

Avaliação da estabilidade química de sardinhas-verdadeiras (*Sardinella brasiliensis*) inteiras e evisceradas armazenadas sob refrigeração

The chemical stability of whole and eviscerated Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) stored under refrigeration

RIALA6/1329

Sabrina da Costa Silva ANDRADE^{1*}, Eliane Teixeira MÁRSICO², Lourdes Maria Pessoa MASSON³, Carlos Frederico Marques GUIMARÃES²

*Endereço para correspondência: Avenida Roberto Silveira, 2258, Flamengo, Marica/RJ, Brasil. CEP 24900-000. Tel: 21 2637-2776. E-mail: sabrina.vet@gmail.com.

¹Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense

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

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Recebido: 05.07.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

A estabilidade química de amostras de sardinhas refrigeradas em três diferentes condições de conservação foi avaliada por meio de determinação de bases voláteis totais (N-BVT) e análise de produção de histamina, putrescina e cadaverina. As amostras foram separadas em três grupos: o primeiro composto de sardinhas inteiras refrigeradas, sem adição de gelo (4-7°C); o segundo e o terceiro grupos foram constituídos, respectivamente, de sardinhas inteiras e evisceradas, com adição de gelo (0-3°C). Somente o primeiro grupo apresentou teor de N-BVT acima do preconizado pela legislação no 14º dia de estocagem. Nos segundo e terceiro grupos, os valores mantiveram-se abaixo de 17 mg N.100 g⁻¹. Em todos os grupos não houve produção de histamina acima do limite oficial de 10 mg.100 g⁻¹, contudo no primeiro grupo o valor inferior a 2 mg.100 g⁻¹ foi detectado a partir do 21º dia de estocagem. Putrescina e cadaverina foram detectadas a partir do 12º, 16º e 19º dias de estocagem, respectivamente, no primeiro, segundo e terceiro grupo. A presença de formaldeído foi avaliada, cujo resultado foi positivo em todos os grupos estudados. A longa validade comercial dessas espécies ocorreu em função do uso de conservante na cadeia produtiva.

Palavras-chave. Sardinhas, bases voláteis totais, histamina, formaldeído.

ABSTRACT

This study evaluated the chemical stability of chilled sardines under three preservation conditions by determining the total volatile bases (TVB-N), and the production of histamine, putrescine and cadaverine. The samples were separated into three groups: the first was composed by chilled whole sardines without ice addition (4-7°C), and the second and third groups were comprised by whole and eviscerated sardines, respectively, and adding ice (0-3°C). Only the first group showed TVB-N contents above the recommended rate at the 14th storage day. In the second and third groups, the values remained below 17 mg N.100 g⁻¹. Histamine was within the recommended limit of 10 mg.100 g⁻¹ in all groups, and values lower than 2 mg.100 g⁻¹ were detected after the 21st storage day in the first group. Putrescine and cadaverine were detected after the 12th, 16th and 19th storage days in the first, second and third groups, respectively. The presence of formaldehyde was evaluated, which was positive in all three groups. These findings indicate that the long shelf life of these products was due to use of preservatives in the production chain.

Key words. Sardines, total volatile bases, histamine, formaldehyde.

INTRODUÇÃO

A sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), segundo dados estatísticos do IBAMA¹, é o peixe de maior importância econômica no Estado do Rio de Janeiro, destacando-se pelo alto consumo, em função do preço acessível ao consumidor e das características nutricionais e funcionais que apresenta^{2,3,4,5}. Porém, pela alta captura desta espécie, a sardinha-verdadeira vem sendo submetida ao controle oficial, por intermédio do período de defeso, que proíbe o exercício da pesca durante os picos de reprodução e de recrutamento da espécie objetivando a recuperação da biomassa, podendo, neste período, ser comercializada apenas na forma beneficiada⁶.

Devido à sua composição química, atividade de água elevada e pH próximo à neutralidade, o pescado degrada-se com facilidade⁵. Segundo Huss⁷, a deterioração do peixe refrigerado é causada principalmente pela ação de bactérias. Jay⁸ afirma que a velocidade do processo de deterioração pode ser diminuída através da evisceração do pescado que impede a ação das bactérias intestinais, auxiliadas pela ação das enzimas proteolíticas.

A determinação das Bases Voláteis Totais (N-BVT) é um dos métodos mais amplamente utilizados para avaliar a qualidade do pescado, devido a simplicidade analítica e razoável concordância com o estado de frescor^{9,10}. As principais bases nitrogenadas são trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA), monometilamina (MMA) e amônia, encontradas no músculo do pescado em proporções variadas, segundo a espécie e estado de deterioração da amostra¹¹. Segundo a Portaria nº 185¹², o pescado é considerado deteriorado quando apresenta teor de N-BVT superior ou igual a 30 mg N.100 g⁻¹. Diversos autores estudando diferentes espécies de sardinhas, observaram que valores próximos aos preconizados na legislação brasileira foram encontrados em um período de 10-15 dias para temperaturas de estocagem entre 0-4°C^{13,14,15}.

As aminas biogênicas têm sido frequentemente utilizadas para estimar o frescor ou o grau de deterioração do pescado, pois são compostos presentes em baixos níveis no pescado fresco, cuja produção está associada à atividade de bactérias deterioradoras^{16,17}. A histamina é a diamina mais comumente estudada por ser potencialmente causadora de intoxicação por consumo de peixes com alto teor de histidina livre que, por ação de enzimas descarboxilases, produzem histamina, e por tratar-se de uma análise oficial^{12,16,18}. A Portaria nº 185¹² preconiza um limite máximo de histamina de 10 mg.100 g⁻¹

(100 ppm) para as espécies pertencentes às famílias Scombridae, Scombrosidae, Clupeidae, Coryphaenidae e Pomatomidae. Segundo Shalaby¹⁹, o armazenamento de peixes em baixa temperatura reduz a taxa de formação das aminas biogênicas. Ababouch et al¹⁵ e Veciana-Nogués et al¹⁶, ao avaliarem peixes de diferentes espécies estocados em temperaturas variadas, observaram que a concentração de histamina aumentou com a elevação da temperatura e do tempo de armazenamento, comprovando, desta forma, a relação da produção desta amina com a temperatura de estocagem do produto.

Diante dos aspectos descritos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a estabilidade química de sardinhas armazenadas em três diferentes condições de conservação: inteiras refrigeradas sob temperatura controlada (4-7°C) sem adição de gelo, inteiras refrigeradas (0-3°C) com adição de gelo e evisceradas, refrigeradas (0-3°C) adicionadas de gelo, utilizando como parâmetros de qualidade a determinação de N-BVT e a semiquantificação de histamina, putrescina e cadaverina.

MATERIAL E MÉTODOS

Cerca de cinco quilos de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) foram adquiridas aleatoriamente de um lote constituído por 50 Kg, no mercado consumidor do município de Niterói (RJ), em setembro de 2008, antes do início do período de defeso, e encaminhadas em recipientes isotérmicos de poliestireno expandido com gelo ao Laboratório para preparo dos grupos e acompanhamento da validade comercial através dos procedimentos analíticos eleitos como viáveis para a espécie. Em condições laboratoriais, as amostras foram lavadas em água corrente, separadas em três grupos homogêneos e mantidas sob refrigeração. No primeiro grupo as sardinhas inteiras foram mantidas em refrigeração sob temperatura controlada (4-7°C), sem adição de gelo; no segundo e terceiro grupos, as sardinhas inteiras e as evisceradas, respectivamente, foram mantidas sob refrigeração (0-3°C) em gelo filtrado.

A determinação das bases voláteis totais foi realizada em duplicata pela técnica oficial de microdifusão em Placas de Conway, descrita no Manual do Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA²⁰, que se fundamenta na extração das bases voláteis pela adição de ácido tricloroacético a 10%, à amostra e liberação das mesmas pela adição de carbonato de potássio ao extrato. O nitrogênio volátil liberado difunde-se pelo ar e fixa-se na solução de ácido bórico, sendo

posteriormente titulado com ácido clorídrico. A análise de histamina, putrescina e cadaverina foi realizada pela técnica semiquantitativa de cromatografia em camada delgada descrita por Schutz et al²¹, que consistiu na extração das aminas biogênicas das amostras com metanol, corrida cromatográfica em placa de sílica em gel e revelação por aspersão uniforme de solução de ninhidrina a 0,3% em metanol. As análises foram realizadas a cada um ou dois dias, de acordo com a evolução dos resultados, até o 28º dia de estocagem.

O procedimento analítico para avaliar a presença de formaldeído não foi previsto na metodologia inicial e foi realizado em função da longa validade comercial observada nas amostras estudadas. Esta análise baseou-se na técnica qualitativa de identificação de formaldeído com floroglucina (método 280/IV), descrita no Manual de métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz²², sendo realizada no 23º dia de estocagem com um “pool” proveniente de 10 amostras de cada grupo estudado.

Para verificação de diferenças entre os grupos, os resultados foram analisados a partir de estatística descritiva simples e análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%, utilizando o programa computacional Microsoft Office Excel 2003.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados sumarizados podem ser observados na Figura 1, na qual se demonstra que sardinhas inteiras refrigeradas, sob temperatura controlada, sem adição de

gelo (4-7°C) apresentaram teores de N-BVT acima do limite aceitável no 14º dia de estocagem, enquanto as sardinhas inteiras e as evisceradas, estocadas em gelo (0-3°C) apresentaram teores abaixo de 17 mg N.100 g⁻¹ até o 28º dia de estocagem, mantendo-se, portando, dentro do limite preconizado pela legislação vigente no decorrer do período experimental de validade comercial. Apesar dos resultados obtidos nas amostras de sardinhas evisceradas terem sido inferiores, quando comparados aos obtidos nas demais condições de armazenamento, fato este, possivelmente correlacionado à diminuição das enzimas do tecido visceral que aceleram a autólise⁵, estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Com relação à produção de histamina, os dados são apresentados na Tabela 1, onde se observa que em todas as condições experimentais não houve produção desta amina em níveis acima do limite de 10 mg.100 g⁻¹ (100 ppm) preconizado pela Portaria 185¹². No 3º grupo, composto por amostras de sardinha inteira mantidas em refrigeração, sob temperatura controlada, sem adição de gelo (4-7°C), esta diamina foi observada em um valor inferior a 2 mg.100 g⁻¹ em torno do 21º dia de estocagem. Ainda nestas condições a presença de outras aminas biogênicas (putrescina e cadaverina) foi observada a partir do 12º dia de estocagem. Nos grupos das amostras de sardinhas inteiras e evisceradas, estocadas em gelo (0-3°C), a presença de histamina não foi observada. Entretanto, a presença de outras aminas (putrescina e cadaverina) pôde ser observada a partir do 16º e 19º dia de estocagem, respectivamente.

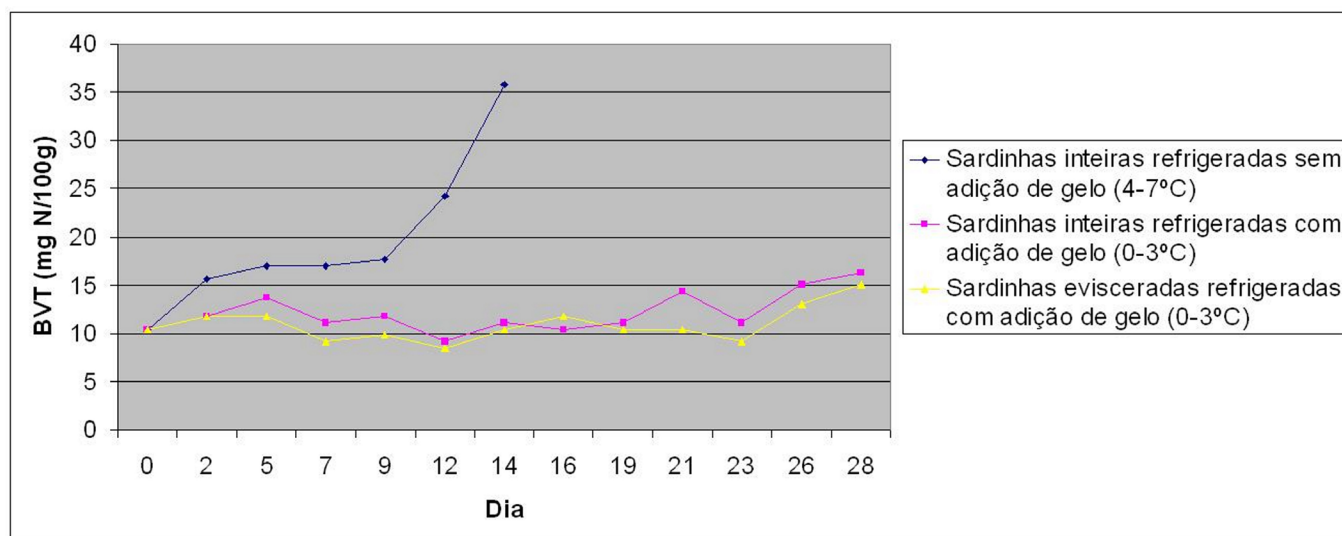


Figura 1. Valores médios da determinação das bases voláteis totais (mg N.100g⁻¹) de sardinhas inteiras refrigeradas sem adição de gelo (4-7°C), inteiras refrigeradas com adição de gelo (0-3°C) e evisceradas refrigeradas com adição de gelo (0-3°C) até 28º de estocagem

Tabela 1. Teor de histamina ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) em sardinhas inteiras refrigeradas sem adição de gelo ($4-7^{\circ}\text{C}$), inteiras refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$) e evisceradas refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$) por 28 dias de estocagem

DIA	Histamina ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$)		
	Sardinhas inteiras refrigeradas sem adição de gelo ($4-7^{\circ}\text{C}$)	Sardinhas inteiras refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$)	Sardinhas evisceradas refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$)
0 a 20	N.D.	N.D.	N.D.
21	< 2,0	N.D.	N.D.
23	< 2,0	N.D.	N.D.
26	2,0	N.D.	N.D.
28	2,0	N.D.	N.D.

N.D.: Não detectável pela técnica de cromatografia em camada delgada

Apesar da legislação nacional não pontuar limites para outras aminas biogênicas, cabe ressaltar que a presença destas é de suma importância por serem potencializadoras da ação da histamina, pois inibem o sistema de detoxificação do organismo e aumentam a absorção intestinal da histamina^{18,19,23}, além de caracterizarem perda da qualidade nutricional do alimento por degradação de aminoácidos.

Os resultados do presente estudo diferiram dos relatados por Erkan e Özden²⁴ que, ao analisarem sardinhas da espécie *Sardina pilchardus* inteiras e evisceradas, mantidas sob refrigeração em gelo, obtiveram valores para N-BVT de até $29,23 \text{ mg N} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $15,03 \text{ mg N} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente, em apenas nove dias de estocagem, e um teor de histamina de $5,28 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ neste mesmo período. Marrakchi et al¹⁴, ao avaliarem sardinhas desta mesma espécie, inteiras e estocadas em gelo, observaram que o limite máximo estabelecido para N-BVT foi atingido entre 10 e 15 dias de estocagem. Ababouch et al¹⁵, ao estudarem sardinhas desta mesma espécie estocadas em gelo, registraram valores distintos de N-BVT, um de $45 \text{ mg N} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em 200 horas e outro de $30 \text{ mg N} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, em 400 horas, atribuindo este fato à presença de micro-organismos que influenciam na produção de bases voláteis. Para histamina, esses autores observaram valores de $14,74$ e $21,05 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ após 11 e 13 dias de armazenamento em gelo, respectivamente. Shakila et al²⁵, ao avaliarem sardinhas da espécie *Sardinella fimbriata* estocadas em temperatura ambiente, relataram que após um período de 18 horas, o limite estabelecido para N-BVT foi alcançado e,

após um período de 15 horas de estocagem, encontraram $5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (50 ppm) de histamina. Beraquet et al¹³ verificando a qualidade da sardinha verdadeira fresca e processada termicamente encontraram na sardinha fresca quantidades de N-BVT entre $21-30 \text{ mg N} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, para um período de estocagem de 14 dias a $0-4^{\circ}\text{C}$.

Desta forma, como as amostras demonstraram uma validade comercial muito extensa, diferindo do observado por diversos autores, suspeitou-se de adição de conservantes e analisou-se qualitativamente a presença de formaldeído nas amostras, observando positividade para os três grupos estudados. Isto explica os resultados encontrados, pois o formaldeído é um conservante que, segundo a Portaria nº 540²⁶, impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas, sendo ainda um agente mutagênico e cancerígeno de emprego, como aditivo alimentar, proibido no Brasil, segundo a Resolução nº 4²⁷.

CONCLUSÃO

O uso adequado da cadeia de frio e a adição de gelo aumentam a validade comercial da sardinha. A não adição de gelo faz com que esse período diminua e os limites oficiais de avaliação do frescor de pescado sejam atingidos num menor tempo de estocagem. O processo de evisceração não influenciou de forma significativa na validade comercial das amostras em função da adição de formaldeído. Sendo assim, com o objetivo de aumentar a validade comercial destas espécies, aumentando

assim, o período de venda, os resultados sugerem que conservantes estejam sendo utilizados em alguma etapa da cadeia produtiva, fato comprovado pela constatação da presença de formaldeído nas amostras estudadas. Diante deste fato, este estudo serve como um alerta para as autoridades brasileiras intensificarem a fiscalização no comércio de pescado, objetivando, desta forma, a não ocorrência de fraudes.

REFERÊNCIAS

1. IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília;2008.
2. Osman H, Suriah AR, Law EC. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. *Food Chem*. 2001;73(1):55-60.
3. Espírito Santo MLP, Beirão LH, Sant'ana ES, Dalcin EB, Franco BGM. Bacteriocinogenic effect of *Lactobacillus sakei* 2a on microbiological quality of fermented *Sardinella brasiliensis*. *Braz Arch Biol Technol*. 2003;46(4):553-61.
4. Visentainer JV, Carvalho PO, Ikegaki M, Park YK. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000;20(1):90-3.
5. Ogawa M, Maia EL. Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Livraria Varela; 1999.
6. Brasil. Instrução Normativa nº 128 de 2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 26 outubro 2006.
7. Huss HH. Garantia da Qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO; 1997.
8. Jay MJ. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
9. Huss HH. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. Dinamarca: FAO; 1999.
10. Contreras-Guzmán ES. Bioquímica de pescado e derivados. Jaboticabal: FUNEP; 1994.
11. Giannini DH. Determinación de nitrógeno básico volátil (NBV) en pescado: consideraciones generales. *Alimentaria*. 2003;40(343):49-54.
12. Brasil. Portaria nº 185 de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 maio 1997.
13. Beraquet NJ, Lindo MMK, Vieira MC. Métodos químicos na avaliação da qualidade de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) fresca e processada termicamente. *Col ITAL*.1985; 15:141-70.
14. Marrakchi AE, Bennour M, Bouchriti N, Hamama A, Tagafait H. Sensory, chemical and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J Food Prot*. 1990;53(7):600-5.
15. Ababouch LH, Souibri L, Rhaliby K, Ouahdi O, Battal M, Busta FF. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiol*. 1996;13:123-32.
16. Veciana-Nogués MC, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP- related compounds volatile amines and organoleptic changes. *J Agric Food Chem*. 1997;45: 2036-41.
17. Lapa-Guimarães J, Pickova J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *J Chromatogr A*. 2004;1045: 223-32.
18. Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol*. 2000;58:1-37.
19. Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int*.1996;29(7):675-90.
20. Brasil. Métodos analíticos oficiais para o controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. II – Métodos físicos e químicos. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF. 1981.
21. Schutz DE, Chang GW, Bjeldanes LF. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. Chemical indexes. Departement of Nutrition Science; University of Califórnia Berkeley, 1976.
22. Brasil. Métodos Físico-químicos para análise de Alimentos do Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 4 ed.
23. Önal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chem*. 2007;103:1475-86.
24. Erkan N, Özden Ö. Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43:1549-59.
25. Shakila RJ, Vijayalakshmi K, Jeyasekaran G. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem*. 2003;82:347-52.
26. Brasil. Portaria nº 540 de 1997 do Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 outubro 1997.
27. Brasil. Resolução nº 4 de 1988 do Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todas do Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 24 novembro 1988.