

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA NO
PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE BASES PROTÉICAS
DESIDRATADAS FORMULADAS COM TILÁPIAS
(*Oreochromis niloticus* e *Tilapia rendalli*)**

SANDRA REGINA MARCOLINO GHERARDI

*Itaguai, Rio de Janeiro
Novembro, 1995*

T
664.9404
G415a

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA NO PROCESSO DE
ELABORAÇÃO DE BASES PROTÉICAS DESIDRATADAS
FORMULADAS COM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus* e *Tilapia rendalli*)

SANDRA REGINA MARCOLINO GHERARDI

Sob orientação do professor: Antonio de Albuquerque Figueiredo

Tese apresentada ao Departamento de Tecnologia
de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração em Microbiologia de Alimentos.

T664.9407

G415a

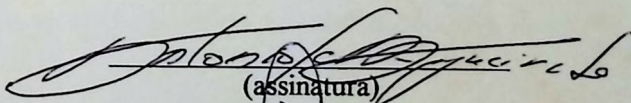
Itaguaí, Rio de Janeiro
Novembro, 1995

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA NO PROCESSO DE
ELABORAÇÃO DE BASES PROTÉICAS DESIDRATADAS
FORMULADAS COM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus* e *Tilapia rendalli*)

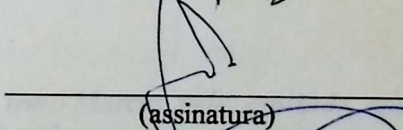
SANDRA REGINA MARCOLINO GHERARDI

Aprovada em 30 de novembro de 1995.

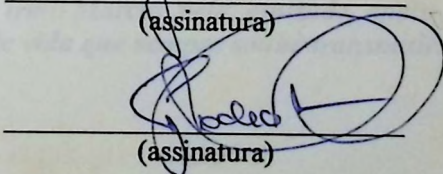
Antonio de Albuquerque Figueiredo
(nome)


(assinatura)

José Francisco Pereira Martins
(nome)


(assinatura)

Carlos Alberto da Rocha Rosa
(nome)


(assinatura)

AGRADECIMENTOS

***À minha mãe
Lea***

***Ao Victor com todo meu amor, pela compreensão,
dedicação e paciência em todos os momentos.***

***À minha irmã Marcia pela amizade, apoio e
exemplo de vida que sempre soube transmitir.***

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antonio de Albuquerque Figueiredo, com respeito e admiração, expresso minha profunda gratidão pela orientação, incentivo e dedicação com que conduziu este trabalho, bem como pela amizade desenvolvida no decorrer destes anos.

Ao professor e amigo Pedro Paulo de Oliveira Silva, pelas sugestões e orientação, bem como, pelo auxílio prestado no desenvolvimento das análises microbiológicas.

Ao professor Gerson Luiz Vieira Coelho, coordenador do curso de pós-graduação, pelo auxílio financeiro para a aquisição dos meios de cultura e reagentes.

Ao amigo Mariano, pela grande ajuda prestada na elaboração das bases desidratadas.

À Elizete, pela amizade e auxílio na identificação de microorganismos.

À Lucia, Dona Lúcia e Dona Erlene, pela grande cooperação no preparo dos meios de cultura.

Ao Sr, Hélio pela amizade e dedicação durante todos estes anos.

Aos amigos de turma da pós-graduação e a todos aqueles que de uma forma ou outra, auxiliaram no desenvolvimento desta tese.

ÍNDICE GERAL

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Microbiota encontrada no pescado e principais contaminantes.....	5
2.2. Aspectos microbiológicos de alimentos desidratados.....	15
2.3. Principais microorganismos causadores de deterioração e/ou toxinfecção que podem ser detectados em pescado e em produtos desidratados.....	17
2.3.1. Contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos..	18
2.3.2. Contagem de fungos e leveduras.....	21
2.3.3. Coliformes totais, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i>	22
2.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.3.5. <i>Bacillus cereus</i>	30
2.3.6. <i>Clostridium perfringens</i>	32
2.3.7. <i>Salmonella</i>	34

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Obtenção das matérias primas.....	37
3.2. Processo de elaboração do produto.....	38
3.3. Preparo das amostras.....	40
3.4. Contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos.....	41
3.5. Contagem de fungos e leveduras.....	41
3.6. Determinação de coliformes totais e fecais.....	41
3.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	43
3.8. <i>Bacillus cereus</i>	44
3.9. <i>Clostridium</i> sulfito redutores.....	45
3.10. Evidenciação de <i>Salmonella</i>	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela. 1 - Contagens microbiológicas obtidas para as matérias primas utilizadas nas diferentes partidas elaboradas.....	48
Tabela. 2 - Qualidade microbiológica das bases úmidas obtidas a partir da massa de pescado e veículo amiláceo.....	52
Tabela. 3 - Comportamento dos microorganismos deteriorantes nas diferentes partidas de base seca durante a avaliação da estabilidade.....	54
Tabela. 4 - Comportamento dos microorganismos indicadores observado durante a avaliação da estabilidade das bases desidratadas.....	56
Tabela. 5 - Comportamento dos microorganismos patogênicos observado nas bases secas durante 90 dias.....	58

ÍNDICE DE QUADROS

	Página
Quadro.1 - Bactérias isoladas e identificadas na superfície e vísceras de peixes de águas fluviais e lacustres.....	14
Quadro.2 - Condições para crescimento e produção de toxina estafilocócica	30
Quadro.3 - Padrões microbiológicos para pescado fresco, amidos, farinhas e féculas.....	59

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

	Página
Fluxograma. 1 - Processamento das bases MISPRAN.....	39

RESUMO

Acompanhou-se o processamento de bases protéicas desidratadas com o objetivo de verificar e evidenciar possíveis pontos críticos durante o processo. Para tanto, estudou-se as características microbológicas de tilápias (*Oreochromis niloticus* e *Tilapia rendalli*), criadas no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e do veículo amiláceo (fubá e farinha de trigo), ingredientes a serem utilizados na elaboração das bases. Avaliou-se, também, a estabilidade das mesmas, por análises efetuadas no dia da elaboração, e após 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias, com o objetivo de verificar o comportamento dos microorganismos presentes nas bases desidratadas mantidas à temperatura ambiente. Foram realizadas as seguintes determinações: mesófilos aeróbios, fungos e leveduras, coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*.

Os resultados encontrados para coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* no pescado utilizado na elaboração da primeira partida do produto, foram de $<1/g$ e 5×10 ufc/g respectivamente. No entanto, resultados bem diferentes destes, foram observados no peixe utilizado nas demais partidas, sendo, $2,4 \times 10^2/g$ e 5×10^3 ufc/g respectivamente para coliformes fecais e *S. aureus* na segunda partida e $2,4 \times 10^4/g$ e $1,6 \times 10^5$ ufc/g na terceira partida.

O local de captura do pescado pode ter influenciado estes resultados, uma vez que o pescado utilizado na primeira partida, foi capturado em local diferente.

Em função do tratamento térmico aplicado ao pescado (autoclavagem a 121°C por 20 minutos), a contagem encontrada para coliformes fecais e *Staphylococcus aureus*, não impediu sua utilização na elaboração de um produto com características microbiológicas dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Saúde.

O veículo amiláceo utilizado, apresentou contagem praticamente constante e dentro dos limites exigidos por lei. Os valores para contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos, coliformes fecais e *Bacillus cereus* foram 10^3 ufc/g, $<1/g$ até 4,3 cels./g e 10 ufc/g respectivamente.

A análise das bases úmidas (massa de peixe autoclavada, incorporada ao veículo amiláceo) e o estudo da estabilidade das bases secas resultantes (base úmida após secagem em estufa a 80°C por cerca de 4 horas), mostrou que os microorganismos pesquisados apresentaram contagem praticamente constante, não sendo observadas grandes modificações entre as bases úmidas e os respectivos produtos desidratados. A única exceção foi observada na primeira partida na qual verificou-se um grande crescimento de *Bacillus cereus* na base úmida ($>10^5$ ufc/g), resultante de uma falha no processamento, levando à rejeição do produto. Detectada e corrigida, tal crescimento não foi mais observado.

Com base nestas observações, é possível produzir bases protéicas desidratadas que podem ser armazenadas à temperatura ambiente sem comprometimento de sua qualidade microbiológica, permitindo sua distribuição e utilização, sem necessitar de outros processos de conservação.

ABSTRACT

The processing of dehydrated proteinic bases was followed with the objective to check and eliminate possible critical points during the process. Therefore, the study of the microbiological characteristics of tilápias (*Oreochromis niloticus* and *Tilapia rendalli*), raised in the Campus of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, and of the amylaceous media (flours of maize and wheat) which were ingredients used in the preparation of the bases. The stability of such bases also evaluated through analyses done in the very first day of preparation and, later, after 7, 15, 30, 45, 0 and 90 days with the aim of checking the behavior of microorganism present in the dehydrated bases kept at room temperature. The following analyses were done : Agar Plate Count, Mold and Yeast, total and fecal coliforms and *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*.

The counts for fecal coliforms and *Staphylococcus aureus* in the fish used in the processing of the first lot of the product were $<1/g$ and $5 \times 10^1 \text{ ufc/g}$ respectively. However, quite different results were observed in the fish used in the other lots, as follows $2,4 \times 10^2/g$ and $5 \times 10^3 \text{ ufc/g}$ for fecal coliform and *S. aureus* in the second lot, and $2,4 \times 10^4/g$ and $1,6 \times 10^5 \text{ ufc/g}$ in the third one.

Since the fish used in the first lot had been captured in a different place, it may have influenced the results.

Due to the thermal treatment applied to the fish (autoclaving at 121°C for 20 minutes) the counts for fecal coliform and *S. aureus* did not prevent its use in the processing of a product with microbiological characteristics within the limits established by the Ministério da Saúde.

The amylaceous medium used showed a practically constant count within the limits established by law. The value for the agar plate count, fecal coliform and *Bacillus cereus* were 10³ ufc/g, <1/g to 4,3/g and 10 ufc/g respectively.

The analysis of the moist bases - heat-treated fish mass incorporated to the amylaceous medium - and the study of the stability of the resulting dried bases (moist basis after drying in stove to 80°C for about 4 hours) showed an almost constant count for the researched microorganisms, and no significant modification was observed between the moist bases and the respective dehydrated products. The only exception had been observed in the first set in which there was a great increase of *Bacillus cereus* in the moist basis (>10⁵ ufc/g) resulting from a flaw in the processing which led to the rejection of the product. After correction it was not observed anymore.

Based on these observations we can say that it is possible to produce dehydrated proteinic bases which can be stored at warm temperature without risking the microbiological quality, allowing its distribution and use with no need of other conservation processes.

1. INTRODUÇÃO

O mundo está diante de um grave problema: fornecer alimento suficiente para uma população que cresce a uma velocidade maior do que aquela com que os alimentos são produzidos. Este problema é mais acentuado nos países em desenvolvimento, onde a tecnologia disponível não é suficiente para permitir um aproveitamento adequado dos recursos naturais existentes (AKANDE et al, 1988) dificultando com isso, o fornecimento de uma dieta equilibrada aos seus habitantes.

Associado à esta situação, há ainda o fato de que o acesso aos alimentos pelas diversas camadas da população é cada vez mais desigual e inadequado, mostrando que um aumento substancial na produção de alimentos, não resulta, necessariamente, em maior disponibilidade de alimento para as populações carentes. Este aumento dependerá diretamente do tipo de alimento e do consumidor alvo.

Os problemas nutricionais estão associados a problemas sócio econômicos ocasionados entre outros fatores, por barreiras geográficas, pela urbanização da população e, principalmente, pela má distribuição de renda.

Basicamente, a solução deste problema depende da aceleração do processo de desenvolvimento social e econômico do país, bem como, de uma distribuição mais justa dos benefícios.

Várias alternativas utilizando proteína animal, vegetal ou ambas, têm sido propostas, tais como: farinhas de peixe, mistura de cereais (Incaparina), leite desnatado suplementado com farinha de amendoim (LEL VALLE & NICKERSON, 1968) e mais recentemente, biscoitos com proteína hidrolizada de peixe, "Keropok" (YU & TAN, 1990) e um produto seco, salgado a base de sardinhas e cereais "Nutripez" (LEÓN et al, 1991).

Com o objetivo de contribuir para a redução dos índices de desnutrição, foi criado em 1978, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) o Projeto MISPRAN (FIGUEIREDO, 1978). Este projeto tinha por meta desenvolver tecnologia de utilização de miúdos bovinos (GAVA, 1979) e/ou frangos inteiros (VIANA & FIGUEIREDO, 1980) os quais, após desintegração e incorporação do veículo amiláceo, dariam origem a um produto final desidratado com cerca de 40% de proteína total, que seria distribuído a crianças e adolescentes em idade escolar, gestantes e nutrízes.

O processamento baseava-se nas seguintes etapas: seleção e limpeza dos miúdos; corte em pedaços; cozimento; desintegração; adição do veículo amiláceo e homogeneização; (adição eventual de proteína de soja); desidratação; moagem e acondicionamento. O estudo microbiológico em miúdos bovinos a serem utilizados nas formulações foi realizado por FAVARIN (1981).

Com base nos trabalhos desenvolvidos anteriormente (GAVA, 1979; VIANA & FIGUEIREDO, 1980; FAVARIN, 1981; FREIRE JÚNIOR, 1981; ROBBS, 1982; LEITE, 1984 e MACHADO, 1984) e nos resultados obtidos, iniciou-se uma nova linha de pesquisa, utilizando como fonte protéica peixes de água doce, mais precisamente tilápias (*Oreochromis niloticus* e *Tilapia rendalli*).

Dentre as espécies de água doce que podem ser cultivadas estão a carpa comum, salmonete e tilápia. As espécies de tilápia, embora abundantes, possuem pouco valor comercial, pois, apesar de sua alta prolificidade, possuem maturação precoce e muitas espinhas, além de sua carne possuir acentuado sabor a "lodo", sendo estas características nada atrativas aos consumidores (AKANDE, 1989 e YU & TAN, 1990). O baixo valor comercial desta espécie, serviu para baratear os custos do produto, sem no entanto, comprometer o teor protéico do produto final. Permitiu, ainda, mostrar como um peixe de água doce de baixo valor comercial como a tilápia, pode ser economicamente utilizado para produzir alimentos protéicos estáveis e de fácil conservação.

De acordo com MORAIS et al (1981), o nível de consumo de pescado no Brasil ainda está bem abaixo do consumo médio mundial, que é de 11 kg por indivíduo/ano. Um dos entraves ao aumento do consumo pela população brasileira deve-se à deficiência dos sistemas de transporte, distribuição, comercialização e de controle de qualidade do pescado. Além disso, a falta de hábito e a educação deficiente do brasileiro sobre o valor nutritivo do pescado, contribuem para a manutenção deste quadro.

Como o objetivo do Projeto MISPRAN-Peixe é atender às classes mais carentes e vulneráveis, a qualidade microbiológica do produto assume grande importância para o sucesso do projeto, pois desta dependerá a qualidade e a estabilidade do produto final.

Este trabalho teve por objetivo, avaliar a qualidade microbiológica das matérias primas (tilápias e veículo amiláceo); detectar e eliminar, através de estudos microbiológicos, os pontos críticos do processo, e acompanhar a estabilidade das misturas por até 90 dias mantidas em temperatura ambiente, dando com isto, suporte ao processo de elaboração das bases protéicas desidratadas formuladas com tilápias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microbiota encontrada no pescado recém capturado e principais contaminantes

As alterações que ocorrem no pescado desde a sua captura, podem levá-lo a deterioração. Essas alterações são graduais sendo que nessa cadeia é difícil estabelecer o momento em que o pescado se torna impróprio para consumo, pois a diferenciação entre próprio e impróprio varia de indivíduo para indivíduo e depende de vários fatores (FALCÃO et al, 1994).

A qualidade não deve ser determinada por um único parâmetro, pois são muitos os fatores que devem ser considerados.

O primeiro componente da qualidade do pescado é determinado pela qualidade intrínseca ou estado inicial; o segundo componente é a qualidade da mão de obra utilizada em sua manipulação e, finalmente, existem os fatores de ordem microbiana e bioquímica (FERREIRA & BERAQUET, 1981 e PEDROSA-MENABRITO & REGENSTEIN, 1990 a).

Dentre os produtos de origem animal, o pescado e em especial os peixes, são muito susceptíveis aos processos de deterioração (LEITÃO, 1977 e LEITÃO et al, 1979), em decorrência do seu pH estar próximo da neutralidade; uma elevada atividade de água (A_w); alto teor de nutrientes (LEITÃO, 1988); autólise facilitada pelas enzimas dos tecidos e das vísceras e, oxidação de lipídios (LEITÃO, 1979; BERAQUET & LINDO, 1985 e BERAQUET et al, 1985). A ação de microorganismos presentes na microbiota natural ou como contaminantes em decorrência de manuseio inadequado, contato com equipamentos, utensílios ou superfícies contaminadas e armazenamento inapropriado, podem aumentar sensivelmente a carga de microorganismos, levando à aceleração do processo de deterioração (LEITÃO, 1977; LEITÃO et al, 1979; BERAQUET & LINDO, 1985; BERAQUET et al, 1985; LEITÃO, 1988 e SALES et al, 1988 a).

Tanto o peixe de água salgada quanto o de água doce, contêm elevados níveis de proteína e outros constituintes nitrogenados. Na carne de peixe, o percentual de proteínas é relativamente estável, situando-se entre 10 e 20%, enquanto o teor de carboidratos normalmente é muito pequeno e o teor de gordura, varia em função da espécie (JAY, 1978).

Frescor não é uma propriedade fácil de ser definida ou medida. A perda de frescor seguida pela deterioração, é uma complexa combinação de processos microbiológicos, químicos e físicos (CONNELL, 1975; em PEDROSA-MENABRITO & REGENSTEIN, 1990.a). O processo de deterioração está ligado a alterações progressivas que se instalam após a morte, podendo resultar em um produto impróprio para o consumo humano. Estas alterações são relativas às características próprias do pescado fresco, principalmente quanto a cor, consistência, odor e sabor, podendo resultar não só no aumento das perdas do

produto, como também, em risco à saúde dos consumidores (LEE, 1976 e BRANDÃO & FURLAMENTO, 1984).

Em geral, considera-se que a carne dos peixes vivos e sadios, ou recém capturados, está livre de microorganismos, encontrados apenas nas guelras, trato intestinal e limo superficial. Porém, logo após a morte, as bactérias começam a proliferar; primeiramente nas guelras, superfície e vísceras e gradualmente penetram nos tecidos (BERTULO, 1975; NICKELSON & FINNE, 1976 e BERI et al, 1989). Isto se deve ao fato de que, enquanto o peixe está vivo, sua pele atua como uma barreira mecânica à penetração das bactérias. Porém, logo após a morte, este perde suas defesas, tornando-se vulnerável ao ataque microbiano. As modificações observadas podem ser em grande parte, atribuídas a alterações nos tecidos, causadas pelo ataque de tipos específicos de bactérias e dos produtos por elas gerados. O grau de deterioração é determinado, principalmente, pela carga bacteriana inicial, pela temperatura do músculo do peixe, pelo tempo decorrido depois de sua morte, e pelas práticas sanitárias adotadas (EIROA, 1980).

O número e os gêneros e espécies de microorganismos presentes no pescado na hora do desembarque deste, dependem de vários fatores tais como: espécie, estação do ano, área de pesca, método de captura utilizado, manipulação a bordo e tempo e temperatura de estocagem (VANDERZANT et al, 1970; FRAZIER, 1972 e PEDROSA-MENABRITO & REGENSTEIN, 1990 b).

As diferenças que podem ser esperadas dependem das variações na salinidade, temperatura, matéria orgânica e qualidade da água em cada área de pesca (NICKELSON & FINNE, 1976).

A prevenção da deterioração e a proteção contra a contaminação são fatores muito importantes quando se pretende salvaguardar a qualidade do pescado. Assim sendo, após a captura, deve-se proceder a evisceração o mais rapidamente possível, com a finalidade de eliminar as enzimas digestivas presentes no estômago e intestinos e grande número de bactérias (CUTTING & SPENCER, 1968 e EIROA, 1980). Se o peixe não é eviscerado imediatamente, as bactérias intestinais logo encontram caminho através da parede intestinal em direção à carne desta cavidade (LEITÃO et al, 1976). Acredita-se que este processo seja auxiliado pela ação de enzimas proteolíticas do intestino que podem ser enzimas naturais inerentes ao intestino do peixe, e/ou enzimas produzidas por bactérias existentes no canal intestinal deste (JAY, 1978).

LEITÃO et al (1985), citam que com relação às vísceras, o fato delas estarem ou não cheias de alimentos é o fator mais importante na variação das contagens microbiológicas, sendo mais elevadas no caso dos peixes estarem alimentados por ocasião da captura.

Após a evisceração, o resfriamento rápido, utilizando-se gelo ou refrigeração mecânica, também é de suma importância, dada a perecibilidade do produto. Com isto, evita-se a multiplicação de bactérias, com exceção das psicrófilas e psicrotróficas, conseguindo-se assim, melhor conservação do pescado pela diminuição da velocidade da ação das enzimas produtoras de alterações nesse produto (BERTULO, 1975; BRANDÃO & FURLAMENTO, 1984 e GUIMARÃES et al, 1988).

O método de captura utilizado é, freqüentemente, mencionado como responsável por influenciar no número e nos tipos de bactérias encontradas no pescado *in natura*, (NICKELSON & VANDERZANT, 1976; em WARD & BAJ, 1988).

SHEWAN (1949; em WARD & BAJ, 1988), demonstrou que o peixe capturado com rede de arrasto, normalmente carrega uma carga microbiana de 10 a 100 vezes maior do que aquele capturado de anzol. Este aumento é atribuído ao fato dos peixes serem arrastados pelo fundo do mar, agitando o sedimento que geralmente contém grandes quantidades de bactérias, que contaminam o produto. Além disso, durante o arraste o pescado pode ter seu conteúdo intestinal rompido.

Outros métodos de captura não apresentam este problema; porém, quando qualquer rede sai da água e é levada a bordo, cada pescado é submetido à pressão, e o seu conteúdo intestinal pode vir a contaminar a pele dos outros que o rodeiam. Se o pescado procede de águas profundas, o conteúdo intestinal pode sair pela pressão que exerce a expansão repentina da bexiga natatória. Em ambos os casos, os microorganismos que possam existir no intestino dos peixes (patogênicos ou não), se espalharão por toda a carga capturada (NICKELSON & FINNE, 1976 e EIROA, 1980).

O crescimento bacteriano que ocorre no pescado após a captura e durante o período em que este permanece armazenado sob refrigeração é sem dúvida, o principal fator responsável pela sua deterioração (LEITÃO et al, 1985). Contudo, SHEWAN et al, (1979; em FALCÃO et al, 1994), citam que a penetração microbiana nos músculos, a partir das vísceras ou guelras, ocorre com intensidades diferentes, dependendo fundamentalmente das condições de temperatura e umidade, com maior rapidez do processo no caso da elevação destas (BERAQUET & LINDO, 1985). Entretanto, sabe-se que em função das condições que prevalecem no armazenamento, as alterações organolépticas e químicas, resultantes da atividade microbiana que levam à rejeição do alimento ocorrem, fundamentalmente, pela

utilização de substâncias nitrogenadas não protéicas e de aminoácidos, com posterior produção de proteinases, de ácidos e bases voláteis e de compostos sulfurados, os quais são responsáveis pelos odores desagradáveis (LIMA, 1971 e LEITÃO et al, 1974 a).

A microbiota do pescado marinho recém capturado, é dependente daquela existente nas águas onde este vive. Porém, tem sido observado que esta é caracterizada pela predominância de bactérias não esporogênicas, Gram-negativas e não fermentativas principalmente dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* e fermentativas do gênero *Vibrio* ao lado de Gram-positivas do gênero *Bacillus* (HOATHER & ENGLISH, 1968; FRAZIER, 1972; LEITÃO et al, 1985 e BERI et al, 1989). No Brasil, ainda em pescado marinho, as pesquisas apontaram para a prevalência de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Flavobacterium* e bactérias corineformes (LEITÃO et al, 1974 a; LEITÃO et al, 1976), portanto, com resultados semelhantes aos relatados em outros países.

No caso de peixes capturados próximo à costa, podem ser encontrados muitos microorganismos de origem terrestre. Alguns destes pertencentes aos gêneros já mencionados, e também, populações importantes de *Bacillus*. Se os locais de pesca estiverem situados próximo à desembocadura de esgotos, microorganismos de origem fecal também serão encontrados (EIROA, 1980).

Quando o pescado é armazenado no gelo, a microbiota contaminante é constituída principalmente por *Pseudomonas*, *Moraxella* e corineformes, e as alterações organolépticas são fundamentalmente produzidas por microorganismos do gênero *Pseudomonas*. Sob frio, a microbiota Gram-positiva se desenvolve lentamente tendo esta portanto, maior

importância quando o pescado é armazenado sem refrigeração (VANDERZANT et al, 1970; LEITÃO et al, 1974 a; e HIMELBLOOM et al, 1994).

A microbiota natural dos peixes capturados em águas tropicais e temperadas é relativamente a mesma. As variações observadas são muito mais acentuadas em termos de predominância relativa do que em gêneros presentes (LEITÃO, 1977).

Especificamente com relação à estudos microbiológicos em pescado de água fluviais e lacustres, LEITÃO et al (1985), citam três trabalhos importantes nesta área. DISNEY et al, estudaram parâmetros de qualidade em tilápias capturadas em lagoas na Uganda, África, constatando que os peixes capturados sob condições adequadas de higiene e manuseio podiam ser conservados em gelo por períodos de três semanas, portanto, muito mais tempo que o normal de conservação do pescado marinho.

HOFFMAN et al, estudaram a conservação de várias espécies de peixes fluviais e lacustres capturados em países africanos, incluindo a Tilápia esculenta e Tilápia nilótica, verificando contagens iniciais em Tilápia esculenta, eviscerada ou não, normalmente em torno de 10^3 cels./cm² na superfície e inferiores a 10^4 cels./g no tecido muscular; contagens um pouco mais elevadas, mas geralmente inferiores a 10^4 , também foram observadas em Tilápia nilótica.

SANTOS, em extensa revisão sobre a bacteriologia de pescado de água doce nas regiões tropicais, relata a ocorrência predominante de bactérias do gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium-Cytophaga*, *Vibrio*, bactérias corineformes e *Bacillus*, portanto, com características similares ao pescado de origem marinha. Por outro lado, em águas doces tropicais, a microbiota Gram-negativa e Gram-positiva distribui-se na

proporção de 56 e 43%, respectivamente, contrastando com a presente em águas marinhas, frias ou temperadas, na qual a proporção passa a ser de 78 e 17% respectivamente. Outra observação interessante, foi em relação à presença de *Pseudomonas* na microbiota superficial dos peixes, enquanto em pescado marinho de águas temperadas ela representa aproximadamente 25% da microbiota total, em águas doces tropicais cai para 5%. Relata ainda numerosos dados de contagens de bactérias na superfície de tecido muscular de várias espécies de peixes lacustres e fluviais, com os resultados variando entre 10^2 e $10^4/\text{cm}^2$ e 10^2 e $10^5/\text{g}$, na superfície e tecido muscular, respectivamente.

Ainda com relação ao pescado de água doce, SANTOS & GARBUTT (1979), pesquisando a microbiologia da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillanti*, *valenciennes*) capturada na região Amazônica, verificaram que a microflora presente nesta espécie, variava de 10^4 - 10^6 células por grama de guelras, conteúdo intestinal ou por cm^2 da superfície da pele. Constataram também, a predominância de *Pseudomonas* grupos I e II, bactérias corineformes (no intestino e guelras) e *Flavobacterium* - *Cytophaga* (nas guelras).

LEITÃO et al (1985), trabalhando com peixes de espécies fluviais e lacustres no estado de São Paulo, observaram a predominância de uma microbiota mesófila, contrastando com aquela verificada em pescado marinho, no qual há uma sensível prevalência de formas psicrotróficas, confirmando o que foi dito por NICKELSON & FINNE, (1976), capazes portanto, de se desenvolver em temperaturas de refrigeração como também, naquelas próximas da ambiental. Tal constatação pode ser comprovada pelo fato de que as condições de temperatura elevada que predominam em nosso meio, típicas de clima tropical ou subtropical, não permitiriam que as águas interiores atingissem

temperaturas próximas das de refrigeração, favorecendo, portanto, o estabelecimento de uma microbiota tipicamente mesófila no pescado.

Comparando a flora bacteriana marinha e fluvial, as pesquisas realizadas até agora, evidenciam que a temperatura das águas e de armazenamento do pescado, parecem influenciar mais na definição da microbiota predominante do que propriamente a origem marinha ou fluvial deste (FALCÃO et al, 1994).

O Quadro.1, mostra os resultados obtidos por LEITÃO et al (1985), no isolamento e identificação de culturas a partir de amostras superficiais ou em vísceras de peixes de águas fluviais e lacustres nas temperaturas de 37, 20 e 7°C.

A natureza mesófila da microbiota natural do pescado fluvial e lacustre em regiões tropicais, seria um dos principais fatores responsáveis pelo seu maior período de armazenamento sob refrigeração (HANSEN, 1983), uma vez que os microorganismos mesófilos predominantes, são mais adaptados à temperaturas ambientais elevadas. A acentuada queda desta por ocasião da refrigeração inibe seu desenvolvimento (FALCÃO et al, 1994). Isto confirma o que foi verificado por GIRIJA & BALAKRISHNAN (1988), que, estudando as mudanças histológicas ocorridas na carne de peixes de água doce sob refrigeração, observaram que estes, apresentavam um padrão diferente de deterioração, o que conferia ao produto uma vida útil maior.

Em função dos poucos dados existentes sobre a microbiologia e conservação do pescado de águas fluviais e lacustres nas regiões tropicais, algumas diferenças bastante significativas devem ser destacadas ao compará-los com o pescado marinho de águas temperadas, que, certamente, está muito mais estudado no que diz respeito aos aspectos

Quadro.1 - Bactérias isoladas e identificadas na superfície e vísceras de peixes de águas fluviais e lacustres.

Gênero ou espécie	Isolamento	
	Nº	%
À partir de peixes fluviais		
<i>Aeromonas</i> sp.	39	48,7
<i>Acinetobacter</i> sp.	8	10,0
<i>Micrococcus</i> sp.	7	8,7
<i>Pseudomonas</i> sp.	7	8,7
<i>Citrobacter freundii</i>	4	5,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	5,1
<i>Bacillus</i> sp.	4	5,1
<i>Klebsiella</i> sp.	3	3,7
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	2,5
<i>Escherichia coli</i>	1	1,2
<i>Enterobacter</i> sp.	1	1,2
Total	80	100,0
À partir de peixes lacustres		
<i>Aeromonas</i> sp.	53	49,5
<i>Acinetobacter</i> sp.	28	26,2
<i>Pseudomonas</i> sp.	9	8,4
Bactérias Corineformes	6	5,7
<i>Enterobacter</i> sp.	6	5,7
<i>Moraxella</i> sp.	1	0,9
<i>Serratia</i> sp.	1	0,9
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	0,9
<i>Micrococcus</i> sp.	1	0,9
<i>Bacillus</i> sp.	1	0,9
Total	107	100,0

fonte: LEITÃO et al, 1985

microbiológico e tecnológico. Dentre elas, pode-se citar o maior período de conservação em gelo observado nas espécies tropicais, e a menor proporção de *Pseudomonas* na microbiota natural. Sendo este gênero o principal responsável pela deterioração do pescado, a proporção de sua população inicial influenciará diretamente sobre sua conservação.

2.2 Aspectos microbiológicos de alimentos desidratados

Considerando-se que os alimentos desidratados são consumidos diretamente, após reidratação, ou então, utilizados como ingredientes no preparo de outros alimentos (condimentos, farinhas, chocolates, etc.), torna-se fundamental o conhecimento de seu nível de contaminação, particularmente em relação à presença de bactérias patogênicas ou de microorganismos responsáveis por processos de deterioração (LEITÃO et al, 1974 b).

Em geral, os alimentos desidratados adequadamente embalados, não estão sujeitos a deterioração. Contudo, o método pelo qual o alimento é manipulado após sua reidratação, é de grande importância com relação à saúde pública (NAKAMURA & KELLY, 1968). EIROA et al, (1975), citam que no processamento de alimentos, a contaminação de farinhas e amidos por esporos de bactérias termófilas, é de grande importância, uma vez que estes apresentam resistência térmica elevada e podem resistir ao tratamento térmico aplicado.

EIROA (1981), menciona que os alimentos desidratados, em razão da baixa atividade de água são bem estáveis, porém, se por qualquer motivo absorverem umidade de maneira a elevar sua atividade de água, eles poderão transformar-se em bons substratos para o desenvolvimento de microorganismos.

Segundo TROLLER (1979), as bactérias, geralmente, necessitam de uma atividade de água mais elevada para seu desenvolvimento do que as leveduras e os bolores. Estas, raramente provocam deterioração em níveis abaixo de 0,92 ou 0,90. *Micrococcus*, *Staphylococcus aureus* e algumas bactérias halofílicas, são os principais microorganismos detectados em atividade de água entre 0,87 e 0,85.

De um total de 128 amostras de macarrão examinadas por DELAZARI & LEITÃO (1976), 89 (correspondendo a 69,5%), apresentaram *S. aureus* em níveis variando de 10 a $>10^4$ ufc/g.

KIM & GOEPFERT (1971), analisando 170 amostras de alimentos desidratados, constataram a presença de *Bacillus cereus* em 25,3% das amostras em níveis de até 4×10^3 ufc/g. Das 6 amostras de farinha e amido analisadas por este autor, somente uma apresentou resultado positivo para este microorganismo com nível de contaminação de 1×10^2 ufc/g de alimento.

Segundo NAKAMURA & KELLY (1968), a incidência de *Clostridium perfringens* em misturas desidratadas para sopas, é muito baixa. De 28 amostras analisadas, somente uma apresentou resultado positivo.

LEITÃO (em DELAZARI, 1979), analisando 100 amostras de farinhas, sendo 30 de milho, 40 de mandioca e 30 de trigo, não isolou nenhum sorotipo de *Salmonella*.

De acordo com MOSSEL (1969), a contaminação e a proliferação de microorganismos nos alimentos podem ocorrer em quatro fases:

- a) Primária - Diz respeito à carga microbiana da matéria-prima;
- b) Secundária - Aumento na população microbiana durante o processamento;

- c) Terciária - Recontaminação do alimento após o processamento;
- d) Quaternária - Contaminação e/ou desenvolvimento de microorganismos durante o preparo de alimentos manufaturados.

Por isso, a qualidade da matéria prima repercute diretamente na qualidade do produto final.

A avaliação microbiológica dos alimentos tem sido realizada através de certos grupos ou espécies de microorganismos, cuja presença em número elevado nos alimentos pode ser indicativa da exposição do alimento a condições que possam ter permitido o acesso e multiplicação de espécies infecciosas ou causadoras de intoxicação.

2.3 Principais microorganismos causadores de deterioração e/ou toxinfecção que podem ser detectados em pescado e em produtos desidratados

Os patógenos implicados em doenças produzidas por alimentos de origem aquática, são classificados em quatro categorias de maior risco (AHMED, 1992):

- a) aqueles naturalmente presentes em ambientes marinhos ou de água doce;
- b) aqueles associados à poluição fecal do ambiente;
- c) aqueles associados a operações de processamento e preparo do alimento;
- d) aqueles de etiologia desconhecida.

Para determinar a presença destes grupos, gêneros ou espécies de microorganismos nos alimentos, devem ser realizadas análises microbiológicas específicas, sendo as principais, a Contagem Padrão em Placas (CPP); Contagem de Fungos e Leveduras; Coliformes totais,

fecais e *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus cereus*; *Clostridium perfringens* e *Salmonella*.

2.3.1. Contagem Total de Microorganismos Aeróbios Mesófilos (CPP)

O número de microorganismos aeróbios mesófilos encontrados em alimentos é um dos indicadores microbiológicos mais empregados no sentido de aquilatar a qualidade do produto (CUTTING & SPENCER, 1968).

Normalmente, existe uma boa relação entre CPP, a contagem de outros microorganismos como coliformes e estafilococos, e a qualidade do produto, revelada por testes químicos e organolépticos (BRANDÃO et al, 1984). Por isso, de acordo com FERREIRA & BERAQUET, (1981) e PEDROSA-MENABRITO & REGENSTEIN, (1990 a), a CPP fornece uma medida do grau de contaminação deste.

A determinação de microorganismos capazes de alterar e/ou deteriorar o produto, ou seja, aqueles que por sua atividade metabólica, degradam os componentes principais do alimento, produzindo gases, ácidos, liberando pigmentos, alterando cor, sabor, textura, qualidade nutritiva e conferindo odores, é de importância para determinar a vida útil do produto bem como, as condições ideais de conservação e transporte (GELLI, 1983).

Sendo a tilápia um peixe de clima tropical, sua microbiota deteriorante é de natureza mesófila (VANDERZANT, et al 1970; EIROA, 1980; LEITÃO et al, 1985 e BERI et al, 1989). Portanto, a CPP deve ser realizada a temperatura de 35°C. As contagens efetuadas nesta temperatura, referem-se principalmente, à qualidade inicial do produto. Entende-se

por microorganismos mesófilos, aqueles que crescem bem à temperaturas compreendidas entre 20 e 45°C, sendo que as temperaturas ótimas encontram-se na faixa de 30 a 40°C (FRAZIER, 1972 e JAY, 1978).

De acordo com LEITÃO, (1977), a CPP é particularmente valiosa no sentido de fornecer informações sobre:

- Conformidade das condições sanitárias do transporte, armazenamento e processamento; provável vida de prateleira do produto, descongelamento não controlado de congelados ou falhas na manutenção de temperaturas de refrigeração e prováveis fontes de contaminação durante o processamento.

Esta contagem é normalmente limitada à enumeração de microorganismos não patogênicos, e o seu padrão é destinado a avaliar populações compostas de bactérias, ou o número total de microorganismos capazes de crescer sob condições de aerobiose em temperaturas de incubação específicas (MARTIN et al, 1978 e JAY, 1978). É, sem dúvida, um dos métodos mais utilizados para determinar o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônia (ufc) em produtos alimentícios (FRAZIER, 1972 e JAY, 1978). Trata-se de um método simples que permite a obtenção de resultados em um período relativamente curto (24 - 48 hs).

Uma CPP muito elevada, pode indicar manipulação inadequada do alimento e, conseqüentemente, grande contaminação ou mesmo crescimento de microorganismos, inclusive daqueles de interesse em saúde pública (CORLETT Jr., 1974).

FAJARDO et al (em BRANDÃO et al, 1984), na Guatemala, examinando a pele de diversos tipos de peixe, com relação a CPP de bactérias mesófilas, incubada a 30°C durante 48 horas, obtiveram valores que variaram de $2,5 \times 10^4$ a $5,4 \times 10^7$ ufc/g de pele.

BRANDÃO et al (1984), citam que de acordo com os trabalhos por eles analisados, as contagens de bactérias mesófilas relativas ao peixe fresco no Brasil, têm variado de 10^4 a 10^7 ufc/g ou cm^2 . No entanto, no estudo por eles desenvolvido, os resultados variaram de $7,9 \times 10^3$ a $4,6 \times 10^6$ ufc/g.

BERI et al (1989), analisando a flora bacteriana de alguns peixes da costa de Maharashtra e Saurashtra, na Índia, encontraram valores para as amostras analisadas com relação à contagem padrão incubada a 30°C por 48 horas, oscilando entre 1×10^3 e 4×10^8 ufc/g.

LEÓN et al (1991), analisando a qualidade microbiológica da sardinha utilizada para a elaboração de um produto seco e salgado, no México, encontraram valores para a contagem de microorganismos aeróbios mesófilos no pescado cru, em torno de $1,5 \times 10^5$ ufc/g.

FALCÃO et al (1994), analisando amostras de Jaraqui (*Semaprochilodus insignis*, Schomburgk, 1841) procedentes do rio Manacapuru, observaram valores para contagem total de mesófilos, a 35°C, em torno de $9,5 \times 10^3$ ufc/ cm^2 .

2.3.2. Contagem de Fungos e Leveduras

A ampla distribuição de fungos e leveduras na natureza, sugere que estes microorganismos possam ser encontrados em todos os produtos frescos (JAY, 1978), sobre equipamentos inadequadamente higienizados e como contaminantes do ar (SILVA, 1987).

Segundo DELAZARI (1979), a presença destes microorganismos em número elevado no alimento, pode fornecer indicações, tais como:

- a) Em produtos desidratados, a presença de esporos de fungos e células de leveduras em grande quantidade, indica que durante o processamento ou o armazenamento, o teor de umidade aumentou possibilitando o seu desenvolvimento.
- b) Em produtos que sofreram tratamento térmico moderado ou nulo, mas que baseiam sua preservação em baixa atividade de água ou pH ácido, estes microorganismos podem ser responsáveis por sua deterioração.

A atividade de água determina o menor teor de água disponível que permite o crescimento microbiano. Os microorganismos apresentam um comportamento bastante diverso em relação à atividade de água favorável ao seu desenvolvimento. De modo geral, as bactérias são mais exigentes do que os fungos e as leveduras, só se desenvolvendo em meios com atividade de água elevada (EIROA, 1981).

A maioria das leveduras não se desenvolve abaixo de atividade de água de 0,88; já o crescimento da maioria dos fungos cessa quando esta é inferior a 0,80 (FRAZIER, 1972 e JAY, 1978).

MORAIS et al (1981), ao utilizar sobras da filetagem de pescado para obter farinha mista de peixe e milho, observaram uma acentuada redução na contagem de fungos e leveduras no produto, que passou de 10^5 ufc/g antes da secagem, para 10^2 ufc/g após a mesma.

LEÓN et al (1985), ao utilizar espécies marinhas de baixo valor comercial para elaborar hidrolizados, obseou uma contagem em torno de 10^5 ufc/g tanto para a mojarra (*Archosargus unimaculatus*), quanto para a sardinha (*Sardinops caerula*).

LEITÃO et al (1974 b), analisando a microbiologia de alimentos desidratados, encontrou em sopas ricas em proteínas, para alimentação infantil, valores médios de $3,3 \times 10^3$ ufc/g para contagem de fungos e leveduras.

EIROA et al (1975), analisando farinhas e amidos encontraram níveis médios de contaminação por fungos e leveduras, em farinha de milho e farinha de trigo da ordem de 4×10^3 /g e 7×10^2 ufc/g respectivamente.

2.3.3. Coliformes totais, Coliformes fecais e *Escherichia coli*

Os coliformes são representantes da família *Enterobacteriaceae*, na forma de bastonetes curtos não esporulados, Gram-negativos, facultativos, e capazes de fermentar a lactose, com produção de gás e ácidos dentro de 24 a 48 horas de incubação a 35°C , podendo ser móveis ou imóveis (APHA, 1976). Encontram-se incluídos neste grupo, os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* spp. (LEITÃO et al, 1972 a).

Também pertencem à esta família, os gêneros *Serratia*, *Proteus*, *Edwardsiella* e outros gêneros que existem comumente no trato intestinal (FRAZIER, 1972 e JAY, 1978).

Estes microorganismos são os mais freqüentemente utilizados, como indicadores de condições higiênico sanitárias, com base, principalmente, na facilidade de seu isolamento e identificação, predominância em números relativos e tempo de sobrevivência adequado (LEITÃO et al, 1972 a).

É fato comprovado, que o grupo coliforme não apresenta características uniformes em relação à especificidade de habitat, nem ao tempo de sobrevivência em outros ambientes que não o trato intestinal. Nestas condições, estes microorganismos são diferenciados em não fecais e fecais (LEITÃO et al, 1972 b). Microorganismos como *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, são encontrados em diversos ambientes, como solo, folhas e flores, não indicando sua presença uma necessária contaminação fecal (LEITÃO et al, 1972 a,b).

E. coli é o melhor indicador de contaminação fecal em alimentos, uma vez que esta têm seu habitat restrito ao trato intestinal do homem e animais, onde, de acordo com JAY (1978), sua presença no alimento indica uma contaminação de origem fecal. Embora não seja usualmente patogênica, possui um habitat semelhante ao de outras bactérias patogênicas como *Salmonella* e *Shigella*, daí, a presença de *E. coli* no alimento, sugerir a possível presença destes patógenos.(LEITÃO, 1977).

Além disso, os coliformes fecais são distinguidos prontamente dos coliformes não fecais pelo crescimento a elevadas temperaturas de incubação (44,5 a 45,5°C). Cultivos a

esta temperatura contém em geral, elevado percentual de *E. coli*. dos tipos I e II (TATCHER & CLARCK, 1973).

A ocorrência de coliformes em alimentos é considerada como uma importante indicação da presença de agentes infecciosos com risco à saúde pública (CHORDASH & INSALATA, 1978 e FIRSTENBERG-EDEN & KLEIN, 1983). Por isso, a presença destes, é amplamente empregada como um índice de cautela na produção e processamento e, particularmente, como um índice de proteção contra contaminação com organismos de origem intestinal (MOURA FÉ & NELSON, 1972).

A detecção, em laboratório, de microorganismos desses grupos constitui somente uma indicação da situação existente em algum ponto do processo, armazenamento ou manipulação do alimento.

Estas informações somente podem ser usadas para apontar a fonte e a causa da anormalidade quando se conhece o histórico adequado do produto. A recontaminação de alimentos processados através do manuseio ou a manutenção de gêneros alimentícios em temperaturas impróprias são exemplos de condições que devem ser encontradas e corrigidas. A presença desses microorganismos não é, necessariamente, indicativa de risco potencial à saúde do consumidor, porém, serve de alerta para um possível tratamento térmico inadequado, além de indicar falta de boas práticas sanitárias, constituindo um aviso de que as condições que provocaram a contaminação poderiam facilmente conduzir à deterioração e perda de qualidade, tornando-se um perigo para a saúde humana (SHARF, 1972; GELLI, 1973; CORLETT Jr., 1974; MARTIN et al, 1978 e SALES et al, 1988 b).

Em alimentos frescos, nos quais a microbiota natural inclui microorganismos da família *Enterobacteriaceae*, a simples presença destes não é razão para a sua rejeição MOSSEL (1969).

LEITÃO et al (1985), analisando a microbiota bacteriana de espécies de peixes fluviais e lacustres no estado de São Paulo observou que ao contrário do que é relatado para o pescado de origem marinha capturado em águas não poluídas, a presença de bactérias coliformes parece ser comum no pescado fluvial e lacustre. Os resultados obtidos por ele, embora com certa variabilidade, alcançaram freqüentemente valores na faixa de 10^2 a 10^4 cels./g. Por outro lado, a presença de coliformes fecais, mesmo em números inferiores, foi igualmente constante.

Dentre os fatores que poderiam ser aventados para explicar tais constatações, este autor destaca a contaminação de rios e lagos por esgotos urbanos e resíduos fecais provenientes de pastagens, ao lado do arraste elevado de solo, pelas águas, por ocasião das chuvas, todos contribuindo para o sensível aumento da carga de enterobactérias nos rios, lagos e açudes.

LEITÃO et al (1972 a), em estudos realizados sobre a presença de coliformes totais e fecais no solo, água e vegetais, relataram que os resultados obtidos evidenciam ampla distribuição das bactérias coliformes no meio ambiente, mesmo em condições nas quais a possibilidade de contaminação fecal é remota. Nesta situação, a microbiota predominante é do tipo não fecal, como é o caso de *Enterobacter-Klebsiella* e tipos intermediários em águas límpidas e de *Citrobacter* sp. no solo.

GELDREICH & BORDNER (1971), em seus estudos, demonstraram existir uma correlação estreita entre a presença de coliformes fecais e *Salmonella* tendo por isso, sugerido limites para coliformes fecais em águas utilizadas em irrigação.

2.3.4. *Staphylococcus aureus*

As condições de higiene e saneamento que prevalecem no processamento, manipulação, estocagem e distribuição, aliados ao clima tropical, e a termoestabilidade da enterotoxina produzida pelo *Staphylococcus aureus*, fazem dele um patógeno de grande preocupação (VARADARAJ, 1993).

Estes microorganismos pertencem à família *Micrococcaceae*. São cocos Gram-positivos podendo apresentar-se isoladamente, aos pares, em tétrades ou agrupados em cachos (MINOR & MARTH, 1971). São anaeróbios facultativos, imóveis e não esporulados. Produzem pigmentação amarelo dourado na presença de 7,5% de NaCl e ácido a partir de glicose e manitol em condições de aerobiose e anaerobiose (MINOR & MARTH, 1971; FRAZIER, 1972; JAY, 1978 e VARADARAJ, 1993). No caso do meio conter telurito, as colônias características se apresentarão com coloração negra devido a redução deste ao elemento telúrio (VARADARAJ, 1993).

Staphylococcus, provavelmente representa o grupo de bactérias patogênicas causadoras de toxinfecção alimentar mais tolerante ao sal, crescendo em soluções de cloreto de sódio próximas ao estado de saturação (TROLLER, 1973). Toleram os nitritos

relativamente bem, podendo crescer, por isto, em carnes curadas se as outras condições do meio ambiente lhes forem favoráveis (FRAZIER, 1972 e JAY, 1978).

Todas as cepas de *S. aureus* coagulase positiva são potencialmente patogênicas (ANGELOTTI, 1970).

São comumente encontrados nas narinas de animais, úbere de vacas, leite cru, lesões cutâneas infectadas, pele e cabelo (BRYAN, 1974).

São microorganismos mesófilos, possuindo temperatura ótima para crescimento em torno de 37°C. Apesar disso, podem desenvolver-se em temperaturas entre 10 e 45°C (FRAZIER, 1972). Este autor menciona ainda, que a temperatura de manutenção dos alimentos é sumamente importante no controle das intoxicações estafilocócicas, visto que, a produção da toxina só ocorre em ritmo considerável, na faixa de temperatura compreendida entre 15,6 e 46,1°C, principalmente na faixa de 21,1 a 36,1°C.

Atualmente, acredita-se que o maior reservatório deste microorganismo, seja o homem, sendo a mucosa nasal, o principal local de multiplicação (MINOR & MARTH, 1972 e TATCHER & CLARCK, 1973). A partir desta fonte, estes microorganismos encontram seu caminho para a pele e em direção a feridas de forma direta ou indireta. Enquanto a taxa de carreamento nasal varia, de 30 a 50% para adultos e um pouco mais elevada entre crianças, as fontes mais comuns destes microorganismos, que são os braços, mãos e face, possuem uma taxa de carreamento circulando em torno de 5 a 30% (ANGELOTTI, 1970 e JAY, 1978). Além da pele e cavidades nasais, podem ser encontrados ainda, nos olhos, garganta e trato intestinal (LEITÃO 1977 e JAY, 1978).

Destas fontes , estes microorganismos encontram seu caminho através do ar e poeira até às roupas e outros locais a partir dos quais, eles podem contaminar os alimentos (JAY, 1978).

Os alimentos envolvidos na intoxicação estafilocócica, são produtos contendo elevado teor de proteínas, que foram eventualmente contaminados pelos operadores durante o manuseio e preparo (EIROA, 1980), e que, mesmo sob condições um pouco desfavoráveis conseguiram se multiplicar (MORITA & WOODBURN , 1983).

Pelo fato dos estafilococos estarem intimamente associados ao homem e devido a sua intervenção no preparo dos alimentos, o controle da intoxicação depende da prevenção da multiplicação destes organismos e da produção de toxina no alimento (EIROA, 1980).

Este microorganismo elabora uma série de proteínas solúveis em água, bastante termorresistentes, as quais produzem reações enterotoxigênicas típicas em seres humanos e certos animais. Devido a elevada termoestabilidade destas, que resistem a temperatura de ebulição por até 30 minutos (FUZIHARA & FRANCO, 1993), podem ser carreadas da matéria prima para o produto final termicamente processado (ANAND & SINGH, 1988).

Pelo menos seis enterotoxinas antígenicamente distintas são produzidas por estes microorganismos, sendo denominadas alfabeticamente como A, B, C, D, E e F (NOTERMANS & HEUVELMAN, 1983). A enterotoxina A, segundo SCHEUSNER, et al (1973), é a mais freqüentemente envolvida em surtos de intoxicação, sendo a B, raramente associada a estes.

S. aureus pode crescer e produzir enterotoxina em um número variado de substratos e sob variadas condições ambientais de atividade de água, pH e temperatura (TATINI et al, 1973).

A atividade de água tem sido amplamente recomendada como parâmetro para controlar o crescimento microbiano em alimentos com umidade intermediária. Entre as doenças produzidas por alimentos, o *S. aureus*, é a única bactéria que possui habilidade de sobreviver, crescer e produzir enterotoxina em um ambiente com baixa atividade de água.

A atividade de água mínima para o crescimento destes microorganismos, entretanto, depende também de outros fatores tais como pH, temperatura e oxigênio presente (MAGRINI et al, 1983).

Tem sido relatado que a a_w mínima para o crescimento de *S. aureus* é de aproximadamente 0,86 (CHIRIFE et al, 1982 e LEITÃO et al, 1983).

Embora o pH ideal para o crescimento de *S. aureus* enterotoxigênico seja próximo de 7,0, o crescimento poderá ocorrer em limites de pH extremos dependendo de outros fatores tais como tipo de alimento, tipo de ácido utilizado para atingir o pH desejado, concentração de ingredientes como açúcar e condimentos e também, da capacidade tamponante de alguns ingredientes como por exemplo os ovos, (MORITA & WOODBURN, 1983).

TATINI (1973), resume as condições para crescimento e produção de toxina estafilocócica dentro dos seguintes intervalos mostrados no Quadro.2.

Quadro. 2 - Condições para crescimento e produção de toxina estafilocócica.

Fator	Crescimento		Produção de Toxina	
	Ótimo	Intervalo	Ótimo	Intervalo
A_w	> 0,999	0,83 - > 0,99	>0,99	0,86 - > 0,99
pH	6 - 7	4 - 10	6 - 7	4,0 - 9,8
Temperatura (°C)	37	7 - 47,8	40 - 45	10 - 46
NaCl (%)	0	0 - 20	0	0 - 10
Disponibilidade de Oxigênio	Aeróbico	Aeróbico - anaeróbico	Aeróbico	Aeróbico - anaeróbico

fonte: TATINI, 1973

2.3.5. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um microorganismo aeróbio, Gram-positivo, proteolítico e esporulado (FRAZIER, 1972). Possui a forma de bastonete, podendo apresentar-se isoladamente, aos pares e freqüentemente em cadeias enoveladas (SANDERS et al, 1976), sendo normalmente encontrado no solo, poeira água e vegetais, daí alcançando os alimentos (DELAZARI et al, 1978 e DELAZARI, 1979).

É capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura que vai desde 10 - 12°C até 48 - 50°C. E também, em ampla faixa de pH que vai desde 4,9 até 9,3 (GOEPFERT et al, 1972). Seus esporos possuem uma resistência ao calor típica de microorganismos mesófilos, sobrevivem ao tratamento térmico a 64°C durante 30 minutos, não sendo afetados pelo

congelamento e reaquecimento dos alimentos (FRANKLIN, 1970; em Mc KNIGHT et al, 1990). Germinam rapidamente nos alimentos se estes forem mantidos na faixa de temperatura entre 30 - 40°C (JAY, 1978). Sobrevivem a pasteurização e a tratamentos térmicos mais drásticos, ocorrendo proteólise ácida (FRAZIER, 1972).

Sem dúvida, *B. cereus* é o microorganismo mais freqüentemente encontrado em alimentos desidratados (DELAZARI, 1979). Porém, o processo patológico acarretado por ele, somente é evidenciado quando a bactéria tem oportunidade de se multiplicar no alimento, atingindo níveis variáveis entre 10^6 a 10^7 ufc/g de alimento (GOEPFERT et al, 1972).

A toxina produzida pelo *B. cereus*, é mais estável dentro da faixa de pH de 5 - 10. É sintetizada durante a fase de crescimento exponencial, e sua produção é favorecida em pH em torno de 8 e temperatura de 32°C aproximadamente (JAY, 1978).

LEITÃO et al (1974 a), estudando a microbiologia de 12 tipos de alimentos desidratados produzidos comercialmente no Brasil, verificaram que, *B. cereus* foi apontado como o único enteropatógeno de ocorrência em todos os tipos de alimentos desidratados, em níveis que variavam de 5,2% (mistura achocolatada) a 54,8% (canela), com incidência média de 26,9%, porém, sempre com populações inferiores a 10^3 ufc/g.

DELAZARI et al (1978), analisando o nível de contaminação por *B. cereus*, em alimentos desidratados, verificou que 90% da farinha de milho analisada, apresentava contaminações variando de 10^2 a 10^5 ufc/ g do produto.

2.3.6. *Clostridium perfringens*

Trata-se de uma bactéria em forma de bastonete, Gram-positiva, anaeróbia, esporulada, ocorrendo isolada, aos pares e com menor frequência, em pequenas cadeias. (SANDERS et al, 1976 e DELAZARI, 1979).

Apresenta ainda como características que auxiliam na sua identificação, produção de H_2S e lecitinase, fermentação da lactose, redução do nitrato a nitrito, liquefação da gelatina e ausência de mobilidade (HALL et al, 1969).

As linhagens de *Cl. perfringens* são divididas em cinco tipos toxicológicos, de A a E, com base nos quatro principais tipos de toxinas que podem ser produzidos. As cepas produtoras de intoxicação alimentar, pertencem principalmente ao tipo A, tal como as cepas da gangrena gasosa (BRYAN, 1969).

Está amplamente difundido na natureza, sendo encontrado no solo, água, alimentos, poeira, condimentos e no trato intestinal do homem e outros animais (FRAZIER, 1972; NICKELSON & FINNE, 1976 e JAY, 1978).

Devido a sua ampla distribuição, é responsável pela contaminação de vários tipos de alimentos consumidos pelo homem (NAKAMURA & KELLY, 1968). Sendo também, freqüentemente encontrado em carnes e produtos a base de carne (BARBE et al, 1967 e NAKAMURA & KELLY, 1968), os quais podem ser contaminados diretamente através de animais abatidos ou por contaminação subsequente através de containers, manipuladores ou poeira (JAY, 1978).

Por se tratar de um microorganismo esporulado, pode suportar as condições adversas do meio ambiente tais como desidratação, aquecimento a 100°C por várias horas e certos compostos tóxicos.

É uma bactéria mesófila, estando a temperatura ótima para seu desenvolvimento na faixa de 37 - 45°C, embora de acordo com NAKAMURA & KELLY, (1968), seja capaz de se desenvolver em temperatura acima de 55°C. Com relação ao efeito do pH no crescimento, *Cl. perfringens* se desenvolve bem numa faixa de pH de 5,5 a 8,0 (JAY, 1978).

Segundo TROLLER, (1973), atividade de água na faixa de 0,97 a 0,95, obtida pela adição de NaCl, KCl, sacarose ou glicose, previne o crescimento de *Cl. Perfringens*. Se o glicerol é usado para ajustar a atividade de água do meio, o limite para o crescimento deste microorganismo, pode ficar na faixa de 0,93 a 0,95.

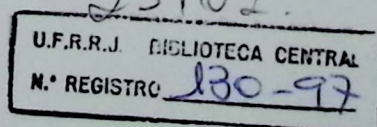
De acordo com VARADARAJ, (1993), a gastroenterite provocada por esta bactéria ocorreria após a ingestão de aproximadamente 10⁸ células vegetativas.

Os sintomas costumam aparecer entre 8 e 22 horas após a ingestão do alimento contaminado, mais freqüentemente entre 10 e 12 horas. Caracterizando-se por dores abdominais agudas e diarreia (SANDERS et al, 1976 e EIROA, 1989).

De acordo com EIROA, (1980), o pescado e seus produtos, raramente têm sido responsáveis por surtos de envenenamento por *Cl. perfringens*.

Também os condimentos, são importantes fontes de contaminação de alimentos, nos quais entram como ingredientes.

LEITÃO et al (1974 b), em estudos sobre a microbiologia de alimentos desidratados, observou a presença de *Cl. perfringens* em condimentos como canela e pimenta, com



valores percentuais médios de contaminação de 42,8%, porém, com populações médias relativamente baixas, 22 e 15 ufc/g para pimenta e canela respectivamente.

EIROA et al, (1975), analisando farinhas, amidos e féculas, verificaram que 66% das amostras de milho e 30% das de farinha de soja, estavam contaminadas com esta bactéria.

2.3.7. *Salmonella*

São bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, na forma de bastonetes curtos, Gram-negativos, geralmente móveis, com flagelos peritríqueos, não esporogênicas, aeróbias facultativas e com atividade fermentativa sobre a glicose. Crescem na faixa de temperatura de 5,5 a 45°C, com desenvolvimento ótimo em torno de 35 a 37°C. Apresentam como pH ideal aquele próximo a neutralidade (6,6 - 8,2), não havendo crescimento em pH maior que 9,0 e menor que 4,0. Seu crescimento é inibido em atividade de água abaixo de 0,94 em pH neutro e não são capazes de tolerar elevadas concentrações de sal. São destruídas pelos métodos tradicionais de pasteurização e a sua resistência térmica é variável de acordo com a espécie e substrato onde se encontram (FRAZIER, 1972; JAY, 1978 e DELAZARI, 1979).

Possuem como habitat o trato intestinal do homem e dos animais (BRYAN, 1974) tanto de sangue quente quanto frio, por isso, sua presença em alimentos indica provável contaminação fecal (FRAZIER, 1972; LEITÃO, 1977 e SILLIKER, 1986).

A salmonelose é uma zoonose típica, sendo os alimentos de origem animal e aqueles manipulados pelo homem (MATCHES & LISTON, 1972), os principais veículos de

salmonelas que infectam este (FUZIHARA & FRANCO, 1993). Segundo KVENERG & ARCHER, (1987), dados de diversos países industrializados sugerem que esta bactéria é a causa mais importante de doenças provocados por alimentos.

Este microorganismo normalmente não é encontrado em peixes marinhos capturados em mar aberto (MATCHES & LISTON, 1968; NICKELSON & FINNE, 1976 e EIROA, 1980).

O fato do pescado geralmente ser consumido após cocção diminui mas não elimina riscos eventuais, uma vez que persiste a possibilidade da ocorrência de contaminações cruzadas, seja através do manuseio por indivíduos infectados, seja pelo contato dos alimentos preparados com superfícies ou equipamentos contaminados pelas matérias primas (LEITÃO et al, 1985 e LEITÃO, 1977).

A ocorrência de *Salmonella* em produtos cárneos constitui um sério problema de saúde pública, uma vez que esta é causadora de toxinfecção alimentar. Alimentos como lingüiça frescal, salsicha a granel, quibe cru e fígado bovino, que nos locais de comercialização são muito manuseados, estão sujeitos a maior risco de contaminações pelas condições de manipulação (REIS et al, 1995).

A presença deste microorganismo no alimento, é razão suficiente para que este seja rejeitado (LEITÃO, 1977). Porém, é comum encontrar *Salmonella* em alimentos em níveis tão baixos quanto 1 célula em 25 gramas de amostra, e a detecção deste número tão pequeno, se torna ainda mais difícil pelo estado debilitado em que se encontram as células que sobrevivem ao processamento (ANDREWS, 1985).

As salmonelas inespecíficas em relação ao hospedeiro, são responsáveis pela infecção gastroentérica denominada salmonelose e as doses necessárias para que a doença ocorra variam entre 10^3 e 10^6 células/g de alimento (LEITÃO, 1977).

Diarréia tem sido o sintoma comum na maioria dos surtos de salmonelose (SINGH & KULSHRESTHA, 1993), sendo, outros sintomas como náuseas, vômitos e dores abdominais, precedidos ou não de cefaléia e calafrios, também observados. Esta síndrome normalmente é acompanhada por prostração, debilidade muscular, abatimento, febre moderada, inquietude, contrações nervosas e sonolência (FRAZIER, 1972; SANDERS et al, 1976; JAY, 1978 e EIROA, 1989).

O período de incubação varia de 12 a 72 horas, sendo em média, de 18 a 36 horas (EIROA, 1989), em geral, os sintomas persistem por 2 dias, ocorrendo uma recuperação sem complicações, porém, às vezes os transtornos duram semanas ou até meses. Uma pequena percentagem de indivíduos se convertem em portadores (FRAZIER, 1972).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Matérias Primas

O pescado destinado a produção da farinha, foi capturado na UFRRJ (setor de Aquicultura e lago do Jardim Botânico), sempre às sextas-feiras, sendo logo transportado para o Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da própria instituição, em caixas de material isotérmico (isopor) contendo gelo na proporção de 1:1 (1Kg de gelo para 1Kg de peixe). Ao chegar foi eviscerado.

Após a evisceração foi coletada, em frasco previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, a amostra a ser analisada. Feito isso, todo o pescado (amostra e matéria prima para a elaboração do produto) foi estocado em freezer. Passados dois dias, as amostras foram transferidas para uma geladeira descongelando lentamente até o dia seguinte, quando foram submetidas às análises microbiológicas por ocasião da elaboração do produto.

O fubá e a farinha de trigo, componentes do veículo amiláceo, foram adquiridos no comércio local em pacotes de 1 Kg.

3.2 Processo de Elaboração do Produto

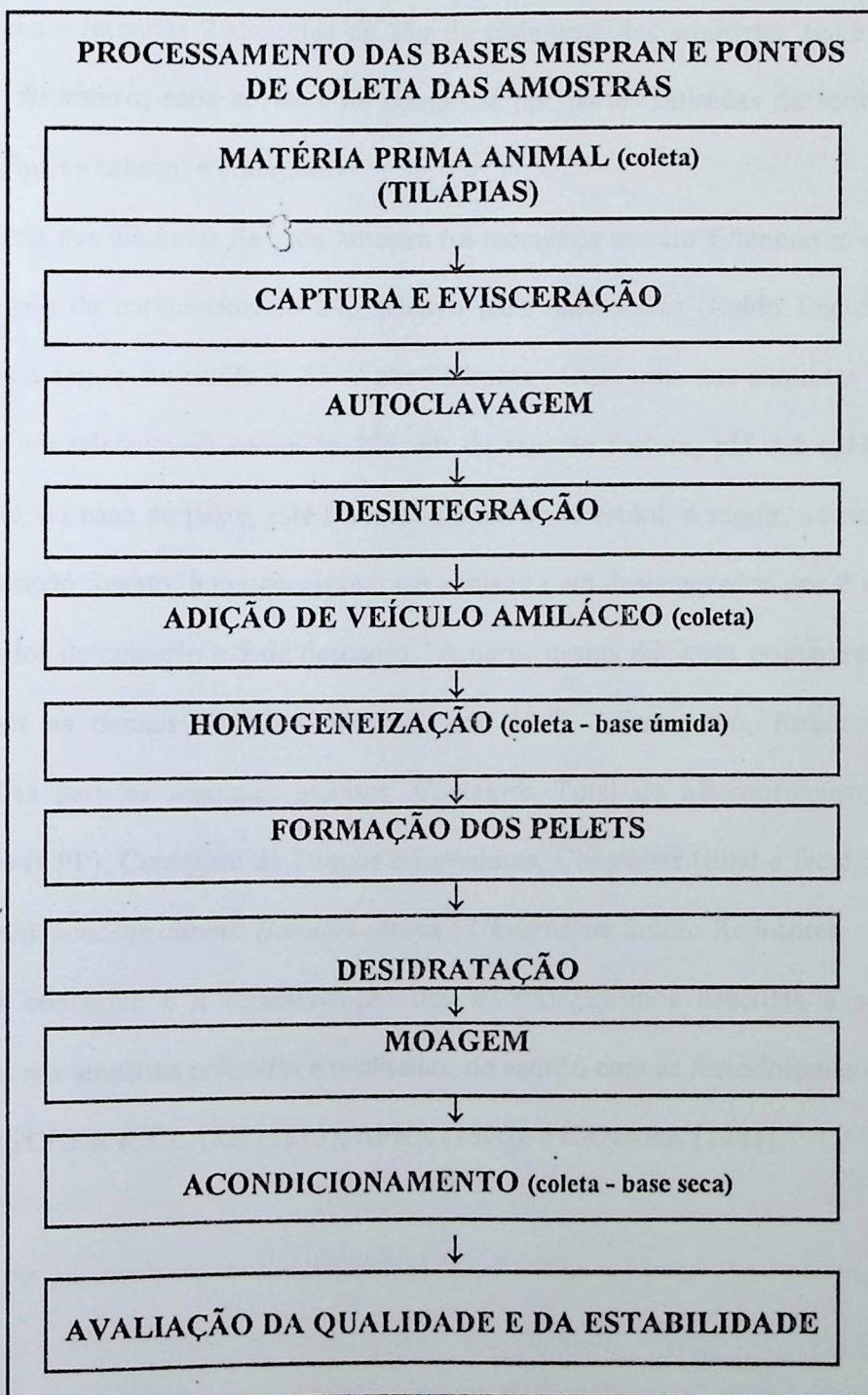
Três dias após a captura, o produto foi elaborado segundo o Fluxograma.1, onde também são mostrados os pontos de coleta de amostras para a elaboração das análises microbiológicas. Primeiramente, o pescado ainda congelado, foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos, sendo em seguida triturado em liquidificador industrial e incorporado ao veículo amiláceo (fubá e farinha de trigo).

O veículo amiláceo, na proporção de 90:10 (fubá e trigo respectivamente) foi incorporado à massa de pescado cozida, na proporção de 40% do total da base úmida. Após a incorporação, procedeu-se a homogeneização do produto em batedeira. A massa resultante foi então, transformada em pelets e desidratada em estufa com circulação de ar a 80°C por aproximadamente 4 horas, para obtenção de um produto seco com 5 a 6% de umidade.

As amostras de "base úmida" (peixe + veículo amiláceo antes da secagem) e de "base seca" (peixe + veículo amiláceo após secagem) foram coletadas após cada etapa de elaboração do produto.

As análises microbiológicas, foram realizadas nas matérias primas, na base úmida e na base seca, sendo esta última, utilizada para avaliar a estabilidade do produto final com análises feitas no dia da fabricação (tempo zero) e aos 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias. Os produtos obtidos (bases secas) foram mantidos à temperatura ambiente, em frascos de vidro com tampa de rosca previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O estudo da estabilidade microbiológica da “base seca”, foi realizado sempre em duas amostras e as análises feitas em duplicata.



Fluxograma. 1

3.3 Preparo das Amostras para Análise

Foram retiradas 2 alíquotas de 25g de cada uma das amostras, sendo que, para o pescado *in natura*, cada amostra foi composta por partes retiradas de todo o corpo do peixe (inclusive cabeça e brânquias).

Uma das alíquotas de cada amostra foi inoculada em um Erlenmeyer contendo 225 mL de meio de enriquecimento não seletivo para *Salmonella* (Caldo Lactosado), sendo incubadas a seguir em estufa a 35°C por 24 horas. Cada uma das alíquotas restantes, foi colocada em erlenmeyers contendo 225 mL de tampão fosfato, pH 7,2 (SHARF, 1972), sendo que, no caso do peixe, este foi levado a um copo estéril, a seguir, adicionado de 225 mL de tampão fosfato, homogeneizando-se a mistura em desintegrador por 2 minutos, com 10 segundos de agitação e 5 de descanso. A partir destas diluições primárias (10^{-1}) foram preparadas as demais diluições decimais (até 10^{-6}). Feito isso, foram efetuadas as inoculações para as seguintes análises: Contagem Total de Microorganismos Aeróbios Mesófilos (CPP); Contagem de Fungos e Leveduras; Colimetria (total e fecal); *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus cereus* e *Clostridium* Sulfito Redutores.

A contagem e a caracterização dos microorganismos descritas a seguir, foram realizadas nas amostras coletadas e analisadas, de acordo com as metodologias estabelecidas por THATCHER & CLARK (1973), APHA (1976), e LANARA (1981).

3.4 Contagem Total de Microorganismos Aeróbios Mesófilos (CPP)

A CPP foi realizada utilizando-se Agar Contagem Padrão. A dissolução do meio foi feita sob aquecimento até a ebulição com agitação constante. A esterilização, foi feita a 121°C por 15 minutos. A inoculação foi efetuada em profundidade, seguida de incubação a 35°C por 48 horas, após o que foram feitas as contagens das placas que continham entre 30 e 300 colônias.

3.5 Contagem de Fungos e Leveduras

Na determinação de fungos e leveduras utilizou-se o Agar Batata Dextrose (ABD). Sua dissolução e esterilização foi realizada seguindo-se o mesmo esquema utilizado para elaboração do agar para CPP. O pH do meio foi ajustado a 3,5 no momento da utilização, pela adição de solução aquosa estéril de ácido tartárico a 10%. A inoculação foi feita em profundidade e a incubação a 21°C por 3 a 5 dias (LANARA, 1980).

3.6 Determinação de Coliformes Totais e Fecais

Para a pesquisa de coliformes totais e fecais, utilizou-se o método do número mais provável (NMP), compreendendo as seguintes etapas:

teste presuntivo: o meio utilizado foi o caldo Lauril Sulfato Triptose (CLST), sendo distribuídos cerca de 10 mL por tubo, contendo um tubo de Durham invertido.

A esterilização foi efetuada a 121°C por 15 minutos sendo empregados três tubos por diluição. A incubação a 35°C por 24 – 48 horas foi iniciada imediatamente após a inoculação. Os tubos que apresentaram produção de gás dentro das 48 horas foram considerados positivos e repicados para o teste confirmativo e de coliformes fecais;

teste confirmativo: para a evidenciação de coliformes totais utilizou-se o meio caldo Verde Brilhante-Lactose-Bile 2% (CVBLB), tendo sido distribuídos 10 mL por tubo contendo um tubo de Durham invertido, sendo a esterilização efetuada a 121°C por 15 minutos. Para a evidenciação de coliformes fecais, utilizou-se o meio caldo *Escherichia coli* ("E.C. Medium"), o qual foi preparado e esterilizado da mesma forma que o CVBLB; de cada tubo positivo de CLST transferiu-se uma "alçada" para um tubo contendo CVBLB e para outro contendo E.C. Medium. Os primeiros foram incubados a 35°C por 24 a 48 horas, e os últimos a 44,5°C por 24 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás e os NMP de coliformes totais e fecais determinados em tabelas de três tubos, sendo posteriormente transformados em NMP por grama (THATCHER & CLARK, 1973 e APHA, 1976);

Escherichia coli (*E. coli*): para a determinação de *E. coli* utilizou-se também o método do NMP, efetuando-se a pesquisa desse microorganismo nos tubos positivos do meio E.C., da contagem de coliformes fecais. Para tanto, tomou-se uma "alçada" de inóculo de cada tubo positivo a qual foi semeada por esgotamento, em placas de Petri contendo meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB Agar) segundo Levine, sendo então, incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. Após este período, verificou-se a presença de colônias características para *E. coli*.

3.7 *Staphylococcus aureus*

Para contagem de *Staphylococcus aureus* utilizou-se o meio Baird Parker (base), esterilizado a 121°C por 15 minutos. Para o preparo do meio completo, foram adicionados a cada 100 mL do meio base, fundido e resfriado a 45 – 50°C, 5 mL de emulsão de ovo (50% de gema de ovo e 50% de solução salina estéril) e 0,3 mL de solução aquosa de telurito de potássio a 3,5% (aspticamente). A emulsão de ovo foi pasteurizada a 63 – 65°C por 15 – 20 minutos e a solução de Telurito de Potássio, em filtro de Seitz. Logo após a homogeneização, foram distribuídos cerca de 20 mL do meio por placa (APHA, 1976).

A inoculação foi feita na superfície, pipetando-se 0,1 mL de cada diluição utilizada para uma placa correspondente (sempre em duplicata), espalhando-se a seguir com uma alça de Drigalsk. A incubação foi feita a 37°C por 24 – 48 horas.

Foram enumeradas separadamente as colônias suspeitas (redutoras de telurito e produtoras de lipase e lecitinase), que apareceram após 24 e 48 horas de incubação. Colônias de ambas as contagens foram identificadas e transferidas para tubos contendo um meio de infusão de cérebro e coração (BHI), sendo tomadas 5 colônias quando a contagem foi inferior a 25, ou a raiz quadrada do número total de colônias, quando este era superior a 25. A incubação foi feita a 37°C por 18 – 24 horas, após o que foi efetuada a prova de coagulase:

prova da coagulase: utilizou-se plasma liofilizado de coelho. Transferiu-se alíquotas de 0,2 mL da solução preparada para tubos tipo hemólise (estéril), tomando-se a

seguir, uma "alçada" dos cultivos de 18 – 24 horas em BHI e inoculando nas soluções, incubando a seguir, a 37°C por 4 horas. Após este período, os tubos foram examinados para verificação da produção de coágulo; sendo anotados como positivos, todos os tubos que apresentaram tipos de coágulo entre os valores de 2 a 4+ (THATCHER & CLARK 1972); os tubos negativos foram reincubados até serem completadas as 24 horas, quando se procedeu à última leitura.

3.8 *Bacillus cereus*

A pesquisa de *Bacillus cereus* foi realizada utilizando-se o meio Agar seletivo para *cerus*, segundo MOSSEL (base), esterilizado a 121°C por 15 minutos. Para o preparo completo do meio, foram adicionados a cada 100 mL do meio base, fundido e resfriado a aproximadamente 45°C, 10 mL de emulsão de ovo a 50% (a mesma utilizada no meio Baird Parker).

A inoculação foi feita na superfície do meio, pipetando-se 0,1 mL de cada diluição utilizada para uma placa correspondente (sempre em duplicata), espalhando-se a seguir comalça de Drigalsk, após o que, as placas foram incubadas a 30°C e as leituras realizadas em 24 e 48 horas.

3.9 *Clostridium* Sulfito Redutores

Para a enumeração de *Clostridium* sulfito redutores utilizou-se o meio de Agar Triptona Sulfito Neomicina (TSN – agar), que após o preparo, foi distribuído em tubos duplos (15 mL/tubo) e esterilizado a 121°C por 15 minutos.

A inoculação foi feita por incorporação, sendo inoculado 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} , em duplicata. Os tubos, após inoculação, foram cobertos com Vaspar (50% de vaselina e 50% de parafina esterilizada) para criar um ambiente isento de oxigênio e incubados a seguir, a 44,5°C por 24 – 48 horas. Foram feitas observações com 24 horas e as colônias negras foram marcadas, voltando-se os tubos para a estufa até serem completadas as 48 horas, quando foi feita nova contagem.

3.10 Evidenciação de *Salmonella*

Para a pesquisa de *Salmonella* seguiu-se as seguintes etapas: enriquecimento em caldo não seletivo, enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento em meios seletivos, provas de triagem das colônias suspeitas.

enriquecimento não seletivo: as amostras inoculadas em Caldo Lactosado, segundo descrição feita no preparo das amostras, foram incubadas a 35°C durante 24 horas.

enriquecimento seletivo: após o período de incubação em meio não seletivo, retiraram-se duas alíquotas de 1 mL de cada amostra, passando-se uma delas para 10 mL de

caldo Tetrationato Verde Brilhante e a outra, para caldo Selenito Cistina incubando-se a seguir a 35°C durante 24 horas.

plaqueamento em meio seletivo: de cada caldo de enriquecimento foram feitas sementeiras, por esgotamento, em dois meios seletivos distintos: Agar Verde Brilhante (AVB) e Agar *Salmonella - Shigella* (ASS). Após as sementeiras, incubou-se a 35°C durante 24 horas.

provas de triagem: as colônias suspeitas nos meios seletivos foram submetidas a triagem inicial nos meios Agar Ferro Três Açúcares (TSI) e Agar Lisina Ferro (LIA), sendo consideradas positivas as colônias que desenvolveram as seguintes reações:

- **em TSI :** produção de ácido, com ou sem produção de H_2S , em profundidade e reação neutra ou alcalina na superfície, após 24 horas de incubação;

- **em LIA :** descarboxilação da lisina, verificada pela mudança de cor do meio, que passaria a apresentar coloração púrpura após 24 horas de incubação (com ou sem produção de H_2S).

As colônias que produziram reações características durante a pesquisa de *Salmonella* nos meios anteriores, foram submetidas ao teste de sorologia poli "O".

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo da elaboração das bases protéicas desidratadas (produto), pôde-se observar um comportamento bastante diversificado dos grupos de microorganismos pesquisados no pescado. No veículo amiláceo, os mesmos grupos se mantiveram em níveis praticamente constantes, demonstrando uma certa padronização do produto comercializado. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela.1.

Por meio desta tabela, pode-se verificar que, de modo geral, a qualidade microbiológica do pescado utilizado na elaboração da primeira base desidratada (1ª partida), é superior àquela observada nas partidas subseqüentes. Uma explicação para que isto tenha ocorrido, pode ser o fato de que o peixe utilizado nesta primeira partida, foi criado em um pequeno tanque de alvenaria dentro do posto de aquicultura, local este, que é cercado e protegido, evitando desta forma, o acesso de animais ao local, que poderiam contribuir para o aumento do número de coliformes no pescado. No entanto, o pescado utilizado nas demais partidas, foi criado no lago do Jardim Botânico da UFRRJ, onde não é possível controlar o acesso de aves e mamíferos, o que pode ter contribuído para o carregamento de

Tabela. 1 - Contagens microbiológicas obtidas para as matérias primas utilizadas nas diferentes partidas elaboradas

amostra/ análise	1ª Partida		2ª Partida		3ª Partida	
	peixe	veículo amílceo	peixe	veículo amílceo	peixe	veículo amílceo
Contagem *						
Padrão	$1,7 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3$	$>3 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3$	$8,0 \times 10^6$	$7,8 \times 10^3$
Fungos *						
e Leved.	$2,7 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	$6,6 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$	$>3 \times 10^5$	$9,6 \times 10^3$
Coliformes						
totais	21/g	9,3/g	$1,1 \times 10^5$ /g	24/g	$1,1 \times 10^5$ /g	9,3/g
Coliformes						
Fecais	<1 /g	(-)	$2,4 \times 10^2$ /g	4,3/g	$2,4 \times 10^4$ /g	<1 /g
<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	2,8/g	(-)	2,0/g	(-)
<i>Salmonella</i>	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g
<i>Staphylococcus aureus</i>	$5,0 \times 10$	(-)	$5,0 \times 10^3$	(-)	$1,6 \times 10^5$	(-)
<i>Bacillus cereus</i>	(-)	$5,0 \times 10$	(-)	$5,0 \times 10$	(-)	$5,0 \times 10$
<i>Clostridium</i> *						
sulf. redutores	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

* valores expressos em ufc/g

coliformes oriundos de dejetos levados para as águas do lago, hipótese esta, também levantada por LEITÃO et al (1985) e AHMED (1992). Além disso, microorganismos de origem terrestre, podem também ser carregados para as águas pela chuva e vento situação confirmada por EIROA (1980).

Todos estes fatos, possivelmente, contribuíram para o sensível aumento da carga microbiana verificada nos peixes utilizados nestas partidas.

A ausência de *Clostridium* sulfito redutor, pode ser explicada pelo fato das amostras de peixe analisadas terem sido oriundas de pescado previamente eviscerado e lavado em água corrente, o que facilitou a eliminação do microorganismo. Esta observação está em concordância com a afirmação de BRYAN (1974), de que estes organismos são encontrados no trato intestinal do homem e outros animais.

Embora EIROA (1980), mencione em seu trabalho que quando os peixes são capturados próximos à costa, possam ser encontradas populações importantes de *Bacillus*, em nenhuma das amostras analisadas evidenciou-se a presença deste microorganismo.

Desta forma, o aumento observado nas contagens padrão das 2ª e 3ª partidas, pode ser atribuído, em parte, a um incremento nas populações de coliformes e *Staphylococcus aureus*.

Apesar da elevada contagem de coliformes, e verificação da presença de *Escherichia coli* em contagens semelhantes nas duas últimas amostragens, não se conseguiu isolar *Salmonella* em nenhuma ocasião.

As contagens padrão em placas (CPP) e de fungos e leveduras obtidas, variaram na faixa de 10^4 a 10^6 ufc/g e 10^2 a 10^5 ufc/g respectivamente. Valores para CPP semelhantes

foram encontrados por LEÓN et al (1985) ao analisar espécies marinhas (mojarra e sardinha) capturadas em ambientes de clima tropical, sendo 10^5 ufc/g para mojarra e 10^4 ufc/g para sardinha e por LEÓN et al (1991), que encontrou valores da ordem de 10^5 ufc/g para sardinhas.

Ao contrário, valores bastante contrastantes para contagem de fungos e leveduras foram observados neste trabalho, sendo 10^3 , 10^2 e $>10^5$ ufc/g respectivamente para a 1ª, 2ª e 3ª partidas. Diferindo bastante também dos valores encontrados por aqueles autores, sendo 10^5 ufc/g tanto para sardinha quanto para mojarra os valores obtidos por LEÓN et al (1985) e 10 ufc/g para sardinha, por LEÓN et al (1991) sendo neste caso, a população composta somente por bolores. Estes resultados revelam um comportamento bastante variado destes microorganismos no pescado de clima tropical. Apesar disto, poucos trabalhos citam os resultados obtidos para este grupo, restringindo-se somente a mencionar a contagem padrão como meio de avaliar a carga de deteriorantes presente no produto.

Apesar da elevada carga microbiana apresentada pelo pescado utilizado nas duas últimas partidas (Tabela.1), inclusive com valores acima dos padrões permitidos pelo Ministério da Saúde para coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* que foram observados na 3ª partida, estes resultados não interferiram na qualidade do produto final, uma vez que o peixe é autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Em função do tratamento térmico a que o pescado é submetido, mais importante é a qualidade do veículo amiláceo que será incorporado à massa de pescado autoclavada, pois este veículo, não recebe tratamento algum. Esta observação é feita com base nos resultados

obtidos para a base úmida (massa de pescado autoclavado + veículo amiláceo) e que podem ser observados na Tabela.2. Nesta, pode-se conferir que os valores obtidos para o veículo amiláceo utilizado são bastante semelhantes àqueles verificados para a base úmida correspondente.

Pode-se observar também, que mesmo na 3ª partida onde obteve-se uma contagem de *S. aureus* em torno de 10^5 ufc/g no pescado, na base úmida os resultados obtidos foram sempre negativos. Estes resultados revelam que, embora o pescado possuísse uma carga microbiana bastante elevada, o tratamento térmico utilizado para cozinhar o peixe e amaciar as espinhas visando facilitar sua posterior desintegração, foi também eficiente na redução ou eliminação total dos microorganismos presentes permitindo a utilização deste pescado na elaboração do produto sem qualquer restrição.

Com relação à base úmida da 1ª partida, onde observa-se um aumento bastante acentuado na contagem de *Bacillus cereus* ($>10^5$ ufc/g) em relação ao observado no veículo amiláceo utilizado, atribui-se este resultado a dois fatores importantes a serem considerados:

1º) Contaminação cruzada por meio do liquidificador industrial utilizado na trituração do pescado após a saída deste da autoclave, devido a uma falha na higienização do equipamento, que também, era utilizado no processamento de frutas;

2º) Houve uma demora exagerada entre a saída do pescado da autoclave e a colocação da base úmida para secagem em estufa (em torno de 1 hora e trinta minutos).

Esta situação provavelmente permitiu a contaminação do produto por esporos de *B. cereus* presentes no equipamento. Por sua vez, o tempo decorrido até o momento em que o produto foi colocado na estufa para secagem, e finalmente, atinge 80°C, em condições de

Tabela. 2 - Qualidade microbiológica das bases úmidas obtidas a partir da massa de pescado e veículo amiláceo, utilizados para a elaboração de cada partida do produto

Análise	Base Úmida I	Base Úmida II	Base Úmida III
Contagem*			
Padrão	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
Fungos e *			
Leveduras	$2,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
Coliformes			
totais	$1,5 \times 10^4/g$	$1,1 \times 10^2/g$	$1,1 \times 10^2/g$
Coliformes			
fecais	$<1/g$	$2,3/g$	$2,3/g$
<i>Escherichia coli</i>	(-)	(-)	(-)
<i>Salmonella</i>	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g
<i>Staphylococcus aureus</i> *	(-)	(-)	(-)
<i>Bacillus cereus</i>	$>3,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10$	(-)
<i>Clostridium</i> *	(-)	(-)	(-)
Sulfito Redutores			

* valores expressos em ufc/g

temperatura e umidade favoráveis, permitiram a germinação deste microorganismo, o que poderia explicar os valores elevados que foram encontrados na base seca. Após detectadas e corrigidas todas estas falhas, os resultados obtidos posteriormente, confirmam que a carga microbiana presente na base úmida é praticamente aquela encontrada no veículo amiláceo, tanto quantitativa quanto qualitativamente. Daí o cuidado que se deve dispensar à manipulação da base úmida, visando garantir um produto final de boa qualidade e estabilidade.

A Tabela.3, mostra os resultados obtidos ao longo do estudo da estabilidade das diferentes partidas com relação ao comportamento dos microorganismos deteriorantes.

Com base nesta tabela, verifica-se que na primeira partida houve redução de uma casa logarítmica no tempo zero (10^4 ufc/g), em relação à base úmida (10^5 ufc/g), ocorrendo depois mais uma redução verificada aos 7 dias (10^3 ufc/g). Após este tempo as contagens se mantiveram constantes, sempre em 10^3 ufc/g, durante todo o período em que se estudou a estabilidade do produto. Provavelmente, estas reduções ocorreram principalmente pela destruição de células vegetativas de *B. cereus*, o que pode ser confirmado pela avaliação da Tabela. 5.

Embora fosse o esperado, de acordo com os resultados obtidos por MORAIS et al (1981), o mesmo comportamento não foi observado nas demais partidas.

Na segunda partida, a contagem obtida no tempo zero foi semelhante aquela obtida para a base úmida (10^3 ufc/g).

Com relação à 3ª partida, a contagem padrão se manteve constante durante os 90 dias, sendo igual inclusive, ao valor verificado na base úmida (10^3 ufc/g). Este resultado é

Tabela. 3 - Comportamento dos microorganismos deteriorantes nas diferentes partidas de base seca durante a avaliação da estabilidade

Tempo (dias)	Contagem Padrão em Placas *			Contagem de Fungos e Leveduras *		
	I	II	III	I	II	III
0	$3,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
7	$6,8 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	$3,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
15	$8,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	$2,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
30	$3,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$7,2 \times 10^2$
45	$8,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$9,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
60	$8,0 \times 10^3$	$9,2 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$8,7 \times 10^2$	$6,9 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$
90	$7,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$	$7,1 \times 10^2$

* valores expressos em ufc/g
- Análises realizadas em duplicata

semelhante aquele obtido na primeira partida, pois, atribuindo-se a redução havida até os 7 dias, à uma redução no número de células de *Bacillus cereus* devido à contaminação ocorrida e sendo a contagem deste microorganismo pequena na terceira partida, isto pode explicar a constância dos resultados obtidos.

Com relação à contagem de fungos e leveduras, à exceção da 1ª partida, na qual se observa no tempo zero, a diminuição de um ciclo decimal (10^2), em relação à base úmida (10^3), e permanência dos resultados em torno deste valor, durante todo o estudo da estabilidade, as partidas seguintes, permaneceram no tempo zero com valores semelhantes aos observados para as bases úmidas correspondentes. Tais valores permaneceram durante praticamente os 90 dias. As pequenas variações ocorridas ao longo do estudo, podem ser atribuídas ao fato de que embora as amostras tenham sido retiradas do mesmo produto, este não apresente homogeneização, uma vez que se trata de uma mistura de granulometria diferente, o que pode ter ocasionado as oscilações observadas ao longo das análises.

Os resultados obtidos para os microorganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias, são demonstradas na Tabela.4. Através desta, pode-se verificar a constância dos coliformes fecais em todas as partidas, nas quais, aparentemente, a quantidade de células viáveis existentes na base seca provenientes do veículo amiláceo, permaneceu praticamente inalterada ao longo dos 90 dias. Uma vez que a carga de coliformes fecais no veículo amiláceo utilizado na primeira partida era praticamente nula, conclui-se que não houve contaminação do produto e muito menos incremento na população existente na base seca, pois os resultados obtidos se mantiveram sempre negativos (-) ou <1 cel./g de produto.

Tabela. 4 - Comportamento dos microorganismos indicadores observado durante a avaliação da estabilidade das bases desidratadas

Tempo (dias)	Coliformes totais			Coliformes fecais			<i>Escherichia coli</i>		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	67/g	24,4/g	46/g	<1/g	2,1/g	<1/g	(-)	(-)	(-)
7	13,4/g	$1,1 \times 10^3$ /g	19,5/g	<1/g	<1/g	(-)	(-)	(-)	(-)
15	46/g	$1,1 \times 10^3$ /g	12,15/g	<1/g	1,6/g	2,05/g	(-)	(-)	(-)
30	46/g	$7,8 \times 10^2$ /g	4,3/g	(-)	2,4/g	<1/g	(-)	(-)	(-)
45	65,5/g	$7,8 \times 10^2$ /g	6,6/g	(-)	1,1/g	1,35/g	(-)	(-)	(-)
60	35/g	$1,1 \times 10^2$ /g	3,3/g	(-)	2,9/g	2,15/g	(-)	(-)	(-)
90	35/g	$7,8 \times 10^2$ /g	<1/g	(-)	1,8/g	<1/g	(-)	(-)	(-)

- Análises realizadas em duplicata

Em nenhum momento foi detectada a presença de *Escherichia coli* nas bases secas, o que ajuda a confirmar a constatação anterior de que as estas foram elaboradas seguindo-se os padrões de higiene necessários para obter um produto com qualidade.

Na Tabela.5, são mostrados os resultados obtidos para os microorganismos causadores de toxinfecção alimentar. Os resultados obtidos para *Salmonella*, *Clostridium* sulfito redutores e *Staphylococcus aureus*, durante o acompanhamento da estabilidade das bases desidratadas, foram sempre negativos, tais como os resultados obtidos para o veículo amiláceo, o que confirma não ter havido contaminações após a elaboração do produto. Isto indica que a carga microbiana existente no produto final, será a mesma que existia no veículo amiláceo adicionado.

Do grupo de microorganismos patogênicos analisados, *Bacillus cereus* foi o que mereceu maior atenção. Isto se deve ao fato dele ter sido isolado em todas as vezes em que se analisou a matéria prima e, sendo um microorganismo esporulado, é capaz de resistir por longos períodos em produtos com reduzida atividade de água como é o caso de farinhas.

Excetuando-se a 1ª partida em que ocorreu uma contaminação, os valores obtidos para *B. cereus* na base seca oscilaram entre o negativo (-) e 10 ufc/g. Esta variação, pode ser atribuída, como já foi comentado anteriormente, ao fato de se tratar de uma mistura desidratada, e que, como tal, não possui homogeneização perfeita quando acondicionada em qualquer tipo de recipiente.

Os valores obtidos neste trabalho, para este microorganismo, são idênticos ou estão um pouco abaixo daqueles encontrados por EIROA et al (1975), onde os valores médios estavam em torno de 7×10 e 6×10^2 ufc/g na farinha de trigo e na farinha de mandioca respectivamente. Tais valores, coincidem também, com aqueles encontrados por LEITÃO

Tabela. 5 - Comportamento dos microorganismos patogênicos observado nas bases secas durante 90 dias

Tempo (dias)	<i>Bacillus cereus</i> *			<i>Staphylococcus aureus</i> *			<i>Salmonella</i>			<i>Costridium sulf. red.*</i>		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	$7,7 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	(-)	(-)	(-)	(-)	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	(-)	(-)	(-)
7	$1,6 \times 10^3$	$5,0 \times 10$	(-)	(-)	(-)	(-)	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	(-)	(-)	(-)
15	$1,1 \times 10^3$	$7,5 \times 10$	(-)	(-)	(-)	(-)	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	(-)	(-)	(-)
30	$1,5 \times 10^2$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	(-)	(-)	(-)
45	$5,0 \times 10^2$	(-)	$5,0 \times 10$	(-)	(-)	(-)	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	(-)	(-)	(-)
60	$2,8 \times 10^2$	(-)	$2,5 \times 10$	(-)	(-)	(-)	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	(-)	(-)	(-)
90	$1,5 \times 10^2$	$5,0 \times 10$	$2,0 \times 10$	(-)	(-)	(-)	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	(-)	(-)	(-)

* valores expressos em ufc/g
- Análises realizadas em duplicata

(em DELAZARI, 1979), que relata a presença de *B. cereus* em alimentos desidratados em níveis variando de 1×10 a $3,6 \times 10^2$ ufc/g.

Uma vez que o padrão do Ministério da Saúde permite valores até 10^3 ufc/g (Quadro.3), em amidos, farinhas e féculas, a base seca obtida neste trabalho atende perfeitamente às exigências deste órgão.

Quadro. 3- Padrões microbiológicos para pescado fresco, amidos, farinhas e féculas.

mostra/ análise	Padrões	
	peixe <i>in natura</i>	amidos, farinhas e féculas
Contagem Padrão	—	—
Fungos e Leved.	—	—
Coliformes Fecais	10^2 /g	10/g
<i>Salmonella</i>	ausência em 25g	ausência em 25g
<i>Staphylococcus aureus</i> *	10^3 /g	5×10^2 /g
<i>Bacillus cereus</i> *	—	máximo 10^3 /g
<i>Clostridium sulf. red.</i>	—	—

*padrões expressos em ufc/g

- padrões da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - DINAL (Portaria nº 001 de 28 de Janeiro de 1987)

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem concluir que:

1ª) de modo geral, a qualidade microbiológica das matérias primas, foi satisfatória;

2ª) mesmo com a elevada incidência de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* no pescado *in natura*, o tratamento térmico dado a este (121°C por 20 minutos), foi suficiente para destruir tanto os microorganismos patogênicos, quanto os deteriorantes, possibilitando a utilização deste tipo de peixe de água doce, para elaborar bases desidratadas sem riscos à saúde pública;

3ª) os resultados obtidos na análise das bases úmidas, permitem afirmar que a carga microbiana presente nestas, é a mesma em quantidade e qualidade daquela presente no veículo amiláceo, uma vez que a massa de pescado autoclavado é considerada estéril;

4ª) embora fosse esperado uma diminuição no número de microorganismos na base seca após a saída desta da estufa, onde permaneceu durante aproximadamente 4 horas a 80°C, o que se observou foi que esta continha praticamente a mesma carga microbiana inicial;

5^a) o estudo da estabilidade microbiológica mostrou que a base seca armazenada à temperatura ambiente (25 - 30°C), não sofreu praticamente alteração na carga inicial de microorganismos, sendo viável portanto, seu armazenamento durante três meses nestas condições;

6^a) os resultados obtidos neste trabalho, atendem às exigências da Comissão Nacional de Normas e Padrões do Ministério da Saúde para alimentos desidratados;

7^a) é possível portanto, com investimento relativamente baixo, produzir em grande escala, bases protéicas desidratadas à base de peixe (tilápia), com boa qualidade e estabilidade microbiológica e que podem ser conservadas sem maiores problemas à temperatura ambiente o que favorece seu armazenamento e sua distribuição;

8^a) seria interessante em uma próxima etapa deste trabalho, efetuar-se o estudo da atividade de água do produto final.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, F.E. "Review: Assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with microorganisms, parasites, and natural toxins in the U.S." J. F. Sci. Technol. vol.27, p.243-260, 1992.
- AKANDE, G.R.; KNOWLES, M.J. & TAYLOR, K.D.A. "Improved utilization of flesh from mackerel as salted dried fish cakes" J. F. Sci. Technol. vol.23, p.495-500, 1988.
- AKANDE, G.R. "Technical note: Improved utilization of stunted tilápia spp." J. F. Sci. Technol. vol.24, p.567-571, 1989.
- ANAND, S.K. & SINGH, R.S. "Pre-formed enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in infant foods" J. F. Sci. Technol. vol.56(2), p.92-93, 1988.
- ANDREWS, W.H. "A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods" Food Technol. vol.39(3), p.77-82, 1985.
- ANGELOTTI, R. "Food and drug administration view of staphylococcal contamination of food" J. Milk and Food Technol. Vol.33(8), p.358-360, 1970.

- APIHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION "Compendium of methods for microbiological examination of foods" SPECK, M.L. ed. Washington, D.C. 1976.
- BARBE, C.D.; MANDIGO, R.W. & HENDRICKSON, R.L. "Bacterial flora associated with rapid-processed ham" J. F. Sci. vol.32, p.988, 1967.
- BERAQUET, N.J. & LINDO, M.M.K. "Transformações bioquímicas "post mortem" em pescado" Bol. do ITAL vol.22(2), p.169-192, abr-jun, 1985.
- BERAQUET, N.J.; LINDO, M.M.K. & VIEIRA, M.C. "Métodos químicos na avaliação da qualidade de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) fresca e processada termicamente" Col. do ITAL vol.15, p.141-170, 1985.
- BERI, H.K.; JAMES, M.A. & SOLANKI, K.K. "Bacterial flora of some fishes of Maharashtra and Saurashtra coasts (India)" J. F. Sci. Technol. vol.26(6), p.318-321, 1989.
- BERTULO, V.H. "Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos" 1ª ed. Editorial Hemisfério Sur, Buenos Aires-Argentina, 1975.
- BRANDÃO, M.L.C.C. & FURLAMENTO, S.M.P. "Determinação quantitativa de alguns grupos de microorganismos em sardinhas (*Sardinella aurita*), vendidas em mercados e feiras livres do município de São Paulo" Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.4(2) p.158-180, jul-dez. 1984.
- BRYAN, F.L. "What sanitarian should know about *Clostridium perfringens* foodborne illness" J. Milk and Food Technol. vol.32(10), p.381-389, 1969.
- BRYAN, F.L. "Microbiological food hazards today - Based on epidemiological information" Food Technol. vol.28(9), p.52-64, 1974.

- CHIRIFE, J.; VAAMONDE, G. & SCARMATO, G. "On the minimal water activity for growth of *Staphylococcus aureus*" J. F. Sci. vol.47(6), p.2054-2057, 1982.
- CHORDASH, R.A. & INSALATA, N.F. "Incidence and pathological significance of *Escherichia coli* and other sanitary indicator organisms in food and water" Food Technol. vol.31(10), p.54, 1978.
- CORLLET Jr., D.A. "Setting microbiological limits in the food industry" Food Technol. vol.28, p.34-40, 1974.
- CUTTING, C.L. & SPENCER, R. "Fish and fish products" in: HERSCHDOERFER, S.M. Quality control in the food industry. vol.2 Academic Press, London - England, 1968.
- DELAZARI, I. & LEITÃO, M.F.F. "*Staphylococcus aureus* enteropatogênico em macarrão" Col. do ITAL vol. 7, II Tomo, p.485-497, 1976.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M. & EIROA, M.N.U. "*Bacillus cereus* em alimentos desidratados" Bol. ITAL n°60, p.31-40, nov/dez.1978
- DELAZARI, I. "Aspectos microbiológicos de alimentos desidratados" Bol. do ITAL vol.16(3), p. 215-226, jul-set. 1979.
- DEL VALLE, F.R. & NICKERSON, J.T.R. "A quick-salting process for fish 1. Evolution of the process" Food Technol. Vol.22 p.1036-1038, 1968.
- DINAL - "Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária" Portaria n° 001 de 28 de Janeiro de 1987.
- EIROA, M.N.U.; LEITÃO, M.F.F.; LEITÃO, R.F.F. & VITTI, P. "Caracterização microbiológica de farinhas" Col. ITAL vol.6, p.459-473, 1975.

- FIROA, M.N.U. "Aspectos microbiológicos relacionados à conservação e ao consumo de pescado" Bol. SBCTA, Campinas. Vol.54, p. 9-37, dez. 1980.
- FIROA, M.N.U. "Atividade de água: influência sobre o desenvolvimento de microorganismos e métodos de determinação em alimentos" Bol. ITAL vol.18(3), p.353-383, jul-set. 1981.
- FIROA, M.N.U. "Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causados por alimentos processados" Coletânea do ITAL vol.19(2), p.101-112, jul-dez. 1989.
- FALCÃO, P.T.; LESSI, E. & LEITÃO, M.F.F. "Deterioração do jaraqui (*Semaprochilodus insignis*, Schomburgk, 1841), capturado no estado do Amazonas e conservado em gelo" Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, vol.14(2), p.168-177, jul-dez. 1994.
- FAVARIN, V. "Estudo microbiológico em alguns miúdos bovinos" Tese apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1981.
- FERREIRA, V.L.P. & BERAQUET, N.J. "Controle de qualidade na indústria de pescado em conserva" Bol. do ITAL vol.18(1), p.67-84, jan-mar. 1981.
- FIGUEIREDO, A.A. "Projeto MISPRAN. Misturas com proteína animal" CNPq, Projeto 63252049-3, 1978.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. & KLEIN, C.S. "Evaluation of a rapid impedimetric procedure for the quantitative estimation of coliforms" J. F. Sci. vol.48(4), p.1307-1311, 1983.
- FRAZIER, W.C. "Microbiologia de los alimentos" 2ª ed. Editorial Acribia, Zaragoza-España, 1972.

- FREIRE JÚNIOR, M. "Elaboração e algumas características de bases protéicas desidratadas utilizando vísceras bovinas" Tese apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de alimentos, 1981.
- FUZHARA, T.O. & FRANCO, B.D.G.M. "Bactérias patogênicas e bactérias indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André - São Paulo" Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.13(1), p.77-88 jan-jun. 1993.
- GAVA, J.P. "Elaboração de bases desidratadas enriquecidas com proteína animal e a influência do processo sobre alguns de seus nutrientes" Tese apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1979.
- GELDREICH, E.E. & BORDNER, R.H. "Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review" J. Milk and Food Technol. vol.34, p.184-195, 1971.
- GELLI, D.S. "Contaminantes microbianos em alimentos" Bol. da SBCTA nº 7, p.45-50, 1983.
- GIRIJA MENON, A.V. & BALAKRISHNAN, N. "Histological changes in fresh water fish muscle stored in chilled condition" J. F. Sci. Technol. vol.25(3), p.167-169, 1988.
- GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M. & KIM, H.U. "*Bacillus cereus*: Food poisoning organism. A review" J. Milk and Food Technol. vol.35, p.213-227, 1972.

- GUIMARÃES, O.J.; SALES, R.O. & MONTEIRO, J.C.S. "Análise química, microbiológica e organoléptica da tilápia do Nilo (*Sarotherodon nilotic*), conservada em gelo" Ciênc. Agronômica, Fortaleza vol.19(1), p.147-151, jun. 1988.
- HALL, W.M.; WITZEMAN, J.S. & JAMES, R. "The detection and enumeration of *Clostridium perfringens* in foods" J. F. Sci. vol.34, p.212-214, 1969.
- HANSEN, P. "Fish as food in developing countries" in: Mc LOUGHLIN, J.V. & Mc KENNA, B.M. Food science and technology: Present status and future direction vol.5 Boole Press Dublin, 1983.
- HIMELBLOOM, B.H.; CRAPO, C.; BROWN, E.K.; BABBITT, J. & REPPOND, K. "Pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) quality during ice and chilled seawater storage" J. F. Quality vol.17, p. 197-210, 1994.
- HOATHER, R.C. & ENGLISH, E. "Water" in: HERSCHDOERFER, S.M. Quality control in the food industry. vol.2 Academic Press, London - England, 1968.
- JAY, J.M. "Modern food microbiology" D. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 2nd edition, 1978.
- KIM, H.U. & GOEPFERT, J.M. "Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products" J. Milk and Food Technol. vol.34(1), p.12-15, 1971.
- KVENBERG, J.E. & ARCHER, D.L. "Economic impact of colonization control on foodborne disease" Food Technol. vol.41(7), p.77-81, 1987.
- LANARA - Brasil, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária Laboratório Nacional de Referência Animal "Métodos analíticos oficiais para controle

de produtos de origem animal e seus ingredientes. I - Métodos microbiológicos”
Brasília - D.F. Setembro de 1981.

LEE, J.S. “Proteolytic microorganisms” in: SPECK, M.L. Compendium of methods for the
microbiological examination of foods. Washington, American Public Health
Association, p.190-193, 1976.

LEITÃO, M.F.F.; ROMEU, A.P. & CRUZ, R.R. “Coliformes totais e fecais como
indicadores de contaminação I - Presença no solo, água e vegetais” Col. do ITAL
vol.4, P.1-11, 1971/1972. a

LEITÃO, M.F.F.; ROMEU, A.P. & CRUZ, R.R. “Coliformes totais e fecais como
indicadores de contaminação II - Avaliação do teste para caracterização de coliformes
fecais” Col. do ITAL vol.4, p.13-21, 1971/1972. b

LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I. & MORAES, C. “Microbiologia do camarão-roça
(*Penaeus brasiliensis*) congelado” Col. do ITAL vol.5, p.17-33, 1973/1974. a

LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I. & MAZZONI, H. “Microbiologia de alimentos
desidratados” Col. ITAL vol.5, p.223-241, 1973/1974. b

LEITÃO, M.F.F.; FALOMIR, C.O.; SANTOS, L.C.; MIYA, E.E.; SHIROSE, I. & KAI,
M. “Transformações microbiológicas, químicas e organolépticas em sardinhas
(*Sardinella aurita*) armazenadas sob refrigeração” Col. do ITAL vol.7, p.117-137,
1976.

LEITÃO, M.F.F. “Microbiologia do pescado e controle sanitário no processamento” Bol.
do ITAL nº.50, p.1-35, mar-abr, 1977.

- LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M.; DRAETTA, I.S. & KAI, M. "Transformações químicas e microbiológicas e avaliação da microflora urease-positiva em cação armazenado sob refrigeração" Col. do ITAL vol.10, p.15-31, 1979.
- LEITÃO, M.F.F.; BERAQUET, N.J.; MANTOVANI, D.M.B.; TEIXEIRA NETO, R.O.; ANGELUCCI, E.; EIROA, M.N. & KAI, M. "Variação da atividade de água, umidade e concentração salina na salga de sardinhas inteiras e evisceradas-descabeçadas e avaliação do desenvolvimento de *Clostridium botulinum* tipo A e *Staphylococcus aureus* no processo" Bol. do ITAL vol.20(2), p.131-159, abr-jun. 1983.
- LEITÃO, M.F.F.; TEIXEIRA FILHO, A.R. & BALDINI, V.L.S. "Microbiota bacteriana em espécies de peixes fluviais e lacustres no estado de São Paulo" Col. do ITAL, Campinas. vol. 15, p.91-111, 1985.
- LEITÃO, M.F.F. "Caracterização e ocorrência de *Alteromonas* (*Pseudomonas*) *putrefaciens* em carnes e peixes refrigerados" Col. do ITAL vol.18(1), p.23-33, jan-jun, 1988.
- LEITE, M.O. "Elaboração e características de bases protéicas MISPRAN com diferentes níveis de soja e sua distribuição e aceitabilidade por escolares da Baixada Fluminense" Tese apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para Obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1984.

- LEÓN, J.C.M.; BOURGES, H.R. & NECOECHEA, H.M. "Improved utilization of marine species of low commercial value through the elaboration of hydrolysates" Arch. Latinoamericanos de Nut. vol.35(1), p.105-118, 1985.
- LEÓN, J.C.M.; MORRISEY, M. & VALLIN, M.E. "Chemical microbiological and sensory evaluation of a dried salted product produced from sardines (*Sardinops caerulea*) and cereals" Arch. Latinoamericanos de Nut. vol.XLI, nº3, p.428-440, 1991.
- LIMA, D.C. "Bioquímica do frescor do peixe" Bol. do ITAL vol.28, dez. 1971.
- MACHADO, Z.O. "Avaliação biológica em ratos de misturas MISPRAN elaboradas com diferentes níveis de proteína de soja" Tese apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1984.
- MAGRINI, R.C.; CHIRIFE, J. & PARADA, J.L. "A study of *Staphylococcus aureus* growth in model systems and processed cheese" J. F. Sci. vol.48(3), p.882-885, 1983.
- MARTIN, R.E.; GRAY, R.J.H. & PIERSON, M.D. "Quality assessment of fresh fish and the role of the naturally occurring microflora" Food Technol. Vol.32(5), p.188-193, 1978.
- MATCHES, J.R. & LISTON, J. "Growth of *Salmonella* on irradiated and non-irradiated seafoods" J. F. Sci. vol.33, p.406-410, 1968.
- MATCHES, J.R. & LISTON, J. "Effects of incubation temperature on the salt tolerance of *Salmonella*" J. Milk Food Technol. vol.35(1), p.39-44, 1972.

- MC KNIGHT, I.C.S.; LEITÃO, M.F.F. & LEITÃO, R.F.F. "*Bacillus cereus* em macarrões industrializados. I- Efeito das condições de processamento na sua multiplicação" Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.10(1), p137-155, 1990.
- MINOR, T.E. & MARTH, E.H. "*Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. I- The *Staphylococci*: characteristics, isolation, and behavior in artificial media" J. Milk and Food Technol. vol.34 (11), p. 557-564, 1971.
- MINOR, T.E. & MARTH, E.H. "*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* food intoxications. A review. II- Enterotoxins and epidemiology" J. Milk Food Technol. vol.35(1), p.21-29, 1972.
- MORAIS, C.; AGUIRRE, J.M.; DELAZARI, I.; PIZZINATO, A.; TRAVAGLINI, M.M.E.; FIGUEIREDO, I.B.; SALES, A.M. & KAI, M. "Utilização de sobras da filetagem de pescado na obtenção de farinha mista de peixe e milho" Bol. do ITAL vol.18(2), p.177-199, abr-jun. 1981.
- MORITA, T.N. & WOODBURN, M. "Enterotoxin C₂ production by *Staphylococcus aureus* in entree salads" J. F. Sci. vol.48(1), p.243-245, 1983.
- MOSSEL, D.A.A. "Microbiological quality control in the food industry" J. Milk and Food Technol. vol.32(5), p.155-171, 1969.
- MOURA FÉ, J.A. & NELSON, F.E. "Evaluation of methods for detection of coliform bacteria in raw milk" J. Milk Food Technol. vol.35(2), p.67-70, 1972.
- NAKAMURA, M. & KELLY, K.D. "*Clostridium perfringens* in dehydrated soups and sauces" J. F. Sci. vol.33, p.424-426, 1968.

- NICKELSON II, R. & FINNE, G. "Fish, crustaceans, and precooked seafoods" in: SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American public Health Association, p.573-589, 1976.
- NOTERMANS, S. & HEUVELMAN, C.J. "Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*" J. F. Sci. vol.48(6), p.1832-1835, 1983.
- PEDROSA-MENABRITO, A. & REGENSTEIN, J.M. "Shelf-life extension of fresh fish - A review part III - Fish quality and methods of assessment" J. F. Quality vol.13, p.209-223, 1990. a
- PEDROSA-MENABRITO, A. & REGENSTEIN, J.M. "Shelf-life extension of fresh fish - A review part II - Preservation of fish" J. F. Quality vol.13, p.129-146, 1990. b
- REIS, R.B.; KRUGER, C.S. & MACIEL, M.S. "*Salmonella* ssp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá - MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas" Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.15(1), p.74-78, jan-jun. 1995.
- ROBBS, N.K. "Avaliação da qualidade protéica de alguns miúdos bovinos, utilizando um protozoário (*T. pyriformis* W) como organismo teste" Tese apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimento, 1982.
- SALES, R.O.; OLIVEIRA, J.A.P.; COSTA, F.J.L. & SALES, A.M. "Avaliação do estado de frescor do pescado capturado em água doce e mantido sob refrigeração, no açude de Orós, Ceará" Ciênc. Agronômica, Fortaleza vol.19(2), p.109-115, dez.1988. a

- SALES, R.O.; MONTEIRO, J.C.S.; MARTINS, C.B.; MAIA, G.A.; MACHADO, N.A.N. & FEITOSA, T. "Estudo da estabilidade da tilápia do Nilo (*Sarotherodon niloticus*) defumada" Ciênc. Agrônômica, Fortaleza vol.19(2), p.65-69, dez. 1988. b
- SANDERS, A.C.; BRYAN, F.L.; OLSON Jr., J.C. & MADDEN, J.M. "Foodborne illness - Suggested approaches for the analysis of food and specimens obtained in outbreaks" in: SPEK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, p.496-507, 1976.
- SANTOS, C.M.A.L. & GARBUTT, J. "Investigações preliminares sobre microbiologia da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillanti*) congelada" Bol. SBCTA vol.13, p.47-70, 1979.
- SCHEUSNER, D.L.; HOOD, L.L. & HARMON, L.G. "Effect of temperature and pH on growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*" J. Milk and Food Technol. vol.36, p.249-252, 1973.
- SHARF, J.M. "Exame microbiológico de alimentos" Ed. Polígono, S.P. 1972.
- SILLIKER, J.H. "New bacteria in the news . A special symposium" Food Technol. vol.40(8), p.16-26, 1986.
- SILVA, P.P.O.S. "Estabilidade microbiológica de manteiga" ese apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1987.
- SINGH, B.R. & KULSHRESTHA, S.B. "Occurrence of enterotoxigenic *Salmonella* serotypes in seafoods" J. F. Sci. Technol. vol.30(6), p.438-439, 1993.

- TATINI, S.R. "Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various toxins" J. Milk and Food Technol. vol.36, p.559-563, 1973.
- THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. "Análisis microbiológico de los alimentos" Ed. Acribia Zaragoza - España 1973.
- TROLLER, J.A. "The water relations of food borne bacterial pathogens. A review" J. Milk and Food Technol. vol.36, p.276, 1973.
- TROLLER, J.A. "Food spoilage by microorganisms tolerating low- a_w environments" Food Technol. vol.33(1), p.72-75, 1979.
- VANDERZANT, C.; MROZ, E. & NICKELSON, R. "Microbial flora of gulf of Mexico and pond shrimp" J. Milk and Food Technol. vol.33(8), p.346-350, 1970.
- VARADARAJ, M.C. "Methods for detection and enumeration of foodborne bacterial pathogens: A critical evaluation" J. F. Technol. vol.30(1), p.1-13, 1993.
- VIANA, D.M. & FIGUEIREDO, A.A. "Elaboração e características de bases protéicas desidratadas utilizando frangos" in: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia e Alimentos, 4. Anais. Rio de Janeiro, SBCTA, 1980.
- WARD, D.R. & BAJ, N.J. "Factors affecting microbiological quality of seafoods" Food Technol. vol.42(3) p.85-89, 1988.
- YU, S.Y. & TAN, L.K. "Acceptability of crackers ("Keropok") with fish protein hidrolysate" J. F. Sci. Technol. vol.25, p. 204-208, 1990.