

ALTERAÇÕES QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS EM PACU (*Piaractus mesopotamicus*) ARMazenado SOB REFRIGERAÇÃO A 5°C¹

LEITÃO, Mauro F. F.²; RIOS, Daniel P.F.A.²; GUIMARÃES, Judite G.L.²; BALDINI, V.L.S.³ & MAINARDES PINTO, Cleide S. R.⁴

RESUMO

A pesquisa foi conduzida com o objetivo de analisar a vida útil e o processo de deterioração do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração em temperatura inadequada (5°C). Amostras do pescado, imediatamente após a captura, foram armazenadas a 5°C e analisadas nos intervalos de 0-7-14 e 21 dias, com relação a características sensoriais e de natureza química (bases nitrogenadas voláteis – BNV, nitrogênio não protéico – NNP, aminoácidos livres totais, histidina livre e histamina) e microbiológicos (contagem padrão, produtores de histamina em ágar Niven, contagem de microrganismos gelatinase e H₂S positivos, nas temperaturas de 35°C, 20° e 5°C). Os resultados obtidos confirmaram que, a exemplo de outros peixes fluviais de regiões tropicais, o pacu revelou-se bastante resistente ao armazenamento, somente evidenciando uma alteração marcante após 14 dias de estocagem. Assim mesmo, a rejeição do pescado foi baseada principalmente em características sensoriais (odor, aspecto, textura) uma vez que com relação aos índices químicos (BNV) e mesmo microbiológicos, não se caracterizava uma situação definitiva de deterioração e rejeição. Observou-se, também, que o processo de deterioração pareceu concentrar-se principalmente no muco superficial, sendo que as características químicas do tecido muscular não evidenciaram alterações marcantes, mesmo após 21 dias de armazenamento. A presença de histamina não foi positivada nas amostras e os níveis de histidina livre, embora relativamente elevadas, não sugerem maiores riscos desta espécie de peixe como eventual veículo de intoxicação por histamina. No entanto, bactérias his+ foram isoladas das amostras iniciais, entre elas cepas de *Plesiomonas shigelloides* e *Vibrio fluvialis*. A microbiota contaminante natural foi reduzida, predominando microrganismos mesófilos/psicrotrófilos, com baixas contagens iniciais a 5°C. Ao longo do armazenamento a 5°C esta microbiota mostrou uma lenta multiplicação, somente sendo alcançadas populações compatíveis com o processo de deterioração (> log_{7,0} UFC/cm²) após 14 dias de estocagem.

Palavras-chave: Pacu; microbiologia; histamina; refrigeração.

SUMMARY

CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHANGES IN "PACU" (*Piaractus mesopotamicus*) STORED UNDER REFRIGERATION AT 5°C. This research was conducted with the objective of evaluating the shelf life and the spoilage process of "pacu" (*Piaractus mesopotamicus*) stored under refrigeration at 5°C. Fish samples, just after capture, were stored and evaluated at 0-7-14-21 days intervals, concerning chemical analysis (volatile nitrogen basis-, non protein nitrogen, total free aminoacids, free histidine and histamine)

¹ Recebido para publicação em 25/09/96. Aceito para publicação em 23/06/97. Pesquisa conduzida com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

² UNICAMP/Faculdade de Engenharia de Alimento, Depto. Tecnol. de Alimentos. C.P. 6121, CEP 13081-970. Campinas, SP.

³ Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL. Av. Brasil, 2880. CEP 13073-001. Campinas, SP.

⁴ Instituto de Pesca, Estação Pindamonhaga, SP.

microbiological analysis (standard plate count, histamine producing bacteria in Niven agar, gelatinase and H₂S producers, always with incubations at 35°, 20° and 5°C), and also sensorial evaluations. The results showed that as occurs with other fresh water tropical fishes, the "pacu" showed a high stability during the cold storage, with spoilage evidence only after 14 days storage, and based only in sensorial aspects because the chemical and microbiological parameters did not show a definitive evidence of spoilage. It was also noticed that the spoilage products appeared to be concentrated in the surface mucus since the chemical parameters of muscle tissue did not show remarkable changes even after 21 days storage under refrigeration. Histamine was not confirmed in the examined samples and the detected free histidine levels do not suggest that this fish species could be a potential vehicle of histamine poisoning. However, his+ bacteria were isolated from the original samples being identified strains of *Plesiomonas shigelloides* and *Vibrio fluvialis*. The surface initial microbiota was reduced, prevailing mesophilic/psychrotrophic species with lower counts at 5°C. During the storage at 5°C the microbiota showed a slow increase, only reaching high populations (log 7,0CFU/cm²) after 14 days storage.

Key words: "Pacu"; microbiology; histamine; refrigeration.

1 — INTRODUÇÃO

Entre os alimentos de origem animal, o pescado caracteriza-se pelo seu elevado potencial de deterioração, quando exposto a condições inadequadas de armazenamento. Sabe-se que esse processo é decorrente da atividade de enzimas autolíticas, rancificação de gordura e principalmente da atividade de microrganismos deterioradores LISTON (20).

Inúmeros autores têm pesquisado o mecanismo do processo de deterioração do pescado. Em trabalhos pioneiros realizados por LERKE *et al.* (17), ficou experimentalmente evidenciado que, ao contrário do que se imaginava até então, a hidrólise inicial de proteínas não desempenhava um papel fundamental no processo, o qual era decorrente da utilização de outras substâncias nitrogenadas não protéicas. Constatou-se que uma proteólise significativa somente era observada após uma clara evidência de deterioração do pescado.

Os autores ainda constataram que embora o substrato protéico não fosse responsável **direto** pela deterioração, ele representava um papel importante no processo, acelerando a utilização da fração não protéica e consequentemente aumentando a velocidade da mesma.

SHEWAN & MURRAY (23) concluíram que as alterações químicas e sensoriais do pescado refrigerado eram devidas a um processo de deterioração bacteriana, restrito principalmente ao tegumento e muco, envolvendo a utilização de compostos de baixo peso molecular, presentes na pele, muco ou oriundos dos músculos e difundidos para o ambiente externo. Imediatamente após a morte dos peixes

desencadeava-se uma série de reações enzimáticas nos músculos, envolvendo o ATP, creatina-fosfato e glicogênio, resultando na produção de uma série de compostos de baixo peso molecular, como a inosina, ribose, creatina, lactato; a estes compostos poderiam ser acrescidos os aminoácidos, uréia, aminas, purinas, pirimidinas e o TMAO, em pescado de origem marinha. Estes compostos, em conjunto, constituíam as substâncias nitrogenadas não protéicas (non protein nitrogen – NPN), referidas inicialmente por LERKE *et al.* (17) e que se caracterizavam como substratos preferenciais para os microrganismos deterioradores.

O mecanismo do processo de deterioração foi esclarecido em mais detalhes por LISTON (20 e 21), que propôs a seguinte seqüência para explicar os eventos que se sucediam:

- Numa etapa inicial, aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas não protéicas são utilizadas pelos microrganismos logo após o término do *rigor mortis*;
- Neste ambiente, há um desenvolvimento seletivo de algumas espécies de bactérias, principalmente nos gêneros *Shewanella* e *Pseudomonas*, capazes de rápida utilização destes compostos, com formação de produtos de aroma pronunciado e desagradável.
- O esgotamento da reserva de aminoácidos no substrato provoca a interrupção da repressão de proteínases, iniciando-se, então, o processo de decomposição de proteínas, que resulta na reposição do "pool" de aminoácidos no substrato.
- Em consequência, aumentam, acentuadamente, os produtos resultantes da decomposição dos aminoácidos (bases, compostos voláteis, H₂S e outros compostos sulfurados) acelerando e acentuando as evidências de deterioração do pescado.

Embora o mecanismo do processo de deterioração do pescado seja idêntico, independentemente do tipo e origem do mesmo, sabe-se que o pescado capturado em águas tropicais revela um período mais prolongado de conservação em gelo do que o proveniente de águas frias/temperadas.

Assim, SHEWAN & MURRAY (23) citaram que, dependendo da espécie, o pescado capturado em águas frias conservava-se em gelo durante 2 a 21 dias, ao passo que os provenientes de águas tropicais mantinha-se em boas condições durante 7 a 45 dias. Também SUMNER *et al.* (24), na Austrália, chegaram a conclusões idênticas, relatando um maior período de conservação, em gelo, de trutas capturadas durante o verão (temperaturas de 15° a 22°C), comparativamente àquelas capturadas no inverno (temperatura de 2 a 8°C).

De acordo com DISNEY (6) LISTON (21) e LIMA DOS SANTOS (19), entre outros, o maior período de conservação, em gelo, do pescado proveniente de águas tropicais seria devido à presença de uma microbiota tipicamente mesófila nos mesmos, pouco adaptada à multiplicação em temperaturas de refrigeração. Já BREMNER *et al.* (3) atribuíram as diferenças no período de conservação em gelo à razão de degradação do monofosfato de inosina – IMP, com o rápido acúmulo de hipoxantina nas espécies nas quais a degradação do IMP era acelerada.

Estas alternativas foram questionadas e refutadas experimentalmente por GRAM *et al.* (9). Estes autores, reali-

zando trabalhos na África, com tilápia e outras espécies locais, comprovaram que a microbiota inicial do pescado tropical era basicamente similar àquela de peixes provenientes de águas frias/temperadas, com presença marcante de *Pseudomonas* e *Shewanella*. No entanto, os autores observaram que em função da temperatura mais elevada prevalente no ambiente original, a velocidade de multiplicação destes microrganismos quando inicialmente submetidos a temperaturas de refrigeração era muito lenta, comparativamente aos originários de águas mais frias. Consequentemente, em função do maior tempo de geração, decorria um espaço de tempo mais prolongado até que populações elevadas, típicas do pescado deteriorado, fossem constatadas no pescado estocado em gelo.

LEITÃO & SILVEIRA (16) em pesquisas conduzidas no Brasil, com tilápias analisadas ao longo das várias estações do ano, alcançaram conclusões semelhantes às relatadas por GRAM (9). Assim, quando a temperatura do ambiente aquático original oscilava entre 20 e 25°C, o incremento da microbiota psicrófila, após 7 dias de incubação em caldo de extrato muscular e caldo tripticase-soja, incubados a 4°C foi, em média, de 3,31 logUFC/mi, ao passo que em culturas isoladas originalmente a 25-30°C, o incremento da população foi de apenas 1,67logUFC/ml.

No estudo do pescado em regiões tropicais, ao lado de aspectos envolvidos com a vida útil do produto e sua conservação em gelo ou sob refrigeração, é igualmente relevante a avaliação de parâmetros de importância no aspecto de saúde pública. A este respeito, ênfase especial deve ser dada ao problema da formação e acúmulo de histamina neste tipo de alimento.

A produção de histamina, no pescado e em outros alimentos, é decorrente, exclusivamente, da atividade de microrganismos produtores de histidina descarboxilase e, portanto, capazes de descarboxilar a histidina livre com formação da amina. Quando os níveis acumulados no alimento atingem valores superiores a 100mg/100g o risco de intoxicação é elevado (13), é por isso que a legislação alimentar, a nível internacional, é bastante restritiva com relação aos limites toleráveis; assim, a FDA/USA estabelece um valor de 500mg/100g como nível perigoso, ao passo que a Comunidade Econômica Européia – EEC fixou um limite máximo tolerável de 20mg/100g (1, 11).

Estudos realizados em diferentes países comprovam que peixes da família *Scombridae*, particularmente o atum, bonito, cavala e cavalinha, são os que apresentam níveis mais altos de histidina livre, sendo, consequentemente, os mais freqüentes veículos de intoxicação por esse aminoácido; no entanto, peixes pertencentes à família *Clupeidae*, bem como crustáceos, podem apresentar níveis relativamente elevados de histidina livre (1, 11, 13, 15).

Entre as bactérias capazes de produzir histamina destacam-se algumas espécies de *Enterobacteriaceae*, particularmente *Morganella morganii*, seguido de representantes dos gêneros *Klebsiella*, *Hafnia*, *Escherichia*, etc; além disso, também espécies nos gêneros *Vibrio*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Photobacterium* tem sido relatadas (1, 11, 13, 15, 25).

É fundamental destacar-se que a grande maioria dos estudos referentes à ocorrência de histamina tem se restringido ao pescado de origem marinha e principalmente pro-

veniente de águas frias/temperadas. São muito poucos os trabalhos voltados para o estudo da conservação e avaliação potencial de formação de histamina em pescado de regiões tropicais e particularmente naqueles com "habitat" em águas fluviais ou lacustres.

No Brasil, a atividade de aquicultura vem, gradativamente, ocupando uma posição de destaque nos aspectos econômico e de produção, representando, atualmente, uma alternativa significativa à captura e industrialização do pescado de origem marinha. Espécies como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a carpa (*Cyprinus carpio*), o camarão da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*), a truta (*Oncorhynchus myrkis*) e, mais recentemente, o curimatá (*Prochilodus scrofa*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), vêm sendo introduzidas em programas de repovoamento de lagos, açudes e em outras atividades de aquicultura.

É evidente que ao lado da maior disponibilidade de matéria-prima e potencial para industrialização, tornam-se relevantes estudos que gerem subsídios para a melhor conservação pós captura, ou que abordem aspectos importantes de saúde pública.

Assim sendo, a presente pesquisa foi conduzida utilizando o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) como matéria-prima, tendo os seguintes objetivos:

- Estudo das alterações químicas e microbiológicas durante o armazenamento sob refrigeração, em temperaturas de abuso (5°C);
- Avaliação dos teores de histidina e do potencial de formação de histamina em diferentes condições de armazenamento.

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Material

Os estudos foram conduzidos em amostras de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) capturado em tanques de criação do Instituto de Pesca, em Pindamonhangaba, SP. Em cada época de amostragem foram coletadas 2 (dois) exemplares, com peso médio de 2kg, os quais, imediatamente após captura, foram acondicionados em sacos plásticos, no interior de caixas isotérmicas contendo gelo finamente triturado. A seguir, as amostras foram transportadas aos laboratórios de Higiene da FEA/DTA, UNICAMP, sendo submetidas às análises iniciais, num prazo máximo de 4h após a captura.

Os experimentos foram efetuados com 3 (três) repetições, com intervalos aproximados de 30 dias entre as coletas de amostras.

No laboratório, as amostras foram armazenadas em refrigerador comercial (Brastemp), embaladas em sacos plásticos e mantidas à temperatura de 5°C, simulando, assim, um armazenamento sob temperatura inadequada de refrigeração.

Nos intervalos de 0-7-14 e 21 dias, as amostras foram submetidas a análises químicas e microbiológicas, bem como a uma avaliação sensorial preliminar.

2.2 – Metodologia Experimental

2.2.1 – Análises químicas

A partir de cada exemplar de pescado foram coletadas duas porções de aproximadamente 25g de tecido muscular, na região lateral, lombar e próxima à cabeça; as 4 porções de amostras assim coletadas, num total de aproximadamente 100g, foram combinadas e submetidas a diferentes análises químicas.

A dosagem de nitrogênio não protéico – NNP, foi efetuada com extração inicial do homogeneizado muscular em ácido tricloroacético, seguido de filtração e digestão, conforme metodologia descrita pela AOAC (1988). Os resultados foram expressos em mgNNP/100g carne.

As dosagens de histidina livre foram efetuadas a partir de extrato de tecido muscular, sendo uma alíquota do mesmo diluída com tampão pH 2,2 e analisada em analisador de aminoácidos Dionex DX-300, usando-se coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina.

As determinações de histamina foram realizadas de acordo com metodologia proposta por FOO (7) e CATTANEO & CANTONI (4) utilizando cromatografia de papel, eluição em metanol e leitura em espectrofotômetro a 500nm.

As determinações de umidade foram efetuadas conforme metodologia oficial da AOAC (2) ao passo que as dosagens de bases nitrogenadas voláteis (BNV) foram efetuadas de acordo com métodos internos do Instituto del Fomento Pesquero. (12).

2.2.2 – Análises microbiológicas

A coleta de amostras para análise microbiológica foi superficial, utilizando-se a técnica de zaragatoa (swab) friccionada em 2 (duas) áreas de 2 x 5cm (10cm²) de cada exemplar, sempre na região lateral, lombar, próxima à cabeça e a cauda. As duas zaragatoas utilizadas (uma para cada exemplar), totalizando uma área amostrada de 40cm², foram recebidas em tubo contendo 5ml de água peptonada 0,1%, seguido de agitação intensa em agitador vibratório tipo Phoenix, com posterior contagem de vários grupos microbianos, a saber:

- Contagem padrão em placas usando-se o ágar padrão de contagem - PCA, Difco e técnica de "pour plate";
- Contagem de microrganismos histamina positivos, usando-se o ágar Niven (NIVEN *et al.*, 1981), técnica de "pour plate", com sobrecamada (overlay) do mesmo meio;
- Contagem de microrganismos gelatinase positivos, usando-se o ágar gelatina, técnica de espalhamento superficial e revelação da hidrólise com o uso do reagente de Frazier (10);
- Contagem de microrganismos produtores de H₂S, usando-se o ágar peptona ferro, conforme proposto por LEVIN (18).

Todas as contagens microbianas foram efetuadas nas temperaturas de 35°C (48h incubação), 20°C (3-5 dias de incubação) e 5°C (10 dias de incubação), sendo os resultados finais expressos em logUFC/cm².

2.2.3 – Isolamento e identificação de culturas histamina positivas

A partir das placas de ágar Niven evidenciando colônias presuntivamente histamina positivas, foram efetuados isolamentos, seguido da confirmação do potencial para produção de histamina pela inoculação das culturas purificadas em caldo de Niven.

As culturas confirmadas foram identificadas a nível de gênero ou espécie, de acordo com KRIEG & HOLT (14) e com auxílio do sistema bioquímico de identificação Crystal-BD.

2.2.4 – Avaliação sensorial preliminar

Ao longo dos 21 dias de armazenamento sob refrigeração as amostras foram submetidas a uma avaliação sensorial preliminar, envolvendo observações com relação ao odor, descamação, variação da textura, aspectos dos olhos e guelras e aumento da viscosidade superficial.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 estão inseridos os resultados obtidos nas análises químicas das amostras de tecido muscular do pacu, ao longo do armazenamento a 5°C durante um período máximo de 21 dias.

Várias observações de interesse prático poderiam ser feitas com base nesses resultados, a saber:

— Os teores de nitrogênio não protéico NNP, no tecido muscular das amostras permaneceram relativamente estáveis ao longo dos 21 dias de armazenamento, mesmo numa temperatura (5°C) reconhecidamente inadequada e incompatível com uma boa prática de armazenamento de um produto perecível como o pescado. Neste período, o acréscimo observado foi de apenas 9,4%, portanto bastante reduzido.

Segundo CONTRERAS (5) peixes de água doce normalmente apresentam teores iniciais de NNP oscilando

entre 300-350mg/log, portanto valores muito próximos dos constatados neste trabalho. LISTON (20) mencionou que uma das características do processo de deterioração do pescado sob refrigeração é o aumento nos teores de substâncias oriundas da utilização do “pool” de substâncias nitrogenadas não protéicas, por exemplo, as bases nitrogenadas voláteis – BNV. No entanto, pela consulta aos resultados contidos no Quadro 1, observa-se que a exemplo do NNP teores de BNV no tecido muscular evidenciaram um acréscimo reduzido ao longo dos 21 dias de armazenamento, passando de 17,6mg/100g para níveis de 22,3mg/100g, portanto um aumento de 26,7%. Cabe lembrar que estes níveis finais de BNV estão bastante abaixo do limite de 30mg/100g, usualmente apontado como máximo tolerável, de acordo com algumas legislações.

Estes resultados sugerem que, no período analisado no processo de deterioração do pacu estocado a 5°C a atividade microbiana e a conseqüente formação de produtos de deterioração desenvolveu-se muito mais no muco superficial do que no tecido muscular, o qual permaneceu relativamente inalterado, mesmo numa condição inadequada de armazenamento.

— A exemplo do relatado para o NNP os teores de histidina livre permaneceram relativamente estáveis ao longo do armazenamento, com acréscimo de aproximadamente 10%. Já os níveis de aminoácidos livres totais mostraram uma certa evolução, variando de 117,38 a 174,83mg/100g, sugerindo, portanto, alguma atividade proteolítica no tecido muscular do pescado. Um dado interessante a destacar é que a histidina foi um dos aminoácidos livres mais abundantes no pacu, com os níveis oscilando de um mínimo de 29,2 a um máximo de 39,5% do total de aminoácidos livres presentes.

— Embora os níveis de histidina livre detectadas tenham sido relativamente elevados, a presença de histamina não foi positivada em nenhuma das amostras analisadas, mesmo após 21 dias de estocagem a 5°C.

QUADRO 1. Variações nos resultados de análises químicas do pacu, estocado a 5°C durante 21 dias.

Análises	Período de incubação (dias)															
	0				7				14				21			
	I*	II	III	X	I	II	III	X	I	II	III	X	I	II	III	X
Umidade (%)	-	59,10	60,80	59,95	63,15	55,20	62,95	60,43	66,50	60,0	55,73	60,74	-	63,0	63,08	61,54
Bases nitrogenadas voláteis (mg/100g)	-	21,50	13,82	17,66	-	14,10	12,56	13,33	-	16,0	13,68	14,84	-	23,90	20,87	22,38
Nitrogênio não protéico NNP (mg/100g)	278,0	341,10	316,31	311,80	305,0	300,0	291,86	298,95	327,0	310,30	272,44	303,24	322,0	344,80	356,1	340,9
Histidina livre (mg/100g)	62,10	31,07	45,90	46,35	71,44	22,28	43,38	45,70	124,87	19,78	51,10	65,25	76,29	23,81	53,32	51,14
Aminoácidos livres totais (mg/100g)	120,73	111,60	119,81	117,38	175,03	104,44	130,57	136,68	325,88	119,42	154,87	200,05	219,19	123,22	182,0	174,8
Histamina (mg/100g)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Observações: (*) I, II, III – Repetições do experimento, com 2 amostras analisadas em cada repetição.

X – valor médio nd – não detectado.

No entanto, a presença de bactérias produtoras de histamina foi caracterizada nas amostras originais. Os resultados revelaram contagens positivas nas amostras iniciais, quando as placas contendo ágar Niven eram incubadas a 35° e 25°C, com ausência de crescimento naquelas mantidas a 5°C. No entanto, mesmo nas amostras positivas, as contagens de microrganismos his+ foram reduzidas e normalmente abaixo de 10UFC/cm². Entre as culturas his+ isoladas do pacu foram identificadas cepas de *Plesiomonas shigelloides* e *Vibrio fluvialis*, microrganismos reconhecidos atualmente como patógenos emergentes.

A baixa ocorrência de bactérias his+ e sua virtual ausência de multiplicação em temperaturas de 5°C explicariam a não detecção de histamina no pacu armazenado, independentemente dos níveis relativamente altos de histidina livre presentes. Esses resultados também são concordantes com observações de outros autores, destacando que o problema de acúmulo de histamina em pescado é consequência de armazenamento em temperaturas elevadas, acima de 15°C (11, 13, 15).

No entanto e em caráter especulativo, poder-se-ia admitir a possibilidade do pacu acumular em seus tecidos níveis relativamente elevados de histamina, desde que armazenado em condições inadequadas de temperatura, conforme mostram os dados do *Quadro 2*.

QUADRO 2. Potencial de formação de histamina em pacu, a partir dos teores iniciais de histidina livre detectados no tecido muscular.

Período de incubação (dias)	Teores de histidina livre (mg/100g)	Teores de histamina* passíveis de formação (mg/100g)
0	46,35	33,2
7	45,70	32,7
14	65,25	46,7
21	51,14	36,6

Observação: Valores estequiométricos calculados, supondo conversão de 1mol de histidina (155g) em 1mol de histamina (111g).

Pela observação dos dados do *Quadro 2*, constata-se que valores acima de 20mg/100g, fixados pela Comunidade Econômica Européia – EEC como limite máximo, HUSS (11) poderiam eventualmente ser ultrapassados numa condição extremamente precária de armazenamento. No entanto, com base nos resultados obtidos, esta possibilidade seria muito remota, razão pela qual o pacu poderia ser considerado como de risco muito baixo como veículo eventual de intoxicação por histamina, já que valores de 50mg/100g e principalmente acima de 100mg/100g, considerados extremamente perigosos (11, 13), não poderiam ser atingidos com base nos níveis detectados de histidina livre.

— Nas *Figuras 1, 2 e 3* estão contidos os resultados das contagens bacterianas no muco superficial dos pacus estocados a 5°C durante 21 dias. Estas contagens foram efetuadas em intervalos de 7 dias, com as placas sendo incubadas a 35°, 20° e 5°C.

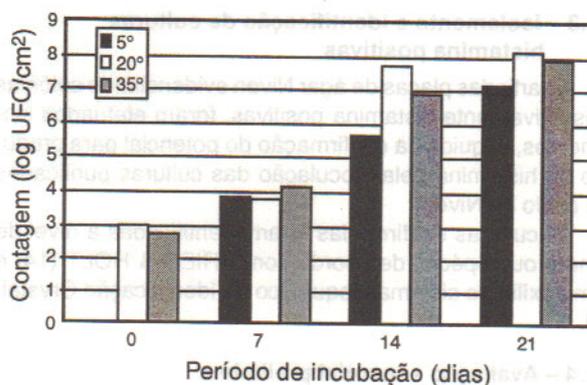


FIGURA 1. Variação da contagem padrão em placas em amostras de pacu armazenado a 5°C durante 21 dias (média de 3 repetições).

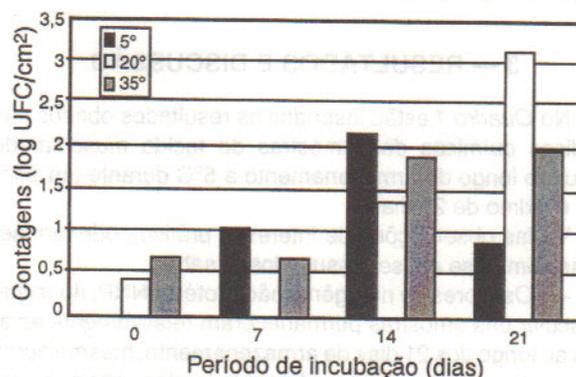


FIGURA 2. Contagem de microrganismos H₂S+ em amostras de pacu armazenado a 5°C durante 21 dias (média de 3 repetições).

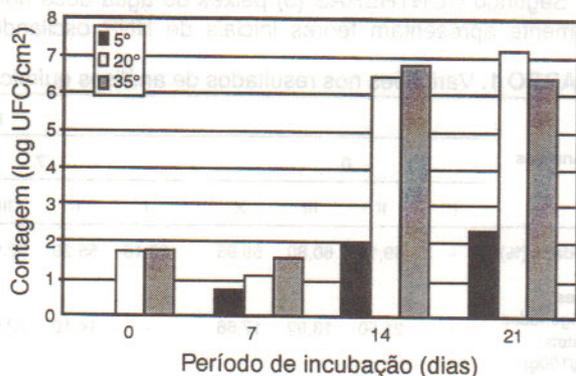


FIGURA 3. Variação da contagem de microrganismos gelatinase + em amostras de pacu armazenado a 5°C durante 21 dias (média de 3 repetições).

No que se refere às contagens padrão, as populações iniciais foram relativamente baixas, inferiores a log 3,0UFC/cm² e sempre mais elevadas às temperaturas de 35° e 20°C comparativamente a 5°C, indicando a prevalência de uma microbiota mesófila/psicrotrófila. Um aumento acentuado nas contagens, atingindo valores acima dos limites preconizados em especificações de qualidade (>10⁷UFC/cm²) (6, 8, 9, 11, 20) somente foi constatada com

14 dias de armazenamento e, mesmo assim, principalmente nas placas incubadas a 35° e 20°C.

Estes resultados evidenciam que o pescado fluvial de regiões tropicais é efetivamente bastante tolerante ao armazenamento sob refrigeração, provavelmente, conforme sugerido por GRAM *et al.* (9) e LEITÃO & SILVEIRA (16), devido ao fato da microbiota natural contaminante exigir um período maior de adaptação ao ambiente em baixas temperaturas, até evidenciar um menor tempo de geração.

Nos meios específicos para contagem de deterioradores potenciais, o ágar gelatina revelou-se bastante adequado, com comportamento microbiano semelhante ao verificado em ágar PCA, ou seja, contagens elevadas, acima de log 6,0UFC/cm² somente sendo constatadas após 14 dias de armazenamento e sempre às temperaturas de 35° e 20°C.

Já o agar peptona ferro, proposto por LEVIN (1968), não se mostrou muito adequado, geralmente com contagens baixas, mesmo após 14 e 21 dias de estocagem e geralmente inferiores a log 3,0 UFC/cm². O desempenho inadequado deste meio, que utiliza o tiosulfato de sódio como única fonte de enxofre, já havia sido mencionado por GRAM *et al.* (8) que propuseram um meio modificado, com adição suplementar de um aminoácido sulfurado na composição.

As observações de natureza sensorial não revelaram uma total concordância com os resultados de análises químicas e microbiológicas. Assim, até 7 dias de armazenamento, o pescado não apresentava evidências marcantes de alterações no odor, aparência e viscosidade superficial. Após 14 dias, estas alterações já eram bem perceptíveis, com odor bastante alterado, elevada viscosidade superficial, descamação e outras evidências de um pescado em processo de deterioração. No entanto, a constatação sensorial de deterioração não foi corroborada pelos parâmetros químicos (BNV) e mesmo pelos resultados microbiológicos, confirmando dados de outros autores, evidenciando a dificuldade e imprecisão do uso destes parâmetros na avaliação do frescor e qualidade do pescado (11, 20, 21).

4 — CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados desta pesquisa permitem as seguintes considerações:

- A exemplo de outros peixes fluviais de regiões tropicais, o pacu revelou-se bastante resistente à conservação sob refrigeração somente evidenciando uma alteração marcante com 14 dias de armazenamento em temperatura inadequada de refrigeração.
- A rejeição do alimento foi baseada principalmente em parâmetros sensoriais (aspecto, odor, textura), uma vez que com relação aos índices químicos (BNV) e microbiológicos o produto ainda não se encontrava numa situação definitiva de rejeição, mesmo com 14 dias de estocagem.
- O processo de deterioração pareceu concentrar-se principalmente no muco superficial, uma vez que os parâmetros químicos (NNP, BNV, aminoácidos livres) do tecido muscular não evidenciaram alterações marcantes, mesmo após 21 dias de estocagem.
- A presença de histamina não foi positivada em nenhuma das amostras e os níveis de histidina livre, embora relativamente elevados, não sugerem maiores riscos

desta espécie como eventual veículo de intoxicação por histamina.

- Bactérias mesófilas produtoras de histamina foram constatadas em números reduzidos, sendo detectadas cepas de *Plesiomonas shigelloides* e *Vibrio fluvialis* entre elas.
- A microbiota contaminante natural foi bastante reduzida, predominando microrganismos mesófilos e/ou psicrótrófilos, com baixas contagens iniciais a 5°C. Ao longo do armazenamento esta microbiota evidenciou uma lenta multiplicação a 5°C, somente sendo alcançadas populações compatíveis com o processo de deterioração (> 10⁷ UFC/cm²) após 14 dias de armazenamento.

5 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ABABOUC, L. Histamin food poisoning: an update. *Fish Tech. News*, FAO/DANID, v. 11, n. 1, p. 3-5, 1991.
- (2) AMERICAN OIL CHEMIST SOCIETY - AOAC - **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist Society**. 3ed., Champaign, 1988.
- (3) BREMNER, H.A.; OLLEY, J.; STATHAM, J.A. & VAIL, A.M.A. Nucleotide catabolism: influence on the storage life of tropical species of fish from the North West Shelf of Australia. *J. Food Sci.* Chicago, v.53, p.6-11, 1988.
- (4) CATTANEO, P. & CANTONI, C. Identificazione e dosaggio rapido dell'istamina nelle carni di pesce. *Ind. Alim.*, Roma, v.17, p.303-307, 1978.
- (5) CONTRERAS, E. *Bioquímica de Pescados e Derivados*. Jaticabal: UNESP, SP, 409p., 1994.
- (6) DISNEY, J.G. The spoilage of fish in the tropics. In: ANUAL TROPICAL FISHERIES TECHNOLOGICAL CONFERENCE, 1st, Corpus Christi, 1976. **Proceedings...** Corpus Christi, Texas, 1976. 13p.
- (7) FOO, L.Y. Simple and rapid paper chromatographic method for the simultaneous determination of histamine and histidine in fish samples. *J. AOAC*, Washington, v.60, p. 183-185, 1977.
- (8) GRAM, L.; TROLLE, G.; HUSS, H.H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.4, p.65-72, 1987.
- (9) GRAM, L.; TROLLE, G.; HUSS, H.S. **Identification, characterization and inhibition of bacteria isolated from tropical fish**. Denmark, RVAU. 1989, 157p. Thesis (Doctor) Royal Veterinary and Agricultural University, 1989.
- (10) HARRIGAN, W.F. & MC CANCE, M.E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. London: Academic Press, 1976, 452p.
- (11) HUSS, H.H. **Assurance of seafood quality**. Lyngby: Ministry of Fisheries, Technical University, 1993, 169p.
- (12) INSTITUTO DEL FOMENTO PESQUERO. **Métodos de laboratorio para el examen de productos marinos**. Santiago: Instituto del Fomento Pesquero, Santiago, 1971. Sem paginação.
- (13) INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Microorganisms in Foods: Their Significance and Methods of Enumeration**, v.1, 2ed., Toronto. University of Toronto Press, 1978. 434p.

