluções com concentrações de 120 a 0,1 µg/mL.

3.6 Avaliação das práticas de manipulação no local de comercialização

Os micro-organismos associados à atividade de descarboxilação de aminoácidos podem estar presentes na flora natural do alimento ou ser introduzidos durante os processos de manipulação, produção e estocagem. Apesar de algumas bactérias estarem relacionadas ao *habitat* do animal, as más práticas de conservação e higiene são as principais responsáveis pela contaminação pós-captura (LEHANE & OLLEY, 2000; IKUTEGBE & SIKOKI, 2014).

A pesca artesanal envolve a exploração dos recursos por técnicas relativamente simples, e geralmente a comercialização ocorre através de parcerias informais com contatos de intermediários em mercados regionais (ISAAC et al., 2015). No Pará, a comercialização de grande volume desses produtos se dá no Mercado Ver-o-Peso.

Para avaliar a qualidade de um produto, além de sua inspeção, é necessária a investigação do ambiente a que está exposto, bem como dos processos aos quais foi submetido. Geralmente essas condições são avaliadas e controladas por programas de garantia da qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação e Manipulação e os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) (PEREIRA et al., 2014). As Boas Práticas propõem um padrão de higiene em todo o processo de produção do alimento, composto pela potabilidade da água, higiene das superfícies de contato com o produto, prevenção de contaminação cruzada, higiene pessoal, saúde dos manipuladores, proteção contra adulteração do produto, identificação e estocagem adequada de produtos de higienização e controle integrado de pragas. Os POP fornecem a descrição detalhada dos procedimentos a serem executados (NASCIMENTO-NETO, 2003; SANTOS-JÚNIOR, 2011).

A melhor ferramenta para identificar os perigos e propor um método de controle para esses casos é a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e este instrumento usa como pré-requisitos as Boas Práticas e POP (LINS, 2011). Não há legislação específica para feiras, que exija o cumprimento desses programas de garantia da qualidade, no entanto as Portarias 326 de 30 de Julho de 1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 1997b), e a RDC 275 de 21 de Outubro de 2002, da ANVISA (BRASIL, 2002) fornecem bom embasamento acerca das necessidades de adequação referentes às condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores e/ou industrializadores de alimentos.

Os produtos comercializados em feiras geralmente se encontram dispostos sobre mesas e não recebem coberturas, o que os expõe a poeira, pragas e contaminações por manipulação de vendedores e consumidores; e frequentemente se misturam num mesmo aparato produtos de diferentes origens ou peixes mais novos e antigos (IKUTEGBE & SIKOKI, 2014). Nota-se dificuldade por parte do comerciante em se adequar, devido à falta de suporte técnico quanto à legislação, pela baixa escolaridade dos envolvidos, por conflitos entre opiniões de pescadores e resistência ao uso de instrumentos adequados na manipulação, sendo necessária maior negociação política e jurídica para criar ferramentas de supervisão. Além disso, os saberes-fazeres e a rotina criada pelos trabalhadores frequentemente se sobrepõem às técnicas aprendidas em treinamentos oferecidos por parceiros como universidades e órgãos públicos (ZUIN et al., 2013; ANDRADE, SCHIAVETTI, 2015).

Apesar da maior exigência do consumidor por produtos de melhor qualidade e do aumento significativo nos esforços para limitar a extensão de infecções bacterianas de origem

alimentar nos últimos anos (com a aplicação de normas de higiene de maneira mais rigorosa), o número de infecções permanece alto em todo o mundo (ROHDE, 2015). Em locais em que as especificações propostas pelos sistemas de garantia da qualidade não são documentadas, o risco de consumidores serem atingidos por esse tipo de infecções se mantém fora de controle, dificultando praticar ações preventivas. Dentre essas doenças causadas por bactérias, a intoxicação por histamina pode representar alto risco, já que mesmo em elevadas concentrações de sal se observa o crescimento de bactérias associadas à produção de aminas biogênicas (MAH et al., 2002; MOHAMED et al., 2009; LIN et al., 2012; FAN et al., 2014).

Além disso, com as crescentes recomendações para o aumento do consumo de peixes na dieta humana devido aos seus benefícios à saúde, é esperado que a intoxicação por histamina venha a ter um papel maior na saúde pública e se torne um problema global, uma vez que os métodos inadequados de captura, processamento e distribuição de produtos pesqueiros são recorrentes (SILVA, 2011).

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido usando-se três espécies de peixes comercializadas salgadas, piramutaba (*Branchyplatystoma vaillantii*), pescada gó (*Macrodon ancylon*) e cambéua (*Notarius grandicassis*), e uma espécie comercializada fresca, xaréu (*Caranx hippos*). Todos os peixes foram adquiridos no mercado do Ver-o-peso, em Belém, Pará.

4.1 Avaliação de peixes salgados comercializados no mercado Ver-o-peso

4.1.1 Coleta de amostras de peixes salgados

Peixes salgados de três espécies foram adquiridos: piramutaba (*Branchyplatystoma vaillantii*), pescada gó (*Macrodon ancylon*) e cambéua (*Notarius grandicassis*). Foram realizadas quatro coletas entre Julho e Setembro de 2016. Em cada coleta foram adquiridos 15 peixes, sendo 5 de cada espécie, e usaram-se os mesmos procedimentos para todos os lotes coletados. Os peixes salgados foram coletados em forma de mantas, ou seja, filés espalmados salgados, com o uso de luvas e embalagens plásticas estéreis, acondicionados em caixas isotérmicas e transportados até o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará (UFPA).

No laboratório, as amostras foram divididas em três partes, sendo a primeira utilizada para realização das análises microbiológicas, a segunda para as análises físico-químicas e a terceira foi mantida congelada a -18 °C até o momento da quantificação de aminas bioativas.

4.1.2 Análise das condições de manipulação e armazenamento de peixes comercializados salgados

Ao decorrer das quatro coletas de peixes salgados, avaliaram-se as condições em que esses produtos são comercializados no mercado do Ver-o-Peso. Para tanto, construiu-se um *check-list* baseado na Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1997b) e na Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002). O *check-list* se apresenta no Apêndice 1.

Para avaliação dos resultados, cada uma das unidades de inspeção avaliadas representou 10% da pontuação final, que variou de 0 a 100%.

4.1.3 Análises microbiológicas

Cada amostra analisada foi formada por cinco unidades de peixes de mesma espécie. Para tanto, na câmara de fluxo laminar e com uso de luvas e faca estéril, foram retirados 5 pedaços cúbicos de cada peixe, com aproximadamente 1 cm de lado, com o objetivo de totalizar 25 g de amostra ao final da filetagem de todos os cinco peixes. A retirada desses cubos se deu de forma que os cinco pedaços sempre fossem retirados de regiões distintas do peixe espalmado e, entre a filetagem de peixes de espécies distintas, foram trocadas as luvas e a faca, sanitizando-se também a bancada com álcool 70 %.

A cada amostra de 25 g separada, foram adicionados 225 mL de água peptonada (0,1 %), seguindo-se de homogeneização em *stomacher* (Logen modelo LS1901N) em velocidade alta por 60 segundos e plaqueamento, nas diluições adequadas, para análise de bactérias mesófilas aeróbias, halofílicas, psicrotróficos e estafilococos, bem como contagem de coliformes termotolerantes. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.3.1 Contagem de bactérias mesófilas

Usou-se a técnica de plaqueamento em profundidade em *Plate Count Agar* (PCA) e as placas foram incubadas em estufa a 36 °C por 48 horas (BRASIL, 2003).

4.1.3.2 Contagem de bactérias mesófilas halofílicas

A contagem de bactérias mesófilas halofílicas foi feita por plaqueamento em superfície em ágar halofílico com concentração de 25% NaCl (HiMedia, Mumbai, Índia), com incubação a 36 °C por 12 dias, conforme as instruções do fabricante.

4.1.3.3. Contagem total de bactérias psicrotróficas

Para a contagem de psicrotróficos foi feito o plaqueamento em superfície em PCA, seguido de incubação a 7 °C por 10 dias (BRASIL, 2003).

4.1.3.4 Contagem de coliformes termotolerantes

Foi usada a técnica do número mais provável (NMP), com inoculação em caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) e incubação a 37 °C por 48 horas. As amostras positivas foram repicadas para tubos contendo caldo EC (*Escherichia coli*) e estes foram incubados em banho-maria a 45 ± 0,5 °C por 24 horas (BRASIL, 2003).

4.1.3.5 Contagem de estafilococos

Para contagem de estafilococos foi usado o kit 3M 6446 - Staph Express (3M, St. Paul, USA) conforme as recomendações do fabricante, com incubação das placas a 36 °C por 24 h. A placa contém um meio de cultura pronto para amostragem e é seletivo e diferencial para *Staphylococcus aureus*, mas também pode indicar *Staphylococcus hyicus* ou *Staphylococcus intermedius* (conforme instruções de uso do produto), todas coagulase-positivas.

4.1.3.6 Isolamento de bactérias halofílicas

Após a contagem de bactérias halofílicas, foram separadas as placas de ágar halofílico onde houve formação de colônias na quantidade entre 25 e 50, número que permitia a retirada de colônias com uma alça de platina sem contaminação com as demais. As colônias foram isoladas com a retirada de uma colônia aleatória da placa de ágar halofílico com uma alça de platina e técnica de estriamento no PCA. As placas de PCA com colônias isoladas foram incubadas por 24 horas a 36 °C, seguidas de repicagem para uma nova placa e incubação nas condições anteriores.

Das placas do segundo isolamento, preparou-se um tubo de caldo nutriente e um tubo de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por placa e, com uma alça, retirou-se uma colônia bem isolada de cada placa e colocou-se em cada um dos tubos. Os tubos foram incubados em estufa

a 36 °C por 24 a 48 horas, até haver turvação. Após esse período, observou-se, pela turbidez, em qual caldo cada uma das bactérias se desenvolveu melhor.

O melhor caldo para cada bactéria foi selecionado e 1,5 mL da solução de cada tubo foi transferido a um eppendorf estéril e colocado em centrífuga (Spinlab modelo SL-5GR) a 9.000 rpm e 25 °C por 7 min, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 1,5 mL do caldo selecionado acrescido de glicerol (10%), colocando no vórtex (Global Trade modelo XH-B) até o desprendimento da colônia e, em seguida, congelando-se para análises posteriores. As bactérias halofílicas das placas do segundo isolamento em PCA passaram pela análise de coloração de Gram e as lâminas foram observadas ao microscópio (Zeiss Axio Scope A.1, 40 x).

4.1.4 Análises físico-químicas

A atividade de água das amostras foi determinada em triplicata, pelo equipamento Acqualab (Decagon modelo 4TEV), conforme as recomendações do fabricante. O teor de cloreto foi medido em triplicata por medidor digital (Sekisui modelo SS-31A), após trituração de 5 g de amostra e dissolução em 45 mL de água destilada, usando-se soluções de 5 e 10 % NaCl para calibração, conforme as recomendações do fabricante.

Com relação às análises de composição centesimal, o teor de umidade foi determinado por secagem de amostras de 3 g em estufa a 105 °C, até peso constante, de acordo com o método 932.12 da AOAC (1997), em triplicata. O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet, usando-se 3 g de amostra, de acordo com o método 922.06 da AOAC (1997), em triplicata. Para determinação do teor de proteínas totais foi usado o método de Kjeldahl, conforme IAL (2008), usando amostras de 3 g, em triplicata, e o fator 6,25. A determinação do teor de resíduo mineral (cinzas) foi feita por incineração em mufla a 550 °C, usando amostras de 3 g, em triplicata (AOAC, 1997).

4.1.5 Determinação de aminas bioativas

As porções de amostras separadas para a quantificação das aminas bioativas se mantiveram congeladas a -18 °C e foram encaminhadas em embalagens isotérmicas ao Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). No

local, as análises ocorreram conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2011). Após o descongelamento, foram pesadas 5 g de amostras, sendo posteriormente, adicionados 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e seguiu-se a homogeneização em agitador tipo vórtex (Biomatic, Brasil) por 70 segundos. O extrato foi separado em centrífuga (Jouan Thermo MR23i) com velocidade de 11250 x g a 0 °C durante 3 minutos. Filtrou-se o sobrenadante em papel Whatman nº 1 e, a partir da etapa de adição de TCA, repetiu-se o procedimento duas vezes, combinando-se os filtrados e recolhendo-os em balão volumétrico com volume ajustado em 25 mL.

O extrato foi filtrado em membrana HAWP em éster de celulose com 13 mm de diâmetro e tamanho do poro de 0,45 µm (Millipore Corp., Milford) e injetado em cromatógrafo (por cromatografia líquida de alta eficiência) com pareamento de íons em coluna de fase reversa, derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído e quantificação por espectrofluorimetria. As fases móveis usadas foram acetonitrila (fase A) e solução-tampão acetato de sódio-octanossulfonato de sódio (fase B). O equipamento usado na cromatografia era composto de três bombas com conjunto de lavagem automática do pistão (duas de modelo LC-10 AD e uma LC-10 ADvp, acoplada a uma câmara de mistura); injetor automático (modelo SIL-10 ADvp); detector espectrofluorimétrico (modelo RF-10AXL) com comprimento de onda de excitação de 340 nm e emissão em 445 nm; unidade de controle (CBM-20 A) conectada a um microcomputador; coluna de fase reversa (µBondapak C18, 3,9 x 300 mm, 10 µm) e pré-coluna µBondapak (Waters, Milford). A derivação ocorreu em câmara de mistura após a saída da coluna, em tubo de teflon de 2 m de comprimento, que conectava a câmara ao detector de fluorescência.

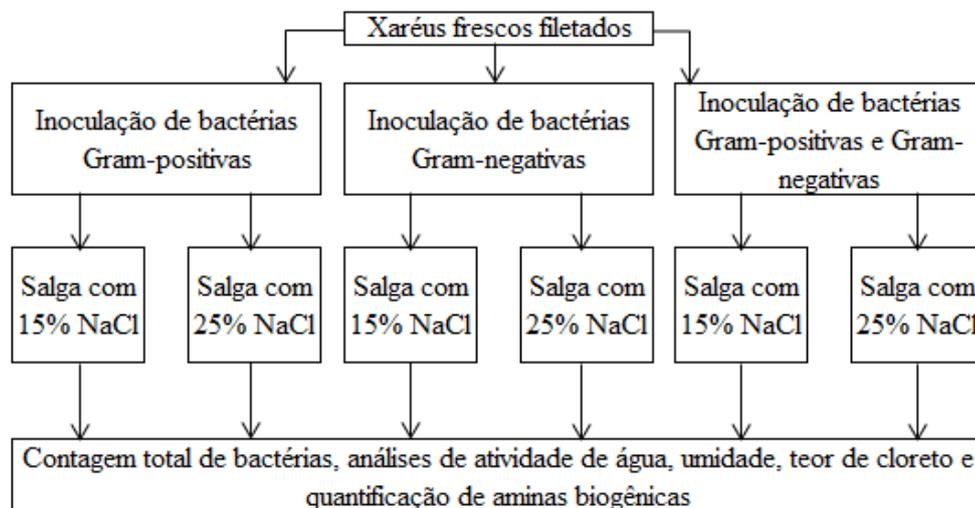
Para identificação das aminas compararam-se os tempos de retenção dos picos dos cromatogramas observados para as amostras com os picos gerados anteriormente para soluções-padrão de aminas em HCl. Para quantificar as aminas fez-se interpolação em curva analítica externa, usando-se o fator de correção correspondente a cada amina.

4.2 Estudo da relação da quantidade de sal empregada na salga mista com parâmetros microbiológicos e produção de aminas biogênicas

Após a avaliação dos peixes salgados anteriormente descrita, foi realizada uma coleta de 12 peixes frescos da espécie *Caranx hippos*, conhecida popularmente como xaréu. A espécie

foi escolhida por ser facilmente encontrada salgada e também fresca. Os xarés foram submetidos a seis tratamentos distintos, em que se variaram a concentração de sal empregada na salga e a inoculação de diferentes grupos de bactérias. A Figura 5 apresenta o fluxograma praticado para a salga e inoculação das bactérias halofílicas nos peixes.

Figura 5. Procedimentos de inoculação de bactérias em xarés, salga e análises.



4.2.1 Coleta

Foram feitas duas coletas no mês de Novembro/2016, também no mercado Ver-o-Peso, envolvendo 6 xarés frescos por coleta. Para tanto, usaram-se luvas descartáveis e embalagens estéreis, da mesma forma descrita para as coletas de peixes salgados, no item 4.1.1. Os peixes foram acondicionados em embalagens isotérmicas e transportados até o Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA-UFPA).

4.2.2 Preparo das amostras

Os peixes tiveram as cabeças retiradas e foram eviscerados com o uso de luvas e facas estéreis, sendo cortados na região ventral e espalmados em bancada de inox previamente sanitizada com álcool 70 %. Após esse procedimento, os peixes foram cortados com faca para redução do tamanho dos filés até um tamanho de aproximadamente 10 x 15 cm, com altura de

0,8 cm. Foram então expostos a luz ultravioleta durante 15 minutos, para redução da carga microbiana.

4.2.3 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, todas as bactérias isoladas de peixes salgados (conforme descrito no item 4.1.3.6) foram ativadas em caldo nutriente ou BHI a 36 °C por 24 h. Em seguida, foram repicadas para tubos contendo o mesmo meio e novamente incubadas a 36 °C por 24 h.

Decorrida a ativação, as bactérias foram agrupadas em três tubos: um contendo um *pool* de bactérias Gram-positivas, outro com Gram-negativas e um terceiro contendo ambos os tipos, em mesma proporção.

A partir de cada um dos tubos, foram realizadas diluições seriadas de forma a chegar a um conteúdo final de 200 mL de água destilada contendo 10^6 UFC/mL, comprovado previamente por plaqueamento em profundidade em PCA a 36 °C por 48 h.

4.2.4 Inoculação de bactérias

Os filés foram divididos em três grupos e em cada grupo foi feita a inoculação de bactérias usando-se um dos três inóculos preparados. A inoculação foi realizada com o mergulho dos filés de xaréu no inóculo, mantendo os filés durante 60 segundos na solução, virando-os na metade do tempo, um a um. Após a inoculação, todos os peixes foram salgados.

4.2.5 Salga e secagem

O sal usado na salga foi o NaCl (1 kg de sal refinado + 1 kg de sal grosso). Considerando-se as pesagens dos filés de peixe de cada tratamento, realizadas antes da inoculação, pesaram-se as quantidades de NaCl necessárias para a salga, com o objetivo de obter uma salga a 15% (p/p), que foi a média aproximada da concentração de sal encontrada nos peixes salgados comercializados do Ver-o-Peso.

Para isso, os filés, já com as bactérias inoculadas, foram empilhados intercalando-se camadas de peixes e de sal. Os recipientes foram cobertos com filme de PVC, e acondicionados

em estufa incubadora (Novatecnica modelo NT 705) à temperatura de 25 °C. Da mesma forma, fez-se a salga usando-se 25% de NaCl (p/p), valor médio sobre o qual há um consenso na literatura quanto ao teor de sal a ser adicionado na salga de peixes (THORARINSDOTTIR et al., 2011a; THORARINSDOTTIR et al., 2011b; LIN et al., 2012; NATES et al., 2014).

Passadas 48 horas, os peixes foram secos em secador de bandeja (tipo leito fixo), com fluxo de ar perpendicular a amostra. A temperatura do agente secante (ar) foi mantida à temperatura de 50 °C e a velocidade do fluxo de ar foi de 1,5 m/s. As amostras foram mantidas nessas condições por um período de 3 horas. Após essa etapa as amostras foram novamente acondicionadas a 25 °C em estufa incubadora (Novatecnica modelo NT 705, Brasil). Nestas condições as amostras foram mantidas por um período de 8 dias.

4.2.6 Análises microbiológicas

Logo após a inoculação (chamado “tempo zero”), foram coletadas amostras de 25 g de filés de cada tratamento, usando-se o mesmo método descrito no item 4.1.3. Usaram-se sempre dois peixes de cada grupo para a contagem total de bactérias em PCA, com plaqueamento em profundidade e incubação a 36 °C por 48 horas. As análises foram realizadas em triplicata e se repetiram após 24 horas, 48 horas, 6 dias e 10 dias.

4.2.7 Análise de aminas bioativas

A análise de aminas foi efetuada conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2011) e efetuada da mesma forma que a praticada para os peixes salgados (descrita no item 4.1.5). Essas análises foram também realizadas na Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), para os tratamentos em tempo zero, após 24 horas, 48 horas, 6 dias e 10 dias.

4.2.8 Análises físico-químicas

A atividade de água, umidade e teor de cloreto das amostras foram medidos conforme os itens apresentados na seção 4.1.4, considerando as amostras em tempo zero, após 24 horas, 48 horas, 6 dias e 10 dias.

4.3 Análise estatística

Após a obtenção de todos os resultados, os dados foram estudados estatisticamente. Para identificar diferenças significativas entre os valores médios encontrados em cada análise físico-química e microbiológica foi feita a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, usando-se o software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) ao nível de 5% de probabilidade. Para avaliação dos dados de aminos bioativas na primeira fase do estudo foi feita a comparação de medianas.

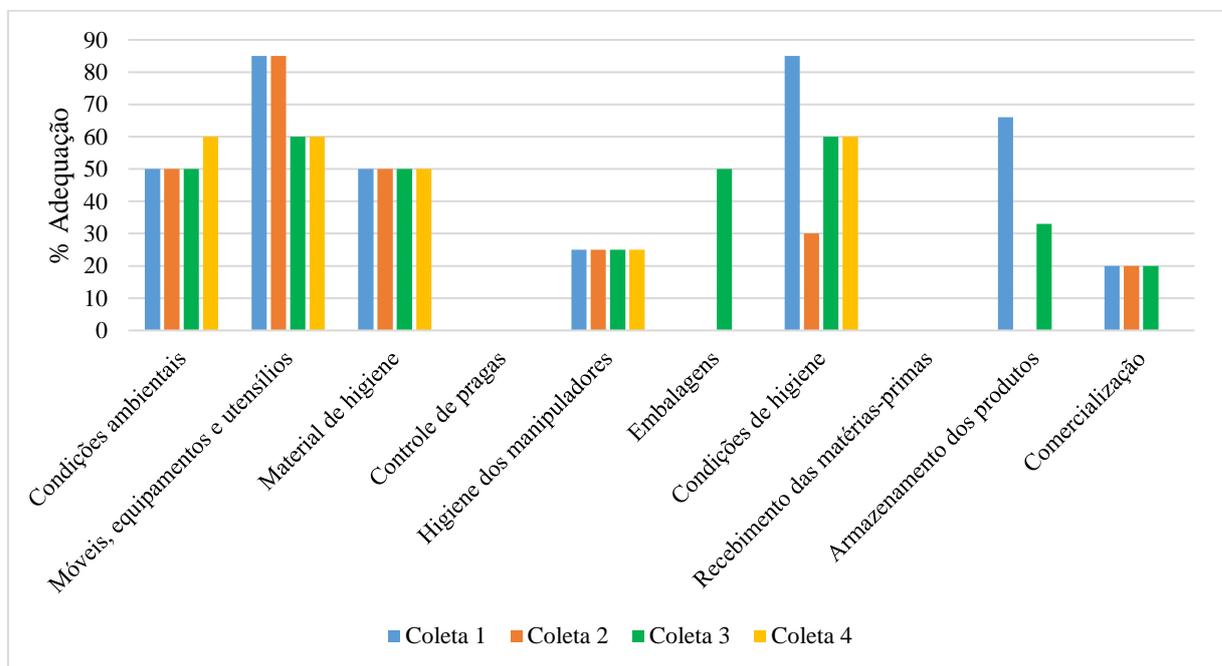
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos peixes salgados adquiridos no mercado Ver-o-Peso

5.1.1 Condições de manipulação e armazenamento

A análise realizada com o apoio de *check-list* indicou diversas falhas tanto em aspectos estruturais como na higiene dos produtos, dos manipuladores e do ambiente. Na primeira coleta, o *check-list* indicou 57% de adequação, na segunda 46%, na terceira 55% e na última 49%. Os resultados para cada item inspecionado são apresentados por coleta na Figura 6 e discutidos separadamente em cada um dos tópicos seguintes.

Figura 6. Porcentagem de adequação das condições de manipulação dos peixes salgados no complexo do Ver-o-Peso.



5.1.1.1 Condições ambientais

Tratando-se da estrutura, pode-se dizer que o piso e as paredes eram de materiais lisos, impermeáveis e de cor clara. Estavam bem conservados, porém o teto não era impermeável e a

ventilação era natural, o que facilita a contaminação dos produtos. Além disso, a fiação elétrica estava exposta em alguns pontos e as luminárias não possuíam proteção contra queda ou explosão, facilitando a ocorrência de acidentes. É importante mencionar ainda que equipamentos públicos, como sanitários, bebedouros com água potável e coletores de resíduos sólidos não estavam disponíveis para feirantes e tampouco consumidores, proporcionando maior risco de contaminação.

Sendo assim, nota-se a necessidade de instalação de mecanismos de ventilação artificial em sentido que evite a contaminação dos peixes salgados com sujidades da área externa e manutenção na rede elétrica, para embutir a fiação e instalar luminárias adequadas, de modo que não representem risco de acidentes. A falta de sanitários e bebedouros revela ainda que não apenas o mercado de peixe salgado, mas o complexo do Ver-o-Peso como um todo necessitam de adequações para garantir higiene e conforto aos trabalhadores.

5.1.1.2 Móveis, equipamentos e utensílios

Analisando-se as bancadas e utensílios, percebe-se que eram de material higienizável e estavam em bom estado de conservação, no entanto não havia um local adequado para os utensílios serem higienizados. Do mesmo modo, nem mesmo a quantidade de utensílios era pertinente, especialmente de basquetas plásticas para acomodação de peixes salgados, cuja ausência motivou o uso de caixas de papelão e sacos de cereais reutilizados em contato com os produtos.

A indisponibilidade de utensílios em quantidade suficiente para o desenvolvimento das atividades constitui risco de contaminação, uma vez que acarreta o uso de um mesmo utensílio para produtos diferentes concomitantemente e também a substituição desses materiais higienizáveis por materiais reaproveitados.

5.1.1.3 Material de higiene

Não havia local adequado para armazenamento de material de higiene e os materiais disponíveis eram inadequados e estavam em mau estado de conservação. O detergente usado na higiene de bancadas e utensílios era o mesmo usado na lavagem das mãos dos colaboradores e não havia produtos para desinfecção do ambiente após a limpeza.

Nem mesmo o lavatório de mãos disponível aos manipuladores era adequado, pois não possuía acionamento automático e o material disponível para higienização de mãos era apenas detergente líquido. Os manipuladores secavam as mãos nas próprias roupas quando faziam uso do lavatório. Soluções para adequar a área do lavatório seriam a implementação de um mecanismo de acionamento automático para abertura da torneira, colocação de *dispensers* adequados de sabonete líquido, papel toalha e álcool, bem como lixeira com abertura por pedal.

5.1.1.4 Controle de pragas

O mercado está localizado num lugar onde se encontram cães, gatos, roedores, aves e insetos e esses animais possuem livre circulação.

O local não colaborava com um possível controle de pragas, pois não havia telas, iscas ou outros mecanismos que pudessem impedir a entrada de animais domésticos, roedores ou insetos. Além disso, os produtos comercializados exalavam odores atraentes a esses animais e mesmo as lixeiras disponíveis no local não possuíam tampas para evitar que os animais fossem atraídos também pelos resíduos de alimentos no lixo.

Sendo assim, seria conveniente a instalação de barreiras mais eficientes contra esses problemas, como a colocação de iscas com cola para roedores e insetos, telas, dedetização e outros procedimentos para controle de pragas permitidos a estabelecimentos que produzem e comercializam alimentos.

5.1.1.5 Higiene de manipuladores

O estudo observou que os manipuladores não acatam integralmente a padronização de vestimentas. Em todas as coletas apenas um dos manipuladores vestia uniforme (boné, avental e botas de borracha). A maioria usava sandálias, não tinha proteção contra queda cabelos nos produtos (boné ou touca descartável) e falhavam quanto ao asseio e higiene pessoais, bem como no cuidado com a manipulação do pescado.

Os manipuladores de alimentos possuem um papel importante na disseminação de micro-organismos, por essa razão deve haver uma pessoa exclusiva para a manipulação de dinheiro e uso de celulares. O estudo observou que os manipuladores falham quanto esse quesito, proporcionando assim maior risco de contaminação, pois retiravam os produtos das

basquetas para venda com as próprias mãos, as mesmas com que manipulavam dinheiro e celulares, sem efetuar higienização entre essas atividades. A Figura 7 mostra como um dos manipuladores estava trajado no momento da primeira coleta.

Figura 7. Vestimentas de um dos manipuladores no mercado Ver-o-Peso.



A realização de treinamentos periódicos em boas práticas de manipulação poderia colaborar com melhorias nas vestimentas, higiene e conduta dos colaboradores, assim como o controle periódico de saúde permitiria reduzir os riscos de contaminação e também avaliar as necessidades dos colaboradores quanto à ergonomia no local de trabalho.

5.1.1.6 Embalagens

Ainda observando a Figura 7, nota-se que o colaborador tinha em mãos uma embalagem reaproveitada para uso dos consumidores. Os produtos comercializados, após retirados das basquetas pelos manipuladores, eram postos em embalagens plásticas reaproveitadas, como sacos de cereais ou sacolas de supermercados, e algumas vezes colocavam-se duas ou mais espécies de peixes numa mesma embalagem, proporcionando maior risco de contaminação cruzada.

Além do fato das embalagens serem reaproveitadas, não havia um local adequado para seu armazenamento até o uso, e por vezes os colaboradores saíam do local de comercialização

dos peixes salgados para pedir embalagens a vendedores de outros produtos no mercado. Dessa forma, percorriam locais onde expunham suas vestimentas e as embalagens a contaminantes da área externa, como poeira, por exemplo.

A fim de evitar esse tipo de impurezas, o uso de embalagens apropriadas (plásticas e não reaproveitadas) e seu armazenamento em local livre de resíduos e sujidades viabilizaria a comercialização de um produto de melhor qualidade, do ponto de vista sanitário.

5.1.1.7 Condições de limpeza

Apenas na primeira avaliação, durante a primeira coleta de peixes salgados, foi observado um ambiente limpo, com bancadas, pisos, paredes e ralos limpos. Nas demais notou-se que o piso e as paredes estavam sujos. Acumulados nos ralos havia pedaços de peixes salgados e sujidades trazidas da área externa. Teias de aranha na fiação elétrica foram observadas em todas as avaliações, elevando o possível risco de contaminação.

O ambiente é bastante próximo ao local onde barcos são atracados para descarga de produtos de pesca e também muito próximo à rua e não há mecanismos de que impeçam a entrada de impurezas da área externa. Dessa forma, é fundamental desenvolver procedimentos mais ajustados para higienização do ambiente, com o uso de produtos de limpeza apropriados. Até mesmo a instalação de cortinas de ar poderia proporcionar melhores condições de limpeza, dificultando a entrada de poeira, insetos, fumaça e odores da rua.

5.1.1.8 Recebimento dos peixes salgados

No desembarque e recebimento dos peixes no local de comercialização, os produtos são expostos às condições ambientais, chuva, sol e poeira, e não há verificação para uma possível decisão sobre aceitá-los ou não para venda com elementos de inspeção pré-definidos, como observação de temperatura, coloração e inspeção da embarcação. Portanto não há registros. Assim, quando o consumidor adquire uma mercadoria, é impossível saber de qual embarcação foi recebida, se passou por processos adequados de salga e há quanto tempo o peixe está armazenado.

Questionando-se colaboradores do mercado, percebeu-se que, ainda nas embarcações pesqueiras, o tratamento dado ao pescado não é padronizado. Não há locais específicos para

armazenamento de peixes que serão salgados ou comercializados frescos, os peixes capturados primeiro por vezes são compactados devido aos mais recentes serem colocados por cima, e isso gera produtos de menor qualidade, que são recebidos e comercializados da mesma forma. Por vezes, para peixes frescos que não são mais atraentes ao consumidor observa-se também a salga tardia. A salga mista realizada nas embarcações não é padronizada e os manipuladores adicionam a quantidade de sal que visualmente julgam adequada. Além disso, após a serem eviscerados, espalmados e salgados, por vezes os peixes são expostos ao sol e vento, o que não apenas os expõem a agentes contaminantes, mas também promove secagem de forma irregular e os mantém expostos a temperaturas elevadas.

5.1.1.9 Armazenamento dos produtos

Em todas as avaliações observou-se que as câmaras frigoríficas estavam em boas condições de funcionamento e limpeza, no entanto a forma de armazenamento dos peixes salgados estava incorreta, tanto para os peixes armazenados em temperatura de refrigeração como para aqueles expostos para venda.

Figura 8. Produtos suscetíveis a contaminação



Em ambos os casos o risco de contaminação era alto, pois as basquetas plásticas por vezes acondicionavam duas ou mais espécies de uma só vez; algumas dispostas diretamente

sobre o piso, e colocavam-se umas sobre as outras para empilhar. Isso também pode ser observado nas Figuras 7 e 8.

5.1.1.10 Comercialização

O estudo observou que a maioria das amostras de pescado estava exposta ao ambiente (sem vitrine), sujeita ao contato com insetos e sujidades, dentre outras fontes de contaminação. Durante a comercialização, os consumidores podiam avaliar os produtos com as próprias mãos, mesmo sem lavá-las, e não havia, em nenhuma das quatro avaliações, qualquer espécie de cobertura nas basquetas que impedisse o contato direto com o consumidor, poeira ou pragas. Outro problema constatado foi o fracionamento do pescado, efetuado de forma precária, pois não há área específica para tal atividade. Tampouco foi verificada identificação de preço ou espécie, como apresentam as Figuras 8 e 9.

Figura 9. Produtos expostos para venda sem cobertura e identificação



Apesar do volume disponível para comercialização ser condizente à quantidade vendida, não há avaliação periódica de características sensoriais para descarte de produtos avariados. Essa dificuldade em se adequar a padrões existe quando se tratam de produtos artesanais ou que não possuem legislação específica, como é o caso de feiras, ou ainda quando não há fiscalização.

A carência em apoio técnico mesmo quando há legislação a ser seguida é um problema agravado pela baixa escolaridade dos colaboradores, e a rotina criada por eles geralmente é priorizada em relação a possíveis técnicas aprendidas em capacitações cedidas por órgãos públicos e parceiros (ZUIN et al., 2013; ANDRADE & SCHIAVETTI, 2015).

Além disso, o treinamento de colaboradores é um gargalo subestimado e deve ser priorizado: o responsável pela embarcação pesqueira necessita de capacitação para treinar seus funcionários e desenvolver os procedimentos levando em consideração a garantia da qualidade, sendo que as instalações também devem assegurar as condições de higiene necessárias (QUANG, 2005).

Esses resultados advertem a necessidade de treinamento dos envolvidos na produção e comercialização dos produtos em questão, pois isso não apenas impactaria em melhorias nos aspectos higiênico-sanitários dos produtos, mas também na saúde dos colaboradores, organização do ambiente de trabalho e possivelmente até mesmo no volume de vendas dessas mercadorias.

5.1.2 Análises físico-químicas dos peixes salgados

Os resultados das análises das propriedades físico-químicas de peixes salgados comercializados no mercado Ver-o-Peso são apresentados na Tabela 1.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco (BRASIL, 2000) estabelece o valor mínimo de 10% para o teor de cloreto. Segundo os resultados obtidos, todas as amostras avaliadas atingiram esse valor, porém houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre algumas das médias de teor de cloreto em cambéuas e piramutabas. Essas discrepâncias se revelam como consequência do método empírico de salga, que não fixa um padrão na quantidade de NaCl adicionada aos peixes com relação ao seu peso inicial, pois nas embarcações os pescadores acrescentam a quantidade de sal que visualmente julgam adequada.

Os resultados para resíduos minerais (cinzas) em peixes salgados sofrem influência da quantidade de sal adicionada ao pescado: a metodologia de análise alcança temperaturas até 550 °C e o NaCl não se decompõe até esta temperatura, portanto o teor de cinzas é sempre maior que o teor de sal da amostra (SANT'ANA, 2003). Dessa maneira, a grande variação encontrada

para os teores de cinzas (de $15,55 \pm 0,12$ a $25,71 \pm 0,80\%$) ocorreu por conta da divergência dos teores de sal empregados (teores de cloreto entre $14,0 \pm 1,0$ e $23,3 \pm 1,7\%$).

Tabela 1. Teores de cloreto, cinzas, umidade e atividade de água em cambéuas, pescadas gó e piramutabas salgadas coletadas no Complexo do Ver-o-Peso

Espécie	Coleta	Teor de cloreto (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	Aw
Cambéua	1	$17,4 \pm 1,0^{AB}$	$19,81 \pm 0,77^A$	$51,9 \pm 7,52^{AB}$	$0,75^A$
	2	$14,3 \pm 2,3^{AB}$	$16,49 \pm 1,14^B$	$61,6 \pm 0,64^A$	$0,74^A$
	3	$18,3 \pm 2,7^A$	$19,89 \pm 0,19^A$	$46,7 \pm 4,16^B$	$0,75^A$
	4	$14,0 \pm 1,0^B$	$17,02 \pm 0,60^{AB}$	$53,6 \pm 4,92^{AB}$	$0,75^A$
Pescada gó	1	$16,7 \pm 0,7^A$	$18,61 \pm 0,13^A$	$48,4 \pm 1,16^A$	$0,74^A$
	2	$18,0 \pm 1,3^A$	$20,73 \pm 0,32^B$	$38,8 \pm 1,90^B$	$0,74^A$
	3	$16,7 \pm 2,5^A$	$19,72 \pm 1,58^B$	$57,4 \pm 3,94^C$	$0,75^A$
	4	$16,7 \pm 1,7^A$	$17,01 \pm 0,44^C$	$50,9 \pm 1,24^{AC}$	$0,74^A$
Piramutaba	1	$18,6 \pm 1,3^{AB}$	$20,66 \pm 0,76^A$	$45,8 \pm 7,52^A$	$0,75^A$
	2	$15,0 \pm 3,3^A$	$15,55 \pm 0,12^B$	$51,3 \pm 0,08^A$	$0,74^A$
	3	$23,3 \pm 1,7^B$	$25,71 \pm 0,80^C$	$50,6 \pm 1,09^A$	$0,74^A$
	4	$22,3 \pm 2,9^{AB}$	$22,81 \pm 1,70^A$	$58,3 \pm 3,79^A$	$0,74^A$

*Resultados expressos como média \pm desvio padrão; as letras diferentes (A, B e C) em uma mesma coluna para uma mesma espécie indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias; para os teores de atividade de água, os desvios padrão são menores que 0,01.

Além disso, a absorção de sal provoca a desnaturação de proteínas e, por consequência, a perda de água, devido à redução da capacidade de retenção de água pela carne. Sendo assim, disparidades nos teores de umidade e atividade de água também estão relacionadas ao conteúdo de sal empregado na salga.

O regulamento mencionado (BRASIL, 2001) trata também do teor máximo de umidade permitido para peixes salgados, que é de 50%, com tolerância de 5% para espécies consideradas magras. Dentre as espécies estudadas, os resultados encontrados para a composição de proteínas e lipídios em base úmida se apresentam na Tabela 2, que indica também a classificação de cada espécie quanto ao teor de gordura, segundo Ackman (1999).

Tabela 2. Composição de proteínas e lipídios em base úmida em cambéuas, pescadas gó e piramutabas salgadas coletadas no Complexo do Ver-o-Peso.

Espécie	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Classificação ¹
Cambéua	16,30 ± 2,23 ^A	10,46 ± 2,71 ^A	Gordo
Pescada gó	25,04 ± 2,20 ^B	7,68 ± 2,23 ^{AB}	Moderadamente gordo
Piramutaba	24,25 ± 3,32 ^B	5,25 ± 2,40 ^B	Moderadamente gordo

¹Classificação segundo Ackman (1999);

* Resultados expressos como média ± desvio padrão; n=3; as letras diferentes (A e B) em uma mesma coluna indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias.

Cambéua se classifica como um peixe gordo (mais de 8 % de gordura) e pescada gó e piramutaba peixes moderadamente gordos (teor de lipídios entre 4 e 8 %) (ACKMAN, 1999). Como nenhuma das espécies é magra, os resultados esperados para umidade não deveriam ultrapassar 50%, porém metade das amostras se apresentaram inadequadas em relação à umidade. Isso não se deve apenas ao fato das amplas variações na quantidade de NaCl empregado, que nem sempre foram suficientes para a redução da umidade aos níveis esperados, mas também pelas práticas inadequadas de armazenamento, uma vez que os produtos se mantêm expostos ao ambiente.

A atividade de água se manteve entre 0,74 e 0,75 para todas as amostras, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$). Valores de atividade de água entre 0,61 e 0,86 foram reportados em outros estudos para peixes salgados (LIMA & SANT'ANA, 2011; LIN et al., 2012; SCANO et al., 2013; KUNG et al., 2015), uma faixa que abrange os valores encontrados para as espécies aqui estudadas. Apesar de não ser um parâmetro de qualidade para peixes salgados, espera-se como valor máximo de atividade de água 0,75, para dificultar atividades microbiológicas e enzimáticas (LIMA & SANT'ANA, 2011).

Os resultados apontaram ainda que nem sempre maiores teores de sal estão relacionados a menores umidades. A concentração de sal, tamanho do músculo e o tempo de salga atuam sobre a solubilidade e desnaturação das proteínas, assim como o teor de lipídios e a conformação das cadeias de proteínas intervêm na redução da umidade e da atividade de água (GALLART-JORNET et al., 2007; FAN et al., 2014). Segundo Nguyen et al. (2011) e Chaijan (2011), o fenômeno de *salting-in* se relaciona à solubilização de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, e os espaços interfibrilares se tornam mais largos devido ao efeito de proteção eletrostática de íons do sal ligados a partes de filamentos carregadas; mas com o processo de agregação, segue-se o fenômeno de *salting-out*. Sendo assim, não apenas a falta de

padronização na quantidade de NaCl empregada e no tempo de salga afetam a perda de água, mas também as características intrínsecas a cada espécie.

5.1.3 Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação microbiológica de cambéuas, pescadas gó e piramutabas salgadas provenientes do Complexo do Ver-o-Peso.

Espécie	Coleta	Mesófilos aeróbios totais (log UFC/g)	Bactérias halofílicas (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (log UFC/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	Estafilococos (log UFC/g)
Cambéua	1	4,62 ± 0,03 ^A	4,58 ± 0,02 ^A	<1 ^A	<0,50 ^A	2,69 ± 0,27 ^A
	2	5,34 ± 0,01 ^B	<1 ^B	3,52 ± 0,06 ^B	<0,50 ^A	4,39 ± 0,03 ^B
	3	5,14 ± 0,05 ^C	4,92 ± 0,01 ^C	4,08 ± 0,01 ^C	0,56 ^B	4,03 ± 0,01 ^{BC}
	4	5,81 ± 0,00 ^D	4,91 ± 0,06 ^C	4,37 ± 0,04 ^D	0,87 ^C	3,60 ± 0,04 ^C
Pescada gó	1	4,64 ± 0,05 ^A	4,44 ± 0,03 ^A	3,38 ± 0,08 ^A	<0,50 ^A	4,02 ± 0,03 ^A
	2	4,71 ± 0,05 ^A	2,07 ± 1,38 ^B	<1 ^B	<0,50 ^A	3,28 ± 0,03 ^B
	3	3,93 ± 0,23 ^B	3,87 ± 0,03 ^A	3,29 ± 0,29 ^A	0,96 ^B	3,61 ± 0,05 ^C
	4	4,46 ± 0,02 ^A	4,08 ± 0,02 ^A	4,16 ± 0,02 ^C	1,46 ^C	3,64 ± 0,04 ^C
Piramutaba	1	4,91 ± 0,12 ^A	4,44 ± 0,03 ^A	3,30 ± 0,13 ^A	<0,50 ^A	3,04 ± 0,04 ^A
	2	4,46 ± 0,01 ^B	<1 ^B	3,77 ± 0,10 ^B	<0,50 ^A	2,70 ± 0,05 ^B
	3	5,41 ± 0,01 ^C	5,13 ± 0,06 ^C	3,30 ± 0,01 ^A	1,18 ^B	4,48 ± 0,01 ^C
	4	6,32 ± 0,06 ^D	6,09 ± 0,01 ^D	4,22 ± 0,08 ^C	2,18 ^C	4,55 ± 0,01 ^C

*Resultados expressos como média ± desvio padrão; as letras maiúsculas diferentes (A, B, C e D) em uma mesma coluna para uma mesma espécie de peixe indicam uma diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, p<0,05) entre as médias.

As médias nas contagens de bactérias mesófilas variaram de 3,93 ± 0,23 a 6,32 ± 0,06 log UFC/g. Os resultados estão de acordo com os dados coletados por outros autores em feiras de países variados, de 4,0 a 8,0 log UFC/g em peixes salgados e peixes salgados secos (Karaçam et al., 2002; Pacquit et al., 2007; Kung et al., 2008; Fan et al., 2014; Ikutegbe & Sikoki, 2014; Kung et al., 2015).

De acordo com Huss (1999) e ICMSF (2005), os alimentos cuja contagem total de bactérias ultrapassa o limite de 7 log UFC/g podem ser considerados inaceitáveis para consumo, no entanto todas as amostras analisadas se mantiveram dentro desse limite.

Sabe-se que as contagens de bactérias aumentam mais rapidamente quando há abuso nas condições de temperatura (KARAÇAM et al., 2002; PACQUIT et al., 2007) e, como no mercado Ver-o-Peso os peixes se mantêm armazenados por tempo indeterminado até que sejam vendidos (conforme mencionado por um colaborador), é possível que os peixes com maior contagem de micro-organismos tenham sido estocados por mais tempo, em maiores temperaturas, ou que tenham sido expostos a piores condições de manipulação e estocagem.

Quanto às bactérias halofílicas, as contagens variaram de <1 a $6,09 \pm 0,01$ log UFC/g, assim como Karaçam et al. (2002) observaram para anchovas. As maiores contagens se deram nas piramutabas das coletas 3 e 4, que possuíam as maiores concentrações de NaCl (em torno de 22 e 23%), e as menores ocorreram nas cambéuas e piramutabas da coleta 2, que tinham os menores teores (em torno de 14 e 15%).

Das colônias de bactérias halofílicas isoladas, 88,2% eram Gram-positivas. As Gram-negativas foram isoladas de pescada gó da coleta 4 e de piramutaba da coleta 3. A grande quantidade de micro-organismos Gram-positivos em relação a Gram-negativos é coerente: Rajan et al. (2010) reportam que 87,5% das bactérias isoladas em *Sooliodon* sp. salgado eram Gram-positivas e 95,5% das provenientes de anchovas salgadas eram bastonetes Gram-positivos. Em pirarucu salgado comercializado em Belém, Pará, Nunes et al. (2012) também encontraram bacilos Gram-negativos e Gram-positivos.

Isso pode ser devido ao fato dos peixes analisados serem de águas tropicais, pois a flora microbiana do pescado de águas tropicais é composta geralmente por maior quantidade de bactérias Gram-positivas (GRAM, HUSS, 1996; GONÇALVES, 2011; ICMSF, 2005), enquanto os de águas temperadas apresentam maior quantidade de Gram-negativas (LALITHA & SURENDRAN, 2006; PANTAZI et al, 2008).

Por outro lado, Damasceno et al. (2015) reportam uma distribuição diferente ao analisar a coloração de Gram de peixes amazônicos frescos, dentre eles piramutaba, sendo apenas 58,33% das bactérias Gram-positivas. Nesse caso, a grande diferença na proporção de Gram-positivas em relação às Gram-negativas pode ser devida à presença de NaCl no presente estudo. Isso ocorre porque bactérias Gram-negativas são mais observadas em peixes frescos ou nos

estágios iniciais da salga, sendo as Gram-positivas encontradas em maior quantidade nos estágios após a salga e secagem (NUNES et al., 2012).

As análises referentes a bactérias psicrotróficas são importantes devido a dois fatores: algumas das bactérias conhecidas como produtoras de aminas (*Vibrio fluvialis*, *Aeromonas* e *Enterobacter cloacae*) são psicrotróficas e os peixes do mercado Ver-o-Peso, quando não são comercializados no dia do desembarque, se mantêm sob temperatura de refrigeração em câmaras frias até serem vendidos, facilitando o desenvolvimento de psicrotróficos.

Observa-se que a contagem desses micro-organismos é menor que a de bactérias mesófilas e halofílicas, pois o NaCl e a temperatura ambiente durante a comercialização dificultam seu crescimento. Karaçam et al. (2002) reforçam essa discussão ao encontrar uma média na ordem de 6 log UFC de bactérias psicrotróficas/g em anchovas mantidas em temperatura de refrigeração e concentração de 14% de NaCl, enquanto que uma média na ordem de 3 log UFC/g é observada em anchovas mantidas em mesma temperatura e concentração de 22% de NaCl.

Sobre coliformes termotolerantes e estafilococos, a legislação para peixes salgados e/ou secos fixa limites máximos aceitáveis de 10^2 coliformes a 45 °C/g e 5×10^2 estafilococos coagulase positiva/g (BRASIL, 2001), ou seja, a máxima contagem de coliformes deveria ser 2 log NMP/g e de estafilococos 2,69 log UFC/g. Quanto aos coliformes termotolerantes, apenas as amostras de piramutaba da coleta 4 ultrapassaram os limites permitidos, porém no caso dos estafilococos, nenhum dos resultados se adequou aos padrões previstos pela legislação, sendo todos os peixes analisados impróprios para consumo humano.

Os micro-organismos em questão têm como principal veículo o manipulador, uma vez que se hospedam geralmente nas fossas nasais, boca e pele (RIBEIRO et al., 2009). Em seu estudo sobre pirarucu salgado seco na cidade de Belém, Nunes et al. (2012) concluíram que 25% das amostras analisadas foram contaminadas por coliformes termotolerantes. Nates et al. (2014), por sua vez, explicam que a presença de estafilococos em peixes salgados pode se associar à limitação no efeito do sal como conservador, mas também à ineficácia na desinfecção de superfícies de contato.

Os dados coletados confirmam a necessidade de adequações no processo de produção, bem como nos locais de venda dos produtos, onde se mantêm expostos ao ambiente externo e vulneráveis a contaminação pelos próprios consumidores. Mesmo que se identificassem métodos adequados de manipulação e sanitização de bancadas e utensílios durante o

processamento e estocagem, a apresentação no ambiente de vendas ainda permitiria contaminação, pois as basquetas com peixes são colocadas diretamente sobre o piso, não há embalagem e o consumidor pode manipular os produtos deliberadamente.

5.1.4 Aminas bioativas

Os resultados encontrados para as aminas bioativas se apresentam na Tabela 4. Os dados informam a faixa de variação das concentrações de cada amina analisada seguida da média e mediana. Esses valores envolvem os dados obtidos para os peixes de todas as coletas. Em alguns casos, os desvios padrão foram maiores que as médias, reflexo da grande faixa de variação dos resultados causada pela falta de padronização na produção e armazenamento dos peixes e as diferentes condições a que foram submetidos. Isso é aceitável uma vez que os resultados são totalmente independentes entre si e o mesmo foi observado em outros estudos envolvendo aminas biogênicas (TSAI et al., 2006; LIN et al., 2012). Sendo assim, como os resultados são independentes e o uso de um teste paramétrico poderia gerar resultados duvidosos, optou-se pela apresentação das medianas, como visto em Silva et al. (2011).

Tabela 4. Teor de aminas bioativas (mg/kg) em piramutabas, cambéuas e pescadas gó salgadas provenientes do Complexo do Ver-o-Peso.

Aminas bioativas	Piramutaba		Cambeua		Pescada gó	
	Variação	Mediana	Variação	Mediana	Variação	Mediana
TIM	nd ¹ – 2.3	1.35	nd – 5.2	0.00	nd – 7.9	3.01
PUT	3.2 – 13.4	9.48	nd – 12.3	3.53	nd – 32.8	3.15
CAD	4.3 – 31.7	15.43	2.3 – 31.3	7.57	nd – 165.7	7.19
HIM	nd – 4.9	4.13	nd – 12.6	4.40	nd – 8.1	2.73
SRT	nd	0.00	nd	0.00	nd	0.00
AGM	nd – 3.1	1.88	nd – 2.0	0.00	nd – 2.4	0.00
EPD	2.2 – 3.1	2.27	nd – 1.9	1.44	nd – 3.8	2.75
FEM	nd	0.00	nd – 3.5	0.00	nd – 4.5	0.00
TRM	nd	0.00	nd	0.00	nd – 5.7	0.00

¹nd = não detectado (<0,4 mg/kg);

*Medianas consideram nd=0 mg/kg; tiramina (TIM), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), histamina (HIM), serotonina (SRT), agmatina (AGM), espermidina (EPD), feniletilamina (FEM) e triptamina (TRM).

Apesar das faixas de variação serem amplas, para cada amina observa-se que as medianas indicam uma distribuição semelhante em todas as espécies analisadas, havendo valores desprezíveis para serotonina, feniletilamina e triptamina, teores baixos para tiramina, agmatina e espermidina e maiores concentrações de putrescina, cadaverina e histamina.

Estabelecer limites máximos de ingestão de aminas é difícil por seus efeitos tóxicos estarem associados à capacidade de detoxificação de cada organismo e presença de compostos moduladores, no entanto já se fixaram limites máximos aceitáveis para a ingestão de algumas delas (LADERO et al., 2010).

Para a histamina há os limites estipulados pelas legislações pertinentes: de todas as amostras estudadas, 66% continham histamina, mas os teores encontrados nas diversas coletas não atingem as concentrações máximas permitidas pelas legislações brasileira e dos EUA (BRASIL, 1997a; US FDA, 2001). Quanto aos valores estipulados por EFSA (2011), que indicam a quantidade máxima que pode ser ingerida sem que o indivíduo sofra efeitos adversos, os peixes podem representar fonte de risco a indivíduos intolerantes e causariam adversidades em indivíduos saudáveis apenas com o consumo de peixe associado a outras fontes de aminas. Os teores são próximos ou menores que os revelados por outros estudos (MAH et al., 2002; KUNG et al., 2008; LIN et al., 2012; KUNG et al., 2015), que chegaram a detectar até 549 mg/kg de histamina em produtos semelhantes.

Quanto à tiramina, doses de 10 mg têm sido associadas a enxaqueca e a ingestão de 3 mg de tiramina e feniletilamina pode causar dores de cabeça a organismos suscetíveis (COSTA & GLÓRIA, 2003). Segundo EFSA (2011), doses até 600 mg de tiramina por refeição para indivíduos saudáveis são consideradas aceitáveis, sem causar efeitos adversos. A presença de tiramina foi detectada em 53,3% das amostras e a máxima concentração encontrada foi de 7,9 mg/kg, não representando, portanto, alto risco de intoxicação.

Sobre as demais aminas, feniletilamina foi detectada em 26,6% das amostras e a máxima concentração observada foi de 4,5 mg/kg. A triptamina, por sua vez, foi observada em apenas 0,7% das amostras, com até 5,7 mg/kg. Apesar de serem baixas concentrações, o consumo desses produtos em grandes quantidades ou associado a outros produtos que possam conter essas aminas, como vinhos e queijos, representa um risco à saúde do consumidor, podendo ocasionar dores de cabeça e enxaqueca. Para essas aminas, outros autores encontraram concentrações mais elevadas em peixes marinhos salgados de diferentes espécies, de até 107,8 mg/kg de tiramina, 145,2 mg/kg de feniletilamina e 38 mg/kg de triptamina (LIN et al., 2012).

A agmatina, cujas funções se associam à modulação da função comportamental e efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (RUSHADHI et al., 2012), foi observada em 53,3% das amostras e em baixas concentrações. Serotonina não foi detectada em nenhuma amostra. Outros autores encontraram concentrações de até 133,9 mg/kg para agmatina em peixes salgados (LIN et al., 2012) e observou-se que a serotonina não foi pesquisada por outros autores em peixes salgados.

Por outro lado, os teores respectivos à putrescina e cadaverina são mais elevados, especialmente nas pescadas gó, e podem potencializar o efeito tóxico da histamina por inibirem as enzimas que metabolizam a histamina no intestino. Além disso, assim como espermidina, podem se associar à produção de nitrosaminas (MAH et al., 2002). Esses resultados chegaram a 32,8 mg/kg para putrescina, 165,7 mg/kg para cadaverina e 3,8 mg/kg para espermidina. Outros estudos realizados em feiras de outras regiões para produtos do mesmo tipo encontraram, respectivamente, concentrações até 80 mg/kg (KUNG et al., 2008), 227,8 mg/kg (LIN et al., 2012) e 42,9 mg/kg (KUNG et al., 2008). Portanto os teores encontrados em produtos do mercado Ver-o-Peso são inferiores aos reportados por outros autores.

Apesar dos teores encontrados para as diferentes aminas não representarem riscos de intoxicação quando analisados isoladamente, sabe-se que os peixes se mantêm armazenados por tempo indeterminado até que sejam vendidos. Isso torna preocupante o fato dos teores de aminas poderem aumentar com o decorrer do período de estocagem e alcançar níveis elevados no caso de continuarem armazenados por tempo muito longo em temperatura e umidade favoráveis ao crescimento de micro-organismos produtores de descarboxilases. Além disso, o consumo desses produtos aliado a outras fontes de aminas pode promover o aumento das concentrações de aminas do organismo do consumidor e ser razão de intoxicação. Sendo assim, o consumo desses produtos não pode ser considerado seguro.

5.2 Análises de peixes salgados sob condições controladas

Os peixes salgados em concentrações de NaCl de 15 e 25% acrescidos de bactérias halofílicas previamente selecionadas foram analisados quanto à umidade, atividade de água, teor de cloreto e contagem total de bactérias. Esses resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Teor de cloreto, atividade de água, umidade e contagem de bactérias em xarés salgados com NaCl nas concentrações 15 e 25% (p/p).

Tratamento	Tempo (dias)	Cloreto (%)	Aw	Umidade	Contagem de bactérias (log UFC/g)	
25% NaCl	Gram-positivas	0	2,0 ± 0,4 ^A	0,87 ± 0,003 ^A	67,54 ± 1,25 ^A	7,14 ± 0,03 ^A
		1	20,0 ± 1,5 ^B	0,77 ± 0,003 ^B	59,67 ± 1,40 ^B	7,18 ± 0,06 ^A
		2	25,0 ± 0,8 ^{BC}	0,76 ± 0,007 ^C	55,32 ± 1,72 ^B	9,09 ± 0,00 ^B
		6	26,5 ± 1,8 ^C	0,74 ± 0,001 ^D	45,80 ± 2,30 ^C	8,33 ± 0,13 ^C
		10	27,0 ± 1,9 ^C	0,73 ± 0,002 ^D	44,57 ± 2,12 ^C	6,58 ± 0,03 ^D
	Gram-negativas	0	1,7 ± 0,5 ^A	0,85 ± 0,001 ^A	66,93 ± 0,60 ^A	5,16 ± 0,13 ^A
		1	17,3 ± 1,3 ^B	0,85 ± 0,004 ^A	66,12 ± 0,9 ^A	6,59 ± 0,07 ^B
		2	22,3 ± 2,7 ^{BC}	0,76 ± 0,001 ^B	56,02 ± 1,20 ^B	8,39 ± 0,01 ^C
		6	23,5 ± 1,5 ^{BC}	0,73 ± 0,003 ^C	51,73 ± 1,12 ^{BC}	7,03 ± 0,02 ^D
		10	25,5 ± 1,5 ^C	0,73 ± 0,004 ^C	50,62 ± 0,71 ^C	6,88 ± 0,05 ^D
Gram-positivas + Gram-negativas	0	2,0 ± 0,3 ^A	0,85 ± 0,002 ^A	65,70 ± 0,91 ^A	7,55 ± 0,00 ^A	
	1	18,5 ± 1,0 ^B	0,85 ± 0,003 ^A	65,52 ± 1,27 ^A	9,30 ± 0,03 ^B	
	2	25,3 ± 0,9 ^C	0,77 ± 0,001 ^B	58,36 ± 2,43 ^{AB}	10,63 ± 0,02 ^C	
	6	25,5 ± 1,0 ^C	0,75 ± 0,001 ^C	53,24 ± 1,98 ^{BC}	9,39 ± 0,02 ^D	
	10	25,8 ± 1,8 ^C	0,73 ± 0,002 ^D	49,13 ± 2,11 ^C	7,99 ± 0,01 ^E	
15% NaCl	Gram-positivas	0	2,1 ± 0,1 ^A	0,94 ± 0,003 ^A	69,18 ± 2,33 ^A	7,84 ± 0,01 ^A
		1	12,3 ± 1,2 ^B	0,81 ± 0,002 ^B	62,18 ± 1,89 ^{AB}	8,70 ± 0,10 ^B
		2	12,8 ± 2,7 ^B	0,80 ± 0,004 ^B	60,80 ± 1,79 ^{AB}	11,57 ± 0,01 ^C
		6	15,3 ± 1,3 ^B	0,80 ± 0,002 ^B	60,62 ± 2,14 ^B	9,26 ± 0,50 ^B
		10	15,3 ± 1,0 ^B	0,80 ± 0,002 ^B	59,13 ± 1,51 ^B	7,48 ± 0,15 ^A
	Gram-negativas	0	1,3 ± 0,3 ^A	0,90 ± 0,001 ^A	72,98 ± 3,05 ^A	7,38 ± 0,01 ^A
		1	11,8 ± 1,3 ^B	0,89 ± 0,001 ^B	66,50 ± 2,23 ^{AB}	8,53 ± 0,07 ^B
		2	14,0 ± 3,0 ^B	0,83 ± 0,002 ^C	62,06 ± 1,54 ^B	11,60 ± 0,01 ^C
		6	15,3 ± 0,4 ^B	0,83 ± 0,004 ^C	61,94 ± 0,93 ^B	9,58 ± 0,02 ^D
		10	15,4 ± 0,7 ^B	0,82 ± 0,002 ^C	60,19 ± 1,36 ^B	7,06 ± 0,07 ^E
Gram-positivas + Gram-negativas	0	2,0 ± 0,3 ^A	0,91 ± 0,002 ^A	68,29 ± 2,50 ^A	7,46 ± 0,01 ^A	
	1	11,8 ± 0,8 ^B	0,84 ± 0,003 ^B	65,14 ± 1,01 ^{AB}	8,41 ± 0,01 ^B	
	2	16,0 ± 2,0 ^B	0,83 ± 0,002 ^C	62,80 ± 2,86 ^{AB}	11,04 ± 0,03 ^C	
	6	16,5 ± 1,5 ^B	0,82 ± 0,002 ^D	61,81 ± 1,12 ^{AB}	9,60 ± 0,01 ^D	
	10	15,8 ± 0,9 ^B	0,81 ± 0,002 ^E	60,17 ± 2,09 ^B	8,02 ± 0,03 ^E	

*Resultados expressos como média ± desvio padrão; as letras diferentes (A, B, C, D e E) em uma mesma coluna para cada tratamento indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias.

Pode-se observar que o teor de cloreto aumenta consideravelmente no primeiro dia para todos os tratamentos, sem variação significativa a partir do segundo dia, quando foi realizada a secagem. O teste de Tukey a 5% de probabilidade indicou que não houve diferença significativa na dinâmica de absorção de NaCl para tratamentos com mesma concentração de sal, sendo que os peixes salgados com concentração maior demoraram dois dias para o alcance do equilíbrio, enquanto que com 15% NaCl o equilíbrio foi atingido em 24h.

Confirma-se assim, mais uma vez, a importância da padronização da concentração de NaCl e tempo de salga no âmbito comercial, para que se possam esperar produtos semelhantes em diversas coletas ou compras, fato que não foi observado nos peixes adquiridos no mercado Ver-o-Peso, observados na primeira etapa deste estudo.

A atividade de água, por sua vez, iniciou com valores bastante distintos entre as diversas amostras, de 0,85 a 0,94. Esses valores iniciais eram dependentes das condições de armazenamento dos peixes frescos ainda antes de serem coletados para a salga, portanto são plausíveis. A variação da atividade de água em todos os tratamentos convergiu para os mesmos pontos nos casos de amostras submetidas à salga com mesma concentração de NaCl e, ao final do experimento, todas alcançaram a atividade de água de 0,73 quando salgadas com 25% NaCl e 0,80 a 0,82 para as amostras com 15%. Isso deixa clara a função do sal como conservador por promover a redução da atividade de água a níveis que dificultam o crescimento microbiano.

Quanto à umidade, uma vez que o NaCl é absorvido pelos filés, ela é reduzida. Os tratamentos com 25% de sal promovem a redução da umidade para valores em torno de 50% após 10 dias, como prevê a legislação (BRASIL, 2000), porém nenhuma das amostras dos tratamentos com 15% de NaCl teve a umidade reduzida aos valores previstos pela legislação em apenas 10 dias de armazenamento, havendo a convergência para o teor de umidade de 60%.

A umidade elevada nas amostras com menor concentração de NaCl é um indicador de que o peixe é um ambiente mais apropriado ao crescimento de micro-organismos do que os casos com maior quantidade de NaCl e isso se confirma na contagem de bactérias halofílicas. As bactérias halofílicas inoculadas nos peixes momentos antes da salga deveriam ser inseridas nos filés com concentração na mesma ordem, no entanto observa-se que no tempo “zero” houve uma contagem inicial menor que as demais para o tratamento de 25% de NaCl com bactérias Gram-negativas, devido a um erro na diluição do *pool* de bactérias. Apesar disso, o comportamento das curvas é semelhante para todos os tratamentos: na concentração de 15% NaCl há maior crescimento de todos os grupos de bactérias inoculadas. Isso pode ser vinculado

à observação dos demais parâmetros analisados, pois com o aumento da concentração de NaCl, há o decréscimo da atividade de água e da umidade, o que dificulta o crescimento microbiano.

Quando se faz o teste de Tukey ($p < 0,05$) incluindo todos os tratamentos (Apêndice 2), comparando as contagens de bactérias halofílicas em seu momento de máximo crescimento (2 dias), há uma peculiaridade para tratamentos com concentrações de sal iguais: o grupo que possuía 25% de NaCl e continha bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentou contagem significativamente mais elevada que os tratamentos com a mesma concentração de sal e com os grupos separados. Porém, o contrário foi observado nos tratamentos com 15% de NaCl, em que os grupos apresentaram maior crescimento quando separados do que quando dividiam o mesmo substrato.

Sabe-se que pode haver diferenças no comportamento de bactérias quando estão na presença de outros grupos de micro-organismos ou de substâncias específicas. Acerca disso, Whitehead et al. (2001) e Turan et al. (2017) explicam que bactérias não existem como células solitárias e são organismos que vivem em colônias e usam sistemas elaborados de comunicação intercelular para facilitar sua adaptação às variações nas condições ambientes.

Dentro do grupo de compostos que podem interferir nessas atividades está o NaCl, que em geral interfere de forma a inibir a produção de metabólitos pelas bactérias, porém essas relações ainda são pouco entendidas quando se trata de alimentos (MEDINA-MARTÍNEZ et al., 2006; JAHID et al., 2015). Sendo assim, os diferentes comportamentos observados no crescimento das bactérias de diferentes grupos podem ser atribuídos a essas interações, sendo que o desenvolvimento das bactérias foi estimulado de maneiras distintas nas diferentes concentrações de NaCl empregadas nas salgas.

Esses diferentes comportamentos resultaram também em dados relevantes para os níveis de aminas bioativas medidos periodicamente para as amostras de cada tratamento, que são apresentados nas Tabelas 6 e 7, para os tratamentos com 15 e 25% NaCl, respectivamente. Nelas os dados são apresentados em base seca, para que se possam comparar os resultados levando-se em consideração que a umidade varia entre as amostras de diferentes tratamentos.

Num primeiro momento é natural esperar que o teor de cada amina apenas aumente num dado tratamento com o passar do tempo, já que se sabe que as aminas biogênicas não se degradam com facilidade, nem mesmo com tratamento térmico. No entanto, percebe-se que peixes submetidos à adição de um mesmo teor de sal pode apresentarem a redução no teor de certas aminas e o acúmulo de outras.

Tabela 6. Teores, em base seca, de tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina e feniletilamina em xarés salgados com NaCl na concentração 15% (p/p).

Tratamento	Tempo (dias)	TIM (mg/kg)	PUT (mg/kg)	CAD (mg/kg)	HIM (mg/kg)	SRT (mg/kg)	AGM (mg/kg)	EPD (mg/kg)	FEM (mg/kg)
15% NaCl Gram-positivas	0	nd ¹ – 77,60	nd – 78,02	nd – 194,21	nd – 200,06	nd	nd	nd	nd
	1	62,15 – 85,04	23,99 – 33,83	79,20 – 115,70	134,94 – 168,04	nd	nd	nd	nd
	2	80,46 – 204,77	32,02 – 42,42	78,55 – 109,49	127,68 – 138,60	nd – 8,60	nd	nd	nd
	6	9,62 – 46,93	21,81 – 55,21	70,16 – 190,81	77,35 – 265,54	nd	nd	nd – 3,17	nd
	10	20,31 – 30,88	16,37 – 17,74	34,63 – 53,76	34,94 – 42,79	nd	nd	nd	nd
15% NaCl Gram-negativas	0	61,84 – 73,58	17,91 – 75,09	17,47 – 104,10	80,79 – 244,67	nd	nd	nd	nd
	1	31,16 – 74,66	11,22 – 32,00	21,16 – 85,49	28,78 – 176,21	nd	nd	nd	nd
	2	49,05 – 204,19	12,28 – 67,13	52,35 – 160,12	135,19 – 209,41	nd	nd	nd	nd
	6	2,10 – 14,27	8,60 – 14,90	16,74 – 51,39	11,51 – 85,31	nd	nd	nd	nd
	10	16,86 – 28,81	40,63 – 49,83	131,95 – 223,34	73,49 – 390,93	nd	nd	nd	nd
15% NaCl Gram-positivas + Gram-negativas	0	106,56 – 206,72	77,89 – 112,46	58,59 – 326,55	112,74 – 557,14	nd	nd	nd	nd
	1	20,68 – 52,58	6,43 – 33,13	19,74 – 34,56	16,78 – 38,64	nd	nd	nd	nd
	2	69,01 – 104,11	42,85 – 51,13	51,75 – 91,69	131,05 – 226,37	nd	nd	nd	nd
	6	19,51 – 34,12	19,25 – 20,82	16,92 – 45,64	24,98 – 80,96	nd – 9,92	nd	nd – 3,17	nd
	10	7,53 – 46,67	6,40 – 51,57	8,44 – 59,83	15,59 – 52,27	nd	nd	nd	nd

¹nd = não detectado (<0,4 mg/kg);

*Resultados expressos como faixa de variação; tiramina (TIM), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), histamina (HIM), serotonina (SRT); agmatina (AGM); espermidina (EPD); feniletilamina (FEM).

Tabela 7. Teores, em base seca, de tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina e feniletilamina em xarés salgados com NaCl na concentração 25% (p/p).

Tratamento	Tempo (dias)	TIM (mg/kg)	PUT (mg/kg)	CAD (mg/kg)	HIM (mg/kg)	SRT (mg/kg)	AGM (mg/kg)	EPD (mg/kg)	FEM (mg/kg)
25% NaCl Gram-positivas	0	nd ¹	5,73 – 7,24	3,97 – 8,93	nd	nd	nd – 7,27	8,13 – 11,46	nd
	1	2,36 – 11,55	12,35 – 20,18	nd	nd	nd – 9,55	10,17 – 13,07	nd	nd
	2	30,68 – 34,74	17,03 – 27,46	15,40 – 50,90	nd	nd – 9,11	6,13 – 30,15	9,58 – 10,21	nd
	6	nd – 28,10	6,40 – 8,58	8,43 – 9,34	nd	6,25 – 9,96	6,34 – 41,70	5,50 – 5,98	nd
	10	13,46 – 13,46	6,17 – 7,76	9,11 – 13,82	nd	5,70 – 5,95	3,86 – 5,76	5,21 – 5,32	nd
25% NaCl Gram-negativas	0	nd	6,14 – 19,63	11,34 – 14,64	nd	nd	nd	10,92 – 11,64	nd
	1	nd - 5,99	13,52 – 15,41	30,05 – 48,61	nd	nd – 10,27	18,24 – 47,79	11,72 – 15,26	nd – 8,97
	2	nd – 15,08	6,91 – 7,59	11,21 – 11,76	nd	nd	6,55 – 7,30	9,64 – 10,53	nd
	6	nd – 2,65	7,79 – 8,18	8,74 – 16,47	nd	nd – 7,21	5,68 – 9,07	7,40 – 8,39	nd – 2,96
	10	15,17 – 16,32	8,08 – 8,10	10,19 – 11,39	nd	6,80 – 7,29	5,79 – 5,85	5,16 – 6,76	nd – 3,85
25% NaCl Gram-positivas + Gram-negativas	0	14,23 – 101,17	27,87 – 47,96	39,01 – 94,17	94,94 – 172,30	nd	nd	nd	nd
	1	59,60 – 60,96	14,88 – 38,17	15,60 – 51,60	67,00 – 151,04	nd	nd – 8,82	nd – 5,89	nd
	2	10,83 – 20,51	4,59 – 7,64	6,22 – 12,27	14,39 – 21,54	nd	3,58 – 4,27	nd	nd
	6	40,37 – 66,96	25,35 – 34,84	39,25 – 78,94	102,20 – 122,14	nd – 9,06	6,31 – 30,03	nd – 5,50	nd
	10	10,73 – 66,58	23,02 – 42,05	21,39 – 94,28	12,27 – 157,18	nd – 4,68	nd	nd	nd

¹nd = não detectado (<0,4 mg/kg);

*Resultados expressos como faixa de variação; tiramina (TIM), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), histamina (HIM), serotonina (SRT); agmatina (AGM); espermidina (EPD); feniletilamina (FEM).

Quanto a essas variações nos teores de amins com o passar do tempo, Lee et al. (2016) descrevem que a adição de culturas *starter* fermentadoras podem reduzir a produção de amins quando essa é comparada a peixes salgados não adicionados de bactérias, e isso ocorre por essas culturas competirem com colônias produtoras de descarboxilases presentes nesses alimentos, mas também por degradarem as amins produzidas por essas colônias. O mesmo é demonstrado por Mah et al. (2002), Mah & Hwang (2009) e Zaman et al. (2011) em diferentes peixes salgados e fermentados. Os peixes do presente estudo não são fermentados, porém as bactérias inoculadas não foram identificadas, sendo que a produção de amins em diferentes níveis nos diversos tratamentos pode ser decorrente de interações do mesmo tipo descrito por Lee et al. (2016). Assim, o aumento e redução nos teores sem a observação de um padrão comum a todos os tratamentos sugere que ao mesmo tempo que as amins são produzidas pela ação dos microorganismos ou demais vias biossintéticas, elas estão sendo degradadas por outros microorganismos ou expelidas.

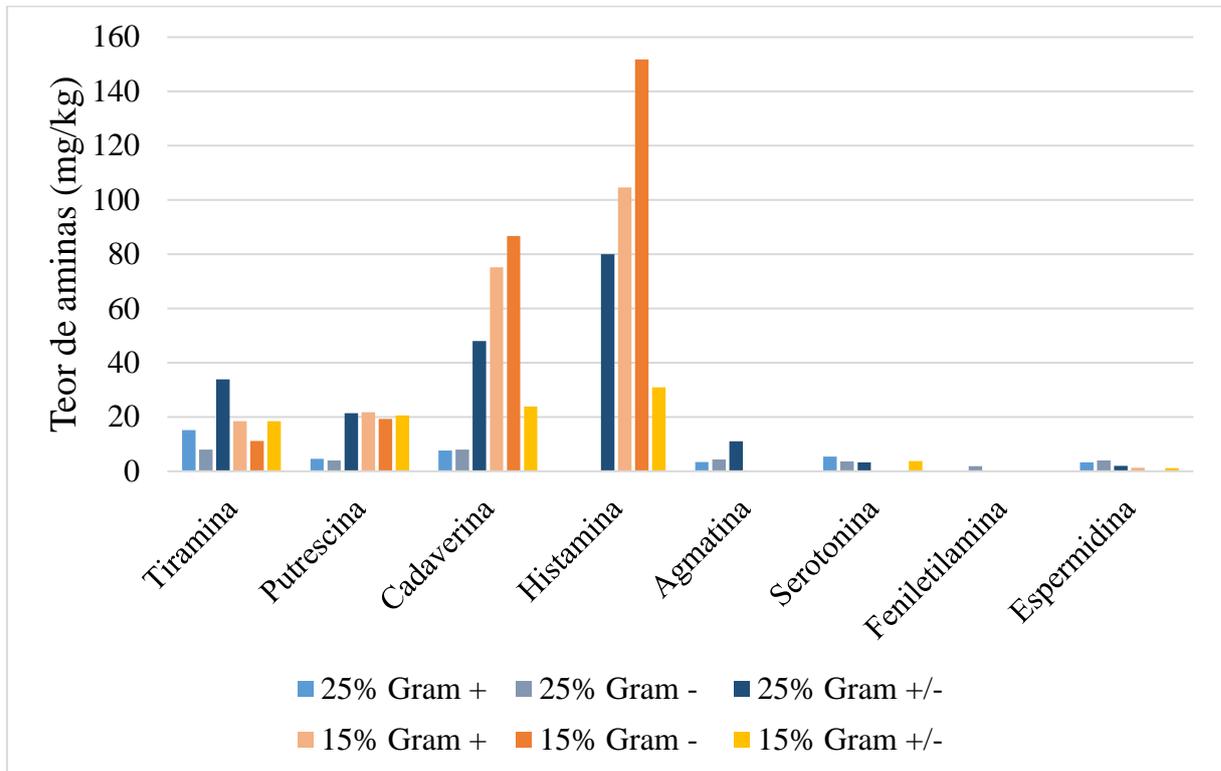
Os resultados mostram que o acúmulo de amins está sendo interrompido pela retirada de certa quantidade de amins dos peixes, não pela temperatura aplicada na secagem, pois elas são termorresistentes (LIMA & GLÓRIA, 1999), mas pela perda de água durante a salga, uma vez que são hidrossolúveis (KALAC & KRAUSOVÁ, 2005; MOINARD et al., 2005) e podem ser solubilizadas na salmoura (MAH et al., 2002). Conclui-se então que pode ter ocorrido a dissolução das amins na salmoura formada quando o sal foi absorvido e o peixe desidratado, processo resultante também da secagem, que foi realizada no segundo dia após a salga.

É interessante observar que a histamina não foi detectada em nenhuma amostra dos tratamentos com 25% de NaCl em que os grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram inoculados separadamente, no entanto o tratamento com mesma concentração de sal em que as bactérias foram inoculadas juntas, os teores de histamina foram elevados, alcançando até 172,3 mg/kg em base seca (ou 59,10 mg/kg em base úmida). Por outro lado, com 15% de NaCl observou-se a produção de histamina em todos os tratamentos.

Sabendo-se que *quorum sensing* é a regulação das expressões de fenótipo das bactérias de forma dependente da densidade celular (MOROHOSHI et al., 2004) esse conceito pode ser observado, uma vez que os grupos de bactérias que apresentaram maior crescimento estão associados às maiores incidências na produção de histamina. A visualização desses dados fica clara na Figura 10, que apresenta os teores máximos acumulados de cada amina nos diferentes tratamentos considerando apenas os dados após a salga e secagem dos filés, em base úmida. O mesmo ocorre também para tiramina, putrescina e cadaverina, pois nota-se que os intervalos de

variação incluem teores bem menores para os tratamentos com 25% de NaCl e grupos de bactérias inoculados separadamente com relação aos demais tratamentos.

Figura 10. Teores máximos de amins detectados após salga e secagem de filés de xaréu, em base úmida.



As reações de descarboxilação por enzimas bacterianas são a principal via de formação das amins nos alimentos, mas deve-se lembrar que podem ser formadas por outras vias biossintéticas (SHALABY, 1996; GLÓRIA, 2005). Assim, além dos mecanismos de *quorum sensing*, a formação de histamina apenas em filés com 15% de NaCl pode ser associada também a esses outros fatores. Nos casos com produção de metabólitos controlada por mecanismos de *quorum sensing*, Whitehead et al. (2001) e Turan et al. (2017) explicam que bactérias Gram-positivas geralmente usam aminoácidos e peptídeos de cadeia curta na produção de moléculas sinalizadoras, enquanto Gram-negativas frequentemente usam ácidos graxos e derivados.

As espécies de bactérias envolvidas no presente estudo não foram identificadas, mas é didática a explicação feita por Gram & Dalgaard (2002) para elucidar as interações que ocorrem entre bactérias ácido-lácticas (LAB) e bactérias da família *Enterobacteriaceae* em pescado: LAB (Gram-positivas) podem degradar a arginina em ornitina, que é então degradada a

putrescina por enterobactérias (Gram-negativas), resultando em níveis 10 a 15 vezes mais elevados de putrescina do que quando enterobactérias crescem na ausência de LAB. Esses mecanismos de *quorum sensing* e as inibições no crescimento de bactérias pela adição de NaCl são importantes para entender os menores teores de algumas das aminas biogênicas observados nos produtos com mais NaCl.

Apesar de não ser possível afirmar que bactérias fermentadoras estão presentes, a formação de tiramina, que é mais associada a queijos e produtos fermentados do que a peixes frescos (SILVA et al., 2002), pode ser um indicativo de sua presença. Conforme Costa & Glória (2003), a ingestão de 3 mg de tiramina pode ser associada a dores de cabeça e Lima & Glória (1999) sugerem níveis aceitáveis de até 80 mg/100 g de alimento, e nenhum dos tratamentos alcança esse limite, mesmo em momentos anteriores à secagem.

Ao contrário da histamina, que apresentou incidência bem mais elevada em peixes com menor concentração de sal, a agmatina, que está associada a efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (RUSHADHI et al., 2012), não teve concentrações detectadas em nenhum dos tratamentos com 15% de NaCl.

Serotonina, feniletilamina e espermidina foram detectadas com maior frequência em amostras com 25% de NaCl: até 10,27 mg/kg para serotonina e 15,26 mg/kg para espermidina e 8,97 mg/kg de feniletilamina, em base seca. Todos esses máximos se deram no tratamento com bactérias somente Gram-negativas e sempre antes da secagem, após a qual os teores foram reduzidos. A presença da poliamina espermidina era esperada, pois está presente naturalmente nos tecidos vivos e atua como fator de crescimento celular (GLÓRIA et al., 1999; RUIZ-CAPILLAS e MORAL, 2001) e a feniletilamina foi produzida somente no tratamento com bactérias Gram-negativas e 25% NaCl. A triptamina não foi encontrada em nenhuma amostra.

Além dos fatores já comentados, de *quorum sensing* (que regula a produção de determinados compostos pelos micro-organismos) e do teor de sal adicionado (que promove a desidratação e crescimento bacteriano de formas distintas), as diferenças nos conteúdos de aminas bioativas apresentados nos diferentes tratamentos podem ser explicadas por outros elementos, como sexo, teor de aminoácidos livres, tempo de transporte até o local de venda, tempo de armazenamento sob refrigeração e sob temperatura ambiente, período que o peixe ficou no mercado até ser coletado, conteúdo intestinal no momento do abate e fase de reprodução quando capturado (ABABOUCHE et al., 1991; HALASZ et al., 1994). Todos esses parâmetros não puderam ser controlados e o fato de ter havido duas coletas sugere ainda maior

heterogeneidade nos tratamentos dados aos diferentes peixes nos momentos antes de serem coletados no mercado, tornando mais heterogênea também a distribuição das diferentes amins desde o tempo zero, em que as amostras foram analisadas inicialmente.

Tratando-se dos níveis encontrados para o total de amins e os limites máximos sugeridos para o consumo seguro, sem haver efeitos adversos, Silla-Santos (1996) propõem um máximo de 100 mg de amins totais por 100 g de alimento e Ladero et al. (2011) sugerem 750 a 900 mg/kg. Mesmo que sejam somados os valores máximos de amins encontrados em cada tratamento, apenas as amostras do tratamento com 15% NaCl com bactérias Gram-positivas e negativas no tempo zero os atingem, se analisados em base seca. Em base úmida, que é a forma como o produto será consumido, o mesmo tratamento não chega a alcançar esses teores indicados como perigosos e, de qualquer forma, após a secagem, mesmo antes do final dos 10 dias de tratamento, o mesmo grupo de amostras já apresenta teores de amins reduzidos.

Um estudo individual, no entanto, mostra que os tratamentos com 15% de NaCl permitem a produção de histamina a níveis maiores que os exigidos pela legislação brasileira (até 176,67 mg/kg, em base úmida), enquanto isso não foi observado em nenhum tratamento com 25% de sal (com teores até 79,96 mg/kg). Com 25% NaCl, apesar da interação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas representar um risco de maior produção de amins biogênicas do que separadamente, quando se tratam de amins que são conhecidas por causar adversidades à saúde dos consumidores (histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina), os tratamentos com 25% NaCl sempre foram eficientes ao evitar sua produção ou mantê-las abaixo dos níveis indicados como perigosos.

De maneira geral, o acréscimo de 25% de NaCl se apresentou como um procedimento mais vantajoso, pois além de possibilitar que todas as amostras se enquadrem nos limites de umidade esperados pela legislação, permite que a histamina se acumule em quantidades menores que os limites máximos indicados nas legislações brasileira e norte-americana. Além disso, a agmatina, que possui efeitos neuroprotetores, mostrou maior incidência em tratamentos com mais sal.

6 CONCLUSÃO

As análises de peixes salgados coletados no Mercado Ver-o-Peso mostraram que os produtos comercializados são impróprios para consumo, uma vez que todas as amostras ultrapassaram os limites definidos pela legislação quanto à quantidade de estafilococos. Apesar de não apresentarem altos níveis de aminas biogênicas e os teores encontrados estarem dentro dos limites previstos pela legislação brasileira, norte-americana e europeia, a associação do consumo de pescado salgado proveniente do complexo do Ver-o-Peso com outras fontes de aminas pode causar danos à saúde do consumidor, como intoxicações alimentares e enxaqueca.

A observação do local de comercialização e os relatos de colaboradores que trabalham no local levaram à conclusão de que são necessários treinamentos aos manipuladores de pescado em boas práticas de manipulação, mudanças estruturais em alguns pontos do mercado e a padronização do processo de salga.

A segunda fase da pesquisa trouxe como respostas os padrões que podem ser adotados para padronizar as características finais desses produtos: 25% de NaCl a ser adicionado em relação à massa inicial de peixe e salga durante um período de 10 dias. Esses são parâmetros adequados para que se alcancem os limites mínimos de teor de cloreto e máximos de umidade previstos pelas normas brasileiras. Além disso, o estudo de peixes salgados sob condições controladas indicou que o processo de secagem teve impacto positivo ao ser associado à salga, promovendo a redução da quantidade de aminas bioativas no pescado, por serem compostos hidrossolúveis liberados juntamente com a água que é drenada com a desidratação do produto.

Quanto ao crescimento de micro-organismos, observou-se que as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas se comportaram de maneiras opostas quando submetidas às duas diferentes concentrações de NaCl estudadas. Nos peixes com 25% NaCl, quando cresciam juntos, os dois grupos apresentavam maior crescimento do que crescendo separadamente e, devido a mecanismos relacionados a *quorum sensing*, colaboravam para o maior acúmulo de tiramina, histamina, putrescina, cadaverina e agmatina. Com 15% NaCl, cresciam mais quando inoculadas separadamente e produziam maiores concentrações dessas aminas. Ao mesmo tempo, nos tratamentos com 25% NaCl houve também a formação de mais agmatina, que possui efeitos neuroprotetores. Sendo assim, a salga com 25% NaCl seguida de secagem se mostrou um método adequado para a preparação de peixes salgados seguros para o consumo humano se aplicadas as boas práticas de manipulação.

7 REFERÊNCIAS

- ABABOUC, L.; AFILAL, M.E.; BENABDELJELIL, H.; BUSTA, F.F. (1991). Quantitative changes in bacteria amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28 °C) and in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 3 (26), 297-306.
- ACKMAN, R.G. (1999). Nutricional composition of fats in seafoods. *Progress in Food Nutrition Science*, 13, 161-241.
- AMARO, C. S. O., RODRIGUES JUNIOR, D., SILVA, M. C. F., LIMA, A. A. S., SANTOS, G. F. S., PINHEIRO, M. C. N. (2014). Concentração de mercúrio total (Hg-T) em peixes comercializados em diferentes períodos sazonais no Mercado do Ver-o-Peso, Belém, Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5 (1), 53-60.
- ANDRADE, J.C.P., SCHIAVETTI, A. (2015). Artisanal fishing and local conflicts: the case of the 'Pedras de Una' fishing community, Bahia, Brazil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 15 (3), 425-438.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists (1997). *Official methods of analysis of the AOAC International*. 16.ed. 3.rev., Washington, 1141p.
- ARMENTEROS, M., ARISTOY, M.C., BARAT, J.M., TOLDRÁ, F. (2009). Biochemical changes in dry-cured loins salted with partial replacements of NaCl by KCl. *Food Chemistry*, 117, 627-633.
- AVIZ, A. (2006). As empresas pesqueiras de Icoaraci – Pará: Algumas considerações. *Amazônia: Ciência & Desenvolvimento*, 2 (3).
- BARDÓCZ, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends of Food Science and Technology*, 6, 341-346.
- BASTOS, J.R. (1988). Processamento e conservação do pescado. *Manual sobre manejo de reservatórios para a produção de peixes*. Itália, FAO.
- BJORNSDOTTIR, K., BOLTON, G.E., MCCLELLAN-GREEN, P.D., JAYKUS, L.A., GREEN, D.P. (2009). Detection of gram-negative histamine-producing bacteria in fish: A comparative study. *Journal of Food Protection*, 72, 1987-1991.

BLASZCZYK, A., AUGUSTYNIAK, A., SKOLIMOWSKI, J. (2013). Ethoxyquin: an antioxidant used in animal feed. *International Journal of Food Science*, 2013; p. 1-12.

BLODGETT, R. (2001). Appendix 2: most probable number from serial dilutions. In: Food and Drug Administration – FDA. *Bacteriological Analytical Manual online*. FDA/CFSAN. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~eban/ban-a2.html>>. Acesso em: 18 de outubro de 2016.

BRAGADÓTTIR, M., REYNISSON, E., ÞÓRARINSDÓTTIR, K.A., ARASON, S. (2007). Stability of fish powder made from Saithe (*Pollachius virens*) as measured by lipid oxidation and functional properties. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 16 (1), 115-136.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (1997a). Portaria n° 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 19 de maio de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde (1997b). Portaria n° 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Condições Higiênicas-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos, *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 30 de julho de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2000). Portaria n° 52, de 29 de dezembro de 2000. Regulamento Técnico de identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 04 de janeiro de 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2001) Resolução RDC n° 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2002). Resolução RDC n° 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial da União*, 06 de novembro de 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. (2003). Instrução Normativa n° 62, de 26 de Agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2007). Comercialização de Pescado Salgado e Pescado Salgado Seco: Cartilha Orientativa. Brasília: ANVISA/ABRAS. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 30 de agosto de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2011). Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Pescado e seus Derivados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 3 de junho de 2011.

CACCIOPPOLI, J.; CUSTÓDIO, F.B.; VIEIRA, S.M.; COELHO, J.V.; GLÓRIA, M.B.A. (2006). Aminas bioativas e características físico-químicas de salames tipo italiano. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58 (4), 648-657.

CERVIGÓN, F. (1993). *Los peces marinos de Venezuela*. v. 2, 2ª ed. Caracas, Venezuela. Fundación Científica Los Roques, 498 p.

CHAIJAN, M.(2011). Physicochemical changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle during salting. *Food Chemistry*, 129, 1201-1210.

CHANG, S.F.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.S. (1985). Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. *Journal of Dairy Science*, 68, 2840-2846.

CHANG, S. C., KUNG, H. F., CHEN, H. C., LIN, C. S., TSAI, Y. H. (2008). Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. *Food Control*, 19, 16-21.

CHAO, L.N. (1978). Sciaenidae. In FISCHER, W. (ed.) *FAO species identification sheets for fishery purposes*. West Atlantic (Fishing Area 31). Volume 4. FAO, Rome.

CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; BACCELLIERE, R.; COZZANI, R. (2004). Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1032, 79-85.

COSTA, M.R.; GLÓRIA, M.B.A. (2004). Migraine and Diet. *Elsevier Science*, 3940-3947.

DAMASCENO, E.I.T., PANTOJA, L.N.G., FIGUEIREDO, H.M., SILVA, L.H.M., RODRIGUES, A.M.C. (2015). Microbiota of two species of commercially important fish in the Amazon region (Belém-Pará-Brazil): Butterfly peacock bass (*Cichla ocellaris*) and Piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*). *African Journal of Microbiology Research*, 9 (9), 572-580.

- DIEGUES, A. C. (2001). *Ecologia Humana e Planejamento em Áreas Costeiras*. 2ª ed. São Paulo. USP. 225p.
- DUFLOS, G.; DERVIN, C.; MALLE, P.; BOUQUELET, S. (1999). Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, Arlington, 82 (5), 1097-1101.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9 (10), 2392.
- FAN, H., LUO, Y., YIN, X., BAO, Y., FANG, L. (2014). Biogenic amine and quality changes in lightly salt- and sugar-salted black carp (*Mylopharyngodon piceus*) fillets stored at 4 °C. *Food Chemistry*, 159, 20–28.
- FLICK, G. J.; GRANATA, L. A. (2005). Biogenic Amines in Foods. In: DABROWSKI W. M., SIKORSKI, Z. E. (Eds.). *Toxins in Food*. Chemical and Functional Properties of Food Components Series. CRC Press, 121-154.
- GALLART-JORNET, L., BARAT, J.M., RUSTAD, T., ERIKSON, U., ESCRICHE, I., FITO, P. (2007). A comparative study of brine salting of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Engineering*, 79, 261–270.
- GIROTTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, S. M. C. (2010). Aminas biogênicas em embutidos cárneos e em outros alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13 (1), 1-10.
- GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A.; CRAVEN, C.; HILDERBRAND Jr., K.S. (1999). Histamine and other biogenic amines in albacore tuna. *Journal of Aquatic Food Products and Technology*, 8 (4), 55-69.
- GLÓRIA, M.B.A. (2005). Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed. Marcel Dekker, 4, p. 1-38.
- GONÇALVES, A.A. (2011). *Tecnologia do Pescado*. Ed. Atheneu: São Paulo.
- GRAM, L., HUSS, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 17-26.
- GRAM, L.; DALGAARD, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Environmental Biotechnology*, 13, 262-266.

- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 42-49.
- HARVEY, R.A., FERRIER, D.R. (2012). *Bioquímica ilustrada*. Porto Alegre: Artmed.
- HASSOUN, A. KAROUI, R. (2016). Monitoring changes in whiting (*Merlangius merlangus*) filets stored under modified atmosphere packaging by front face fluorescence spectroscopy and instrumental techniques. *Food Chemistry*, 200, 343-53.
- HUNGERFORD, J. M. (2010). Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, 56, 231–243.
- IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (1985). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. In: *Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. 3^a ed. São Paulo: IMESP.
- IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (2008). *Métodos físico-químicos para análises de alimentos*. 3^a ed. São Paulo: IAL.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specification for Foods. (2005). *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*, 2^a ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- IKONIC, P., TASIC, T., PETROVIC, L., ŠKALJAC, S., JOKANOVIC, M., MANDIC, A. (2013). Proteolysis and biogenic amines formation during the ripening of Petrovská klobása, traditional dry-fermented sausage from Northern Serbia. *Food Control*, 30, 69–75.
- IKUTEGBE, V., SIKOKI, F. (2014). Microbiological and biochemical spoilage of smoke-dried fishes sold in West African open markets. *Food Chemistry*, 161, 332-336.
- ISAAC, V.J., ALMEIDA, M.C., CRUZ, R.E.A., NUNES, L.G. (2015). Artisanal fisheries of the Xingu River basin in Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Biology*, 75 (3), 125-137.
- ISBERG, V., PAINE, J., LETH-PETERSEN, S., KRISTENSEN, J.L., GLORIAM, D.E. (2013). Structureactivity relationships of constrained phenylethylamine ligands for the serotonin 5-HT₂ Receptors. *PLoS One*, 8 (11), 7851-7855.
- JAHID, I.K., MIZAN, F.R., HA, A.J., HA, S.D. (2015). Effect of salinity and incubation time of planktonic cells on biofilm formation, motility, exoprotease production and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila*. *Food Microbiology*. 49, 142-151.

JITTINANDANA, S., KENNEY, P.B., SLIDER, S.D., KISER, R.A. (2002). Effect of brine concentration and brining time on quality of smoked rainbow trout fillets. *Journal of Food Science*, 67, 2095–2099.

JURAS, A.A., YAMAGUTI, N. (1985). Food and feeding habits of King weakfish, *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801) caught in the southern coast of Brazil (Lat. 29o to 32oS). *Boletim do Instituto Oceanográfico*, 33(2), 149-157.

KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90 (1-2), 219-230.

KARAÇAM, H., KUTLU, S., KÖSE, S. (2002). Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 19-28.

KARPINSKA-TYMOSZCZYK, M. (2014). The effect of antioxidants, packaging type and frozen storage time on the quality of cooked turkey meatballs. *Food Chemistry*, 148, 276–283.

KUNG, H.F., CHIEN, L.T., LIAO, H.J., LIN, C.S., LIAW, E.T., CHEN, W.C., TSAI, Y.H. (2008). Chemical characterisation and histamine-forming bacteria in salted mullet roe products. *Food Chemistry*, 110, 480–485.

KUNG, H.F., HUANG, C.Y., LIN, C.M., LIAW, L.H., LEE, Y.C., TSAI, Y.H. (2015). The histamine content of dried flying fish products in Taiwan and the isolation of halotolerant histamine-forming bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23, 335-342.

LADERO, V.; CALLES-ENRÍQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M.A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 145-156.

LALITHA, K.V., SURENDRAN, P.K. (2006). Microbiological changes in farm reared freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ice. *Food Control*, 17, 802-807.

LEE, Y.C., KUNG, H.F., HUANG, C.Y., HUANG, T.C., TSAI, Y.H. (2016). Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24, 157-163.

LEHANE, L., OLLEY, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 1–37.

- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. (1999). Aminas bioativas em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33, 70-79.
- LIMA, E.J.V.M.O; SANT'ANA, L.S. (2011). Nota científica: Determinação de atividade de água, umidade e sal em peixes salgados e secos importados. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14 (2), 125-129.
- LIN, C.S., LIU, F.L., LEE, Y.C., HWANG, C.C., TSAI, Y.H. (2012). Histamine contents of salted seafood products in Taiwan and isolation of halotolerant histamine-forming bacteria. *Food Chemistry*, 131, 574–579.
- LINS, P.M.O. (2011). *Beneficiamento do pescado*. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA).
- LOURENÇO, L.F.H.; FERNANDES, G.M.L.; CINTRA, I.H.A. (2001). Características físicas, químicas e microbiológicas da pescada-branca *Plagioscion squamosissimus* (Heckel) salgada e seca em secador solar. *Boletim Técnico Científico CEPNOR/IBAMA*, 1 (1), 135-144.
- LOURENÇO, L.F.H.; AMANAJÁS, C.C.; SOUSA, A.; VIEIRA, L.L. (2002). Pirarucu salgado consumido em Belém tem baixa qualidade. *Jornal Beira Rio – UFPA*, Belém, 16 de junho de 2002.
- LOURENÇO, L.F.H., SANTOS, D.C., RIBEIRO, S.C.A., ALMEIDA, H., ARAÚJO, E.A.F. (2011). Study of adsorption isotherm and microbiological quality of fish meal type “piracuí” of Acari-Bodo (*Liposarcus pardalis*, Castelnau, 1855). *Procedia Food Science*, 1, 455–462.
- LUNDBERG, J.G., LITTMANN, M.W. (2008). *Pimelodidae* (Long-whiskered catfishes). In REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C.J. (eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 432-446.
- LUQUE, J.L., ALVES, D.R. (2001). Ecologia das comunidades de metazoários parasitos, do xaréu *Caranx hippos* (Linnaeus) e do xerelete, *Caranx tatus* Agassiz (*Osteichthyes*, *Carangidae*) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18 (2), 399-410.
- MAH, J.H., HANA, H.K., OHB, Y.J., KIMC, M.G., HWANG, H.J. (2002). Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. *Food Chemistry*, 79, 239–243.

- MAH, J.H., HWANG, H.J. (2009). Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*, 20, 796-801.
- MALLE, P.; VALLE, M.; BOUQUELET, S. (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal of the Association of Official and Analytical Chemists International*, Arlington, 79 (1), 43-49.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. (2000). The capacity of *enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Letters of Applied Microbiology*, 31, 169-173.
- McCABE-SELLERS, B.J.; STAGGS, C.G.; BOGLE, M.L. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 558-565.
- MEDINA-MARTÍNEZ, M.S., UYTENDAELE, M., DEMOLDER, V., DEBEVERE, J. (2006). Influence of food system conditions on *N*-acyl-L-homoserine lactones production by *Aeromonas* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 244-252.
- MOHAMED, R., LIVIA, S.S., HASSAN, S., SOHER, E., AHMED-ADEL, E.B. (2009). Changes in free amino acids and biogenic amines of Egyptian salted-fermented fish (*Feseekh*) during ripening and storage. *Food Chemistry*, 115, 635–638.
- MONAIRD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, 184-197.
- MOROHOSHI, T., INABA, T., KATO, N., KANAI, K., IKEDA, T. (2004). Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98 (4), 274-281.
- MOURÃO, K.R.M., FRÉDOU, F.L., ESPÍRITO-SANTO, R.V., ALMEIDA, M.C., SILVA, B.B., FRÉDOU, T., ISAAC, V. (2009). Sistema de produção pesqueira de pescada amarela – *Cynoscion acoupa* Lacèpede (1802): Um estudo de caso no litoral nordeste do Pará-Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 35(3), 497-511.
- NASCIMENTO-NETO, F. (2003). *Roteiro para elaboração de manual de boas práticas de fabricação (BPF) em restaurantes*. São Paulo: Editora Senac São Paulo.

- NATES, V.A., FERREIRA, M.W., TRINDADE, C.S.P.C., SANTOS, R.M., SILVA, T.A.S., VALADARES, R.S.S. (2014). Filés de tambacu submetidos a salga seca e salga úmida. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 15 (2), 450-458.
- NGUYEN, M.V., THORARINSDOTTIR, K.A., GUDMUNSDOTTIR, A., THORKELSSON, G., ARASON, S. (2011). The effects of salt concentration on conformational changes in cod (*Gadus morhua*) proteins during brine salting. *Food Chemistry*, 125, 1013–1019.
- NUNES, E.S.C.L.; FRANCO, R.M.; MÁRSICO, E.T.; NOGUEIRA, E.B.; NEVES, M.S.; SILVA, F.E.R. (2012). Presença de bactérias indicadores de condições higiênico-sanitárias e de patógenos em Pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) salgado seco comercializado em supermercados e feiras da cidade de Belém, Pará. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 19 (2), 98-103.
- OLIVEIRA, H.A.C.; SILVA, H.C.M.; SAMPAIO, A.H.; VIANA, F.A.; SAKER-SAMPAIO, S. (2004). Determinação de histamina usando cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados. *Ciência Agrônômica*, 35, número especial, 179-188.
- ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486.
- PACQUIT, A., FRISBY, J., DIAMOND, D., LAU, K.T., FARRELL, A., QUILTY, B., DIAMOND, D. (2007). Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry*, 102, 466–470.
- PANTAZI, D., PAPAVERGOU, A., POURNIS, N., KONTOMINAS, M.G., SAVVALDIS, I.N. (2008). Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: microbiological, biochemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 25 (1), 136-143.
- PARK, J. S., LEE, C. H., KWON, E. Y., LEE, H. J., KIM, J. Y., KIM, S. H. (2010). Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Control*, 21 (9), 1219-1226.
- PEREIRA, L., PINHEIRO, A.N., SILVA, G.C. (2014). *Boas práticas na manipulação de alimentos*. 6 reimp. Rio de Janeiro: SENAC Nacional. 96 p.
- PONTES, I. (2000). A pesca industrial do Pará. *Sinpesca* (informativo), Belém.

- QUANG, N.H. (2005). *Guidelines for handling and preservation of fresh fish for further processing in Vietnan*. Iceland: Seafood Export and Quality Improvement Program, The United Nations University (Final Project).
- RAI, B.K., TAWA, G.J., KATZ, A.H. HUMBLET, C. (2009). Modeling G protein-coupled receptors for structure-based drug discovery using low-frequency normal modes for refinement of homology models: Application to H3 antagonists. *Proteins*, 78, 457 – 473.
- RAJAN, L.A.; JOSEPH, T.C.; THAMPURAN, N.; JAMES, R. (2010). Studies on the microbial diversity of salted fishes under aerobic conditions. *Microbiology Research*, 2 (4), 22-25.
- RAMOS-JIMÉNEZ, J., GARDUÑO-TORRES, B., ARIAS-MONTAÑO, J.A. (2009). Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Annual review of biomedical engineering*, 20, 100-126.
- RIBEIRO, A.L.M.S., OLIVEIRA, G.M., FERREIRA, V.M., PEREIRA, M.M.D., SILVA, P.P.O. (2009). Avaliação microbiológica de qualidade de pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 16 (3), 109-112.
- ROCHA, C.A.M.; ROCHA, S.M. (2007). Levantamento e caracterização dos peixes mais frequentes no mercado público do Ver-o-Peso, Belém – Pará. *59ª reunião anual da SBPC*. Belém, jul/2007.
- ROHDE, A., HAMMERL, J.A., APPEL, B., DIECKMANN, R., DAHOUK, S.A. (2015). FISHing for bacteria in food - A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? *Food Microbiology*, 46, 395-407.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, A. (2001). Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, 66, 1030–1032.
- RUSHAIDHI, M., JUNG, Y., KENNARD, J.T., COLLIE, N.D., WILLIAMS, J.M., ZHANG, H., LIU, P. (2012). Aging affects L-arginine and its metabolites in memory-associated brain structures at the tissue and synaptoneurosome levels. *Neuroscience*, 209, 21-31.
- SANTIAGO-SILVA, P.; LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A. (2011). Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food Research International*, 44, 1264-1268.

- SANT'ANA, L.S. (2003). Influência do alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.) na atividade de água e oxidação lipídica de peixes de uma espécie de tilápia (*Oreochromis ssp.*-var. vermelha Flórida) submetidos a salga. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 6 (1), 51-55.
- SANTOS, M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Food Microbiology*, 29, 213-231.
- SANTOS-JÚNIOR, C.J. (2011). *Manual de BPF, POP e registros em estabelecimentos alimentícios: guia técnico para elaboração*. Rio de Janeiro: Editora Rubio.
- SCANO, P.; ROSA, A.; PISANO, M.B.; PIRAS, C.; COSENTINO, S.; DESSI, M.A. (2013). Lipid componentes and water soluble metabolites in salted and dried tuna (*Thunnus thynnus* L.) roes. *Food Chemistry*, 138, 2115-2121.
- SHALABY, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675-690.
- SILLA-SANTOS, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.
- SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry*, 78, 214-248.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A, SILVEIRA, N.L.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. (2007). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3ª ed. Livraria Varela: São Paulo. 552 p.
- SILVA, T.M. (2008). *Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG, 103 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- SILVA, T.M; SABAINI, P.S., EVANGELISTA, W.P., GLORIA, M.B.A. (2011). Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. *Food Control*, 22, 323-327.
- SOARES, KM.P., GONÇALVES, A.A. (2012). Qualidade e segurança do pescado. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71 (1), 1-10. São Paulo.

- SOUZA, F.C.A.; JESUS, R.S.; DUNCAN, W.L.P.; AGUIAR, J.P.L. (2013). Efeito do congelamento na composição química e perfil de aminoácidos da carne mecanicamente separada de peixes amazônicos. *Revista Pan Amazônica de Saúde*, 4 (1), 57-61.
- TAHMOUZI, S; KHAKSAR, R.; GHASEMLOU, M. (2011). Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry*, 126, 756-761.
- TANASUPAWAT, S., NAMWONG, S., KUDO, T., ITOH, T. (2009). Identification of halophilic bacteria from fish sauce (nam-pla) in Thailand. *Journal of Culture Collections*, 6, 69-75.
- TAYLOR, W.R., MENEZES, N.A. (1978). Ariidae. In W. Fischer (ed.) *FAO species identification sheets for fishery purposes*. West Atlantic (Fishing Area 31). volume 1. [pag. var.]. FAO, Rome.
- THORARINSDOTTIR, K.A., ARASON, S., SIGURGISLADOTTIR, S., VALSDOTTIR, T., TORNBERG, E. (2011a). Effect of different pre-salting methods on protein aggregation during heavy salting of cod fillets. *Food Chemistry*, 124, 7–14.
- THORARINSDOTTIR, K.A., ARASON, S., SIGURGISLADOTTIR, S., GUNNLAUGSSON, V., TORNBERG, E. (2011b). The effects of salt-curing and salting procedures on the microstructure of cod (*Gadus morhua*) muscle. *Food Chemistry*, 126, 109–115.
- TSAI, Y. H., LIN, C. Y., CHANG, S. C., CHIEN, L. T., LEE, T. M., WEI, C. I. (2006). Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. *Food Chemistry*, 98, 64–70.
- TUNDISI, T.M., TUNDISI, J.G. (2008). *Limnologia*. Ed. Oficina de Textos: São Paulo.
- TURAN, N.B., CHORMEY, D.S., BÜYÜKPMAR, Ç., ENGIN, G.O., BAKIRDERE, S. (2017). Quorum sensing: little talks for an effective bacterial coordination. *Trends in Analytical Chemistry*, 91, 1-11.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2001). Scombrototoxin (histamine) formation. chapter 7. In: *Fish and fishery products hazards and controls guide*. 3^a ed. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, p. 73-93.

- VIEIRA, R.H.S.F. (2004). *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. São Paulo: Varela.
- WHITEHEAD, N.A., BARNARD, A.M.L., SLATER, H., SIMPSON, J.L., SALMOND, G.P.C. (2001). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 365-404.
- YANAR, Y., CELIK, M. AKAMCA, E. (2006). Effects of brine concentration on shelf-life of hot-smoked tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored at 4 C. *Food Chemistry*, 97, 244-247.
- YEANNES, M. I. (2006). *Aspectos Científicos y Tecnológicos en Preservas de Productos Pesqueros*. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Agrarias, Centro de Altos Estudios “Jorge Gándara”.
- YEANNES, M.I, AMEZTOY, I.M., RAMIREZ, E.E., FELIX, M.M. (2011). Culture alternative medium for the growth of extreme halophilic bacteria in fish products. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 31 (3), 561-566.
- ZAMAN, M.Z., BAKAR, F.A., JINAP, S., BAKAR, J. (2011). Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 45, 84-91.
- ZHOU, G.; MIURA, Y.; SHOJI, H.; YAMADA, S.; MATSUSHI, T. (2001). Platelet monoamine oxidase B and plasma β -phenylethylamine in Parkinson's disease. *Journal Neurosurgery Psychiatry*, 70, 229-231.
- ZUIN, L.F.S., BATTAGIN, H.V., ZUIN, P.B. (2013). Estudo do processo de ensino-aprendizagem em boas práticas de fabricação de funcionários pertencentes a dois frigoríficos brasileiros. In: *VII Congresso de APDEA, V Congresso da SPER, I Encontro Lusófono em Economia, Sociologia, Ambiente e Desenvolvimento Rural*. Évora, Portugal.

APÊNDICE 1 – *Check-list* para avaliação das condições de manipulação de peixes salgados no Ver-o-Peso.

REGISTRO DE VERIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MANIPULAÇÃO DE PEIXES SALGADOS NO MERCADO VER-O-PESO						
Responsável pela verificação: _____				Resultado: C - Conforme/ NC - Não conforme		
Data: _____				Pontuação: 0 a 10 por Unidade de Inspeção		
UNIDADE DE INSPEÇÃO	ELEMENTO DE INSPEÇÃO	C	NC	COMENTÁRIOS	PONTUAÇÃO	
Condições ambientais	Piso (liso, impermeável, bem conservado, cor clara)					
	Teto (liso, impermeável, bem conservado)					
	Paredes (lisas, laváveis, impermeáveis, de cor clara)					
	Ralos e canaletas (com grelha e sifonados)					
	Ventilação (em sentido que evite contaminação)					
	Iluminação e sistema elétrico (fiação embutida e luminárias com proteção contra quedas ou explosão)					
Móveis, equipamentos e utensílios	Bancadas e mesas (superfície lisa e conservados)					
	Lavatórios (água corrente, acionamento automático, sabonete líquido, álcool e lixeira)					
	Utensílios em bom estado de conservação e material higienizável					
	Basquetas e depósitos (material higienizável e em bom estado de conservação)					
	Prateleiras (material higienizável e bom estado de conservação)					
	Número adequado de móveis e utensílios					
Material de higiene	Detergente (disponibilidade e adequação)					
	Álcool (disponibilidade e adequação)					
	Desengordurante (disponibilidade e adequação)					
	Solução clorada (disponibilidade e adequação)					
	Vassouras, rodos, esponjas, panos e baldes (disponibilidade e conservação)					
	Local adequado para armazenamento do material de limpeza					
Controle de pragas	Lixeiras e telas limpas e em bom estado de conservação					
	Ausência de vetores e pragas ou evidências de sua presença					
	Existência de documentos comprovando a execução de serviço por empresa terceirizada, em caso de contratação					

Higiene dos manipuladores	Vestimenta (roupas adequadas, claras e limpas)				
	Uso de EPI se necessário				
	Treinamento comprovado em Boas Práticas de Manipulação e uso de produtos de higienização				
	Controle periódico do estado de saúde				
Embalagens	Tipo de embalagem adequado				
	Local adequado para armazenamento				
Condições de limpeza	Pisos				
	Paredes				
	Teto				
	Ralos e canaletas				
	Fiação e luminárias				
	Móveis, equipamentos e utensílios				
Recebimento dos peixes salgados	Área de recebimento protegida de chuva, sol, poeira e materiais em desuso				
	Existência de registros de recebimento e cadastro de fornecedores				
	Inspeção de produtos no recebimento e registro				
	Inspeção das embarcações				
Armazenamento dos produtos	Temperatura adequada				
	Limpeza do local de armazenamento				
	Móveis e utensílios limpos, em bom estado de conservação e afastados das paredes				
Comercialização	Barreiras que impeçam a contaminação do produto pelo contato com o consumidor, poeira e pragas				
	Quantidade disponível condizente ao volume vendido				
	Características sensoriais avaliadas periodicamente				
	Descarte de produtos avariados				
	Identificação visível do preço e espécie				
					TOTAL

APÊNDICE 2 – Teor de cloreto, atividade de água, umidade e contagem de bactérias em xarés salgados com NaCl nas concentrações 15 e 25% (p/p) com teste de Tukey considerando todos os tratamentos.

Tratamento	Tempo (dias)	Cloreto (%)	Aw	Umidade	Contagem de bactérias (log UFC/g)	
25% NaCl	Gram-positivas	0	2,0 ± 0,4 ^A	0,87 ± 0,003 ^A	67,54 ± 1,25 ^A	7,14 ± 0,03 ^A
		1	20,0 ± 1,5 ^B	0,77 ± 0,003 ^E	59,67 ± 1,40 ^{A,B}	7,18 ± 0,06 ^A
		2	25,0 ± 0,8 ^D	0,76 ± 0,007 ^H	55,32 ± 1,72 ^{B,C}	9,09 ± 0,00 ^E
		6	26,5 ± 1,8 ^D	0,74 ± 0,001 ^I	45,80 ± 2,30 ^D	8,33 ± 0,13 ^F
		10	27,0 ± 1,9 ^D	0,73 ± 0,002 ^I	44,57 ± 2,12 ^D	6,58 ± 0,03 ^D
	Gram-negativas	0	1,7 ± 0,5 ^A	0,85 ± 0,001 ^B	66,93 ± 0,60 ^A	5,16 ± 0,13 ^B
		1	17,3 ± 1,3 ^{B,C}	0,85 ± 0,004 ^B	66,12 ± 0,9 ^A	6,59 ± 0,07 ^D
		2	22,3 ± 2,7 ^{B,D}	0,76 ± 0,001 ^H	56,02 ± 1,20 ^{B,C}	8,39 ± 0,01 ^F
		6	23,5 ± 1,5 ^{B,D}	0,73 ± 0,003 ^I	51,73 ± 1,12 ^{C,D}	7,03 ± 0,02 ^A
		10	25,5 ± 1,5 ^D	0,73 ± 0,004 ^I	50,62 ± 0,71 ^D	6,88 ± 0,05 ^{A,D}
Gram-positivas + Gram-negativas	0	2,0 ± 0,3 ^A	0,85 ± 0,002 ^B	65,70 ± 0,91 ^A	7,55 ± 0,00 ^{A,C}	
	1	18,5 ± 1,0 ^{B,C}	0,85 ± 0,003 ^B	65,52 ± 1,27 ^A	9,30 ± 0,03 ^E	
	2	25,3 ± 0,9 ^D	0,77 ± 0,001 ^{E,H}	58,36 ± 2,43 ^{B,C}	10,63 ± 0,02 ^G	
	6	25,5 ± 1,0 ^D	0,75 ± 0,001 ^{H,I}	53,24 ± 1,98 ^{C,D}	9,39 ± 0,02 ^E	
	10	25,8 ± 1,8 ^D	0,73 ± 0,002 ^I	49,13 ± 2,11 ^D	7,99 ± 0,01 ^C	
15% NaCl	Gram-positivas	0	2,1 ± 0,1 ^A	0,94 ± 0,003 ^C	69,18 ± 2,33 ^A	7,84 ± 0,01 ^C
		1	12,3 ± 1,2 ^C	0,81 ± 0,002 ^F	62,18 ± 1,89 ^{A,B}	8,70 ± 0,10 ^F
		2	12,8 ± 2,7 ^{C,E}	0,80 ± 0,004 ^F	60,80 ± 1,79 ^B	11,57 ± 0,01 ^H
		6	15,3 ± 1,3 ^{C,E}	0,80 ± 0,002 ^F	60,62 ± 2,14 ^B	9,26 ± 0,50 ^E
		10	15,3 ± 1,0 ^{C,E}	0,80 ± 0,002 ^F	59,13 ± 1,51 ^C	7,48 ± 0,15 ^{A,C}
	Gram-negativas	0	1,3 ± 0,3 ^A	0,90 ± 0,001 ^D	72,98 ± 3,05 ^A	7,38 ± 0,01 ^A
		1	11,8 ± 1,3 ^C	0,89 ± 0,001 ^G	66,50 ± 2,23 ^A	8,53 ± 0,07 ^F
		2	14,0 ± 3,0 ^{C,E}	0,83 ± 0,002 ^B	62,06 ± 1,54 ^{A,B}	11,60 ± 0,01 ^H
		6	15,3 ± 0,4 ^{C,E}	0,83 ± 0,004 ^B	61,94 ± 0,93 ^B	9,58 ± 0,02 ^E
		10	15,4 ± 0,7 ^{C,E}	0,82 ± 0,002 ^{B,F}	60,19 ± 1,36 ^C	7,06 ± 0,07 ^A
Gram-positivas + Gram-negativas	0	2,0 ± 0,3 ^A	0,91 ± 0,002 ^D	68,29 ± 2,50 ^A	7,46 ± 0,01 ^{A,C}	
	1	11,8 ± 0,8 ^C	0,84 ± 0,003 ^B	65,14 ± 1,01 ^A	8,41 ± 0,01 ^F	
	2	16,0 ± 2,0 ^{C,E}	0,83 ± 0,002 ^B	62,80 ± 2,86 ^{A,B}	11,04 ± 0,03 ^G	
	6	16,5 ± 1,5 ^{C,E}	0,82 ± 0,002 ^{B,F}	61,81 ± 1,12 ^B	9,60 ± 0,01 ^E	
	10	15,8 ± 0,9 ^{C,E}	0,81 ± 0,002 ^F	60,17 ± 2,09 ^C	8,02 ± 0,03 ^{C,F}	

*Resultados expressos como média ± desvio padrão; as letras diferentes (A, B, C, D, E, F, G, H e I) em uma mesma coluna indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias.