



M 2020

Determinação da evolução dos níveis de histamina durante a produção de conservas de pescado

MARIA DA ASSUNÇÃO DE ALMEIDA MENDES CIRNE PACHECO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Determinação da evolução dos níveis de histamina durante a produção de conservas de pescado

Dissertação de Mestrado

de

Maria da Assunção de Almeida Mendes Cirne Pacheco

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação
realizado em

Conservas A Poveira - Fábrica de Conservas A Poveira S.A.



Orientador na FEUP: Prof.^a Vera Homem

Coordenador na A Poveira: Eng.^a Cecília Leite



Departamento de Engenharia Química

fevereiro de 2020

Agradecimentos

Pela concretização da presente dissertação quero agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que esta fosse possível.

À Professora Vera Homem, orientadora académica desta dissertação, e membro integrado do LEPABE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado por Financiamento Base - UIDB/00511/2020 da Unidade de Investigação - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE - financiada por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC), gostava de agradecer pela orientação, aconselhamento, disponibilidade e ajuda que me deu desde o início até ao fim desta etapa.

À Engenheira Cecília Leite, diretora do departamento de qualidade e coordenadora responsável por mim na empresa, pela oportunidade que me proporcionou em realizar esta dissertação na Fábrica de conservas “A Poveira”. Pela vontade de solucionar todos os problemas surgidos, pelo acompanhamento, compreensão, ajuda e confiança.

À Dores Meireles, Alice Pontes, Tânia Mallard, Heloísa Gonçalves, Mariana Aleixo, Andreia Carpinteiro e Célia Correia, operadoras do laboratório de qualidade, por me terem recebido da melhor forma possível, por estarem sempre disponíveis para ajudar e pela boa disposição e carinho demonstrado. À Elsa e a todos os demais colaboradores da empresa pela preocupação, integração e simpatia.

À Catarina Espregueira, Luísa Potes, Heloísa Reis e Letícia Reis por toda a amizade, companheirismo e ajuda ao longo destes seis anos.

À Tia Tó e à Tia Mali pela ajuda prestada e pela disponibilidade demonstrada.

Aos meus pais e irmãs pelo apoio, motivação e carinho ao longo da minha vida. Às minhas avós que sempre tiveram um papel determinante no meu crescimento, que sempre torceram por mim e que tenho a certeza de que estarão sempre comigo. Por fim, ao João por me fazer acreditar em mim nas situações mais difíceis, por me apoiar em todas as minhas decisões e pela boa disposição e alegria contagiantes.

A todas as pessoas que estiveram sempre comigo, desde o início até ao fim.

Resumo

A presente dissertação descreve o trabalho realizado na empresa A Poveira - Fábrica de Conservas, S.A. em parceria com a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP). O principal objetivo deste projeto consistiu na elaboração de um estudo que permitisse avaliar a evolução da concentração de histamina no pescado durante etapas específicas da produção de conservas, avaliando temperaturas e tempos de armazenamento.

Este tema surgiu com a necessidade de identificar o principal perigo alimentar para as conservas neste sector e na fábrica em questão. Assim, através de uma análise de perigos e pontos críticos de controlo identificou-se a histamina como um perigo químico a ter em consideração. Para este estudo foram selecionadas quatro espécies de pescado - sardinha, carapau, cavala e atum. Assim, com o objetivo de confirmar se as condições atualmente estabelecidas pela empresa, nomeadamente temperaturas e tempos de armazenamento, são as mais adequadas para evitar o aumento dos níveis de histamina no pescado, foram realizados ensaios em que os peixes foram expostos a três diferentes temperaturas após o processo de salmoura ou descongelação e de cozedura. A evolução da concentração de histamina foi avaliada ao fim de 2, 6 e 8 dias à temperatura ambiente ($T = 25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), à temperatura intermédia ($T = 10 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e à temperatura de refrigeração ($T = 5 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Também foi determinada a adequabilidade do sistema de medição já utilizado no complexo fabril para a determinação dos níveis de histamina, recorrendo ao estudo de repetibilidade e de ensaios de recuperação de forma a assegurar a validade dos resultados obtidos.

O estudo efetuado no presente trabalho permitiu concluir que o sistema de medição utilizado é indicado para a análise das matérias-primas em causa e que o valor de $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, determinado pelo departamento de qualidade, é fundamentado e apropriado. Também, que após o processo de salmoura e descongelação, o peixe pode ficar exposto à temperatura ambiente até 12 horas. À temperatura intermédia, o peixe fresco não deve ultrapassar um dia sem conservação, enquanto o pescado congelado pode permanecer até três dias. Após o processo de cozimento, quando o pescado é exposto à temperatura ambiente, o prazo definido mantém-se. À temperatura intermédia, com exceção da cavala cozida congelada, o pescado pode permanecer até oito dias. Por fim, à temperatura de refrigeração, após ambos os processos o peixe pode ser mantido durante oito dias sem que o nível de histamina ultrapasse os $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Palavras Chave (Tema): Conservas de pescado, Histamina, teste enzimático, efeito da temperatura

Abstract

This dissertation describes the work carried out in the company A Poveira - Fábrica de Conservas, SA”, in partnership with the Faculty of Engineering of the University of Porto (FEUP). This project’s main objective is to study the evolution of the concentration of histamine in fish during specific stages of the production of canned fish, evaluating different temperatures and storage times.

This theme arose with the need to identify the main food hazard to the end consumer, considering the canned fish products’ sector and the factory in question. Thus, through an analysis of hazards and critical control points, histamine was identified as a chemical hazard that should be considered. For this study, four species of fish were selected - sardines, horse mackerel, mackerel and tuna. Therefore, in order to confirm that the conditions currently established by the company, namely temperatures and storage times, are the most appropriate to avoid increasing the levels of histamine in the fish, tests were carried at three different temperatures after the brine or defrosting and cooking process. The evolution of histamine concentration was assessed after 2, 6 and 8 days at room temperature ($T = 25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), intermediate temperature ($T = 10 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) and refrigeration temperature ($T = 3 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$). The suitability of the measurement system already used in the manufacturing complex for determining histamine levels was also studied, using repeatability and recovery tests to ensure the validity of the results obtained.

Due to the present work, it was possible to conclude that the suggested measurement system is indicated for the analysis of the raw materials under discussion, and that the limit value of $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ determined by the quality department is reasoned and appropriate.

In addition, after the brining and thawing process, the fish can be exposed to room temperature for up to 12 hours. At intermediate temperature, fresh fish must not exceed one day without preservation, while frozen fish can remain for up to three days. After the cooking process, when the fish is exposed to room temperature, the defined period remains, while at the intermediate temperature the fish can remain for up to eight days, except for frozen cooked mackerel. Finally, at refrigeration temperature, after both processes, the fish can be maintained for eight days without the histamine level exceeding $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Keywords: Canned fish, Histamine, enzyme test, temperature effect

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Assunção Cirne Pacheco

M^a da Assunção de Almeida Mendes Cirne Pacheco

8 de fevereiro de 2020

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Empresa	2
1.3	Contributos do autor para o Trabalho	3
1.4	Organização da Tese	4
2	Contexto e Estado da Arte	5
2.1	Contextualização do sector de conservas de pescado.....	5
2.2	Processo de produção de conservas de pescado.....	7
2.3	Perigos nas conservas de pescado	10
2.3.1	Perigos Físicos.....	11
2.3.2	Perigos biológicos.....	11
2.3.3	Perigos Químicos.....	12
	Histamina	12
2.4	Controlo de Qualidade	15
3	Materiais e Métodos	18
3.1	Sistema HACCP para Identificação de Perigos	18
3.2	Determinação do teor de histamina	20
3.2.1	Reagentes e Materiais	20
3.2.2	Seleção das amostras e preparação da amostragem.....	20
3.2.3	Avaliação do teor de histamina por testes enzimáticos	23
3.2.4	Validação da metodologia analítica utilizada.....	25
4	Resultados e Discussão.....	27
4.1	Análise de Perigos e avaliação de riscos.....	27
4.2	Avaliação do método de determinação de histamina	30
4.3	Comparação da evolução de concentração de histamina após diferentes etapas do processo	32

4.4	Comparação da evolução de concentração de histamina de todas as amostras à temperatura ambiente, intermédia e de refrigeração	40
5	Conclusões	44
6	Avaliação do trabalho realizado.....	47
6.1	Objetivos Realizados	47
6.2	Apreciação Final	47
7	Referências	48
	Anexo A - <i>Preparação da solução spike e da solução para o controlo de recuperação</i> ..	51
	Apêndice A - <i>Esquema do processo de produção do pescado estudado</i>	52
	Apêndice B - Características das <i>matérias-primas</i>	55
	Apêndice C - <i>Obtenção da reta de Calibração para a determinação da concentração de histamina</i>	56
	Apêndice D - Resultados dos ensaios de precisão intermédia.....	58
	Apêndice E - Níveis de histamina obtidos para os diferentes tipos de pescado	59

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Quantidades produzidas de produtos “congelados”, “secos e salgados” e “Preparações e conservas” pela Indústria transformadora de Pescado (Retirado de INE, 2018).....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2: (A) Variação do valor das vendas referentes entre 2016 e 2017; (B) Fração mássica das vendas referentes entre 2016 e 2017 (Retirado de INE, 2018)</i>	<i>6</i>
<i>Figura 3: Síntese de histamina através de reação de descarboxilação (Adaptado de Comas-Basté et al, 2019).....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4: Probabilidade versus Severidade das ocorrências (retirado: Monraia et al., 2006)</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5: Esquema resumo da recolha da amostragem de sardinha, cavala e carapau durante o processo</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6: Esquema resumo da recolha da amostragem de atum como matéria-prima</i>	<i>23</i>
<i>Figura 7: Reação nos micropoços na presença de histamina (Adaptado de Yamaguchi et al., 2018)....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8: Coloração da solução na ausência (transparente) e presença de histamina (amarelo)</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9: Reta de calibração para determinação da concentração de histamina, utilizando um teste enzimático.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 10: Evolução da concentração de histamina nos Peixes Frescos após os processos de salmoura e cozedura.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 11: Evolução da concentração de histamina nos peixes congelados após os processos de salmoura e cozedura</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12: Evolução da concentração de histamina no atum e seus derivados</i>	<i>38</i>
<i>Figura 13: Evolução na concentração de histamina na cavala cozida congelada</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14: Evolução da concentração de histamina dos vários tipos de pescado em função da temperatura de armazenamento após o processo de salmoura.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 15: Evolução da concentração de histamina dos vários tipos de pescado em função da temperatura de armazenamento após o processo de cozedura</i>	<i>43</i>
<i>Figura 16: Evolução da concentração de histamina à temperatura ambiente após o processo de salmoura ao longo de um dia laboral</i>	<i>43</i>
<i>Figura 17: Esquema do processo de produção de peixe fresco</i>	<i>52</i>
<i>Figura 18: Esquema do processo de produção do peixe congelado</i>	<i>53</i>
<i>Figura 19: Esquema do processo de produção do Peixe Refrigerado (lombos e Migas refrigeradas)</i>	<i>54</i>
<i>Figura 20: Curva de calibração obtida através dos padrões do kit enzimático pelo software RIDASOFT® Win.NET.Ink</i>	<i>57</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Identificação de alguns dos Perigos físicos, biológicos e químicos (Mil-Homens, 2007).....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 2: Espécies de peixe analisadas</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 3: Identificação de Perigos nas matérias-primas.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 4: Avaliação de Risco das matérias-primas.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 5: Parâmetros de avaliação da reta de calibração para a determinação da concentração de histamina.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 6: Cálculos para avaliação da precisão</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 7: Ensaios de Recuperação em triplicado para cada uma das matérias-primas</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 8: Características das espécies estudadas.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 9: Leitura em duplicado das seis soluções-padrão</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 10: Elaboração da reta de calibração</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 11: Ensaios de precisão recorrendo à utilização das soluções-padrão fornecidas pelo kit.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 12: Ensaios de precisão recorrendo à utilização da solução spike fornecidas pelo kit</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 13: Ensaios para a determinação do teor de histamina no carapau fresco.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 14: Ensaios para a determinação o teor de histamina na sardinha fresca de PT</i>	<i>60</i>
<i>Tabela 15: Ensaios para a determinação do teor de histamina na sardinha fresca de ES.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 16: Ensaios para a determinação do teor de histamina na Cavala congelada.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 17: Ensaios para a determinação do teor de histamina no atum</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 18: Ensaios para a determinação do teor de histamina na cavala cozida congelada</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 19: Ensaios para a determinação do teor de histamina na sardinha congelada CE</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 20: Ensaios para a determinação do teor de histamina na sardinha</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 21: Ensaios a determinação do teor de histamina no carapau congelado</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 22: Ensaios para a determinação do teor de histamina nos lombos refrigerados</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 23: Ensaios para a determinação do teor de histamina nas migas refrigerados.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 24: Ensaios para a determinação do teor de histamina nos lombos congelados.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 25: Ensaios para determinar o teor de histamina nas migas congelados</i>	<i>77</i>

Notação e Glossário

A	Absorvância	
c	Concentração	$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
CV	Coeficiente de variação	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
M	Massa	%
R	Coeficiente de correlação	mg
R%	Recuperação	%
Sa	Desvio padrão do declive	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Sb	Desvio padrão da ordenada da origem	
T	Temperatura	°C
V	Volume	mL

Lista de Siglas

ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
B	Biológico
CE	Comunidade Europeia
CH	China
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ES	Espanha
ETAR	Estação e tratamento de águas residuais
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
FSAI	<i>Food Safety Authority of Ireland</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GC	<i>Cromatografia gasosa</i>
HACCP	<i>Hazards Analysis and Critical Control Points</i>
HDH	<i>Histamina Desidrogenase</i>
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência
LC	Cromatografia líquida
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
MAR	Marrocos
PCC	Pontos críticos de controlo
PT	Portugal
Q	Químico
T _{amb}	Temperatura ambiente
T _i	Temperatura Intermédia
T _{ref}	Temperatura de Refrigeração
TLC	Cromatografia em camada fina
UV	Ultravioleta
WST-1	Sal de tetrazólio

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O crescente consumo de peixe e frutos do mar em todo o mundo impulsionou o crescimento do mercado global de conservas (Technavio, 2017). De facto, o estilo de vida apressado, característico da era moderna, estimulou a popularidade do conceito de produtos alimentares “open & eat”, o que também conduziu ao crescimento acentuado deste tipo de mercado (Marketers Media, 2019).

De acordo com o “Supermarket News”, espera-se que o mercado global das conservas de peixe atinja os 36,7 mil milhões de dólares até 2021, em oposição aos 29,8 mil milhões de dólares verificados em 2016, prevendo-se assim um aumento de cerca de 23 % (Krader, 2019). Os países europeus apresentam um consumo anual de peixe superior à média mundial, totalizando aproximadamente 23 kg *per capita* - cerca de 20 % dos quais é peixe enlatado (Josupeit, 2016; CBI, 2019). Tal está relacionado com o facto de os alimentos em questão serem constituídos por peixe oriundo de operações de pesca locais, principalmente anchovas, sardinhas e atum. De facto, o peixe tem especial relevo na alimentação da população dos países europeus (Krader, 2019).

O sector de processamento do peixe enlatado está especialmente concentrado no sul da Europa, em Espanha, Itália, França e Portugal. Espanha lidera a produção de peixe enlatado, contando com empresas como a Jealsa, Frinsa e Grupo Calvo (CBI, 2019). A nível nacional, no subsector de “preparações e conservas” da Indústria Transformadora da Pesca e Aquicultura, atingiu-se em 2017 uma produção total de cerca de 59 mil toneladas - mais 7 mil toneladas que em 2016 correspondendo a 22,4 % dos processados de peixe. As conservas de atum e sardinha lideram este subsector com produções que correspondem, respetivamente, a cerca de 38,3 % (32,8 % em 2016) e de 15,3 % (22,1 % em 2016) da produção nacional de conservas. Esta indústria faturou 1 022 milhões de euros (28,8 % correspondente a conservas), mais 1,6 % relativamente aos resultados de 2017 (INE, 2018).

De modo a que o subsector “preparações e conservas” continue a desenvolver-se, é necessário garantir que o produto final satisfaça as especificações regulamentadas e corresponda às expectativas do consumidor. Para tal, é fundamental que haja um controlo rigoroso da qualidade dos produtos, durante todas as fases do processo.

Assim, é essencial avaliar os potenciais riscos biológicos, físicos e/ou químicos a que o pescado possa estar sujeito durante o seu processamento, a fim de determinar os que representam maior perigo, em termos de contaminação do produto final. O perigo que foi abordado ao longo

da presente dissertação, reconhecido como um dos maiores fatores de risco neste sector e unidade fabril, foi a histamina, pois se ingerida através de alimentos, pode produzir efeitos adversos na saúde (Comas-Basté *et al.*, 2019). A histamina é uma amina biogénica produzida quando bactérias naturalmente presentes na pele, guelras e também intestinos de peixes atuam sobre a histidina, presente em elevadas concentrações no músculo de certas espécies (e.g. cavala, sardinha, atum) (Hariri *et al.*, 2018). A sua produção está diretamente relacionada com o manuseio e processamento incorreto dos alimentos, nomeadamente o armazenamento a temperaturas incorretas (Souza *et al.*, 2015).

A presente dissertação pretende estudar a evolução dos níveis de histamina ao longo das várias etapas que constituem o processo de produção de conservas de pescado, avaliando os riscos associados. Esta informação será essencial para perceber se as condições atualmente estabelecidas pela empresa, nomeadamente temperaturas e tempos de armazenamento, são as mais adequadas para evitar o aumento dos níveis de histamina no pescado. Consequentemente, será também objeto de estudo deste trabalho a identificação de possíveis oportunidades de melhoria ao nível das etapas de refrigeração, cozedura e armazenamento. Para tal, foi definida uma metodologia para recolha de amostras de diferentes espécies de pescado (cavala, sardinha, carapau e atum) ao longo do processo de produção das conservas, tendo as análises aos níveis de histamina sido realizadas recorrendo a testes enzimáticos.

1.2 Apresentação da Empresa

“A Poveira” é uma das mais antigas fábricas de conservas de pescado em Portugal. Foi fundada em 1938 na Póvoa de Varzim.

Com o início da II Guerra Mundial, em 1945, observou-se um enorme crescimento no setor conserveiro devido à necessidade de abastecimento dos exércitos. De facto, as conservas ofereciam uma elevada vantagem porque permitiam distribuir aos soldados rações com elevado período de conservação e de reduzido volume e peso, o que lhes garantiria vários dias de autonomia alimentar, contribuindo para o seu bom desempenho nas missões bélicas. “A Poveira” foi uma das beneficiárias desta conjuntura. Contudo, com o término da II Guerra houve uma diminuição nas exportações. Durante algumas décadas, a indústria conserveira entrou em declínio e nos meados dos anos 80, com a adesão de Portugal à Comunidade Económica Europeia, a empresa teve de se adaptar à nova legislação imposta, nomeadamente a nível fitossanitário (A Poveira, 2018). A fábrica iniciou um processo de modernização em 2003, tendo na altura apenas 60 colaboradores. Em 2007, com o aumento das exportações e a necessidade de mão de obra, a empresa adquiriu a “Sardipova Produtos Alimentares, Lda.”, passando a laborar com um total de 120 trabalhadores. Em 2013, inaugurou uma nova unidade fabril com

melhores condições e com maior capacidade de produção, passando a empregar 145 trabalhadores (*dados fornecidos internamente*).

Hoje, “A Poveira” é uma conserveira de renome, apostando não só na qualidade das conservas Portuguesas, mas também na sustentabilidade. A empresa apresenta nove marcas - Minerva, Minerva Bio, Ala Arriba, Alva, Capitão Poveiro, Galeão, Lapa, Taby e Lés Célèbres D’Henri IV - e produz conservas e patês a partir de matérias-primas como o atum, a sardinha, a cavala, o bacalhau, o carapau e o salmão. Possui seis certificações - *British Retail Consortium (BRC) Global Standards* (certificação de segurança alimentar), *International Featured Standard - IFS* (certificação de segurança e qualidade de produtos e processos alimentares), *Kosher* (certificação de alimentos preparados segundo as leis judaicas), *Halal* (certificação de alimentos preparados segundo as leis islâmicas), *Dolphin Safe* (certificação que assegura que na pesca do atum os golfinhos não são capturados nem perseguidos) e *BIO* (Certificado do Modo de Produção Biológico). Está registada na *Food & Drug Administration (FDA)*, e possui também o Eco-rótulo azul do *Marine Stewardship Council (MSC)*, certificação que assegura o recurso exclusivo a produtos de uma pesca ambientalmente sustentável de que a pesca de cerco da sardinha é um bom exemplo (*A Poveira*, 2018). A empresa tem como principais mercados os Estados Unidos da América, Canadá, Áustria, Bélgica, França e Israel (*dados retirados de documentos internos*).

No ano 2018, “A Poveira” produziu cerca de 19 milhões de embalagens de conservas de atum, 15 milhões de conservas de sardinha, 1 milhão de conservas de cavala, 600 000 de conservas de bacalhau e 150 000 de conservas de outros pescados (*dados fornecidos internamente*). Atingiu nesse mesmo ano 24,1 milhões de euros de vendas e obteve um lucro de cerca de 24,1 mil euros. Em 2019, a “Frinsa”, líder ibérico do sector das conservas de peixe, comprou metade do capital da empresa, permitindo um investimento imediato nas linhas de produção e possibilitando um aumento do número de colaboradores. O objetivo, a médio prazo, segundo a Diretora da Conserveira, Sofia Brandão é “duplicar o volume de negócios e tornar-se na maior unidade portuguesa do sector” (Ferreira, 2019).

1.3 Contributos do autor para o Trabalho

O trabalho teve como objetivo determinar a evolução dos níveis de histamina durante a produção de conservas de pescado após o processo de salmoura e cozedura, de modo a estudar a durabilidade do peixe quando exposto a diferentes temperaturas. O estudo veio permitir a confirmação dos planos de ação implementados pelo departamento de qualidade da fábrica “A Poveira”, assim como, se necessário, auxiliar na tomada de decisões relativos a procedimentos não conformes relacionados com a histamina. Para além de ter sido comprovado que o valor limite estipulado, relativo à histamina, é adequado, foram estabelecidos limites de tempos e

temperatura para o caso de eventuais falhas no controlo de lotes e na produção. Estive, ainda, envolvida em diversas atividades do dia-a-dia da fábrica, como a receção do peixe, o controlo da matéria-prima e do produto acabado. Colaborei, também, com o departamento de inovação, no qual elaborei uma receita para uma nova conserva que será, possivelmente, comercializada.

1.4 Organização da Tese

A presente dissertação é constituída por seis capítulos. A sua organização e constituição são, de seguida, explicadas. O capítulo 1, intitulado “Enquadramento e Apresentação do Projeto” apresenta resumidamente o tema abordado, os seus objetivos e a empresa onde o estudo foi realizado. No capítulo 2, referente ao “Contexto e Estado da Arte” é explicada a problemática associada à contaminação dos alimentos com histamina e as consequências para o consumo humano. É descrito detalhadamente o processo de produção de conservas de pescado e elaborado um levantamento bibliográfico de vários métodos existentes para a determinação da histamina. São descritos os perigos encontrados na área alimentar, em específico, na área das conservas de pescado. Seguidamente, no capítulo 3, referente aos “Materiais e Métodos” são apresentadas as espécies de peixe a analisar, os planos de recolha de amostras, os materiais e considerações necessárias ao trabalho experimental. Nesse capítulo é também descrito o método utilizado para determinar os níveis de concentração de histamina nas amostras de pescado. Relativamente ao capítulo 4, “Resultados e Discussão” são apresentados os quadros de avaliação de risco e identificados os perigos no processo, são expostos os resultados obtidos e a sua análise. No capítulo 5, “Conclusões” são descritas as conclusões do trabalho desenvolvido, de acordo com os resultados expostos no capítulo anterior. Por último, o capítulo 6, intitulado “Avaliação do trabalho realizado” contém uma reflexão crítica do trabalho realizado durante a dissertação.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Contextualização do sector de conservas de pescado

Uma alimentação saudável e equilibrada é uma das formas mais eficazes e menos dispendiosas de prevenir várias doenças, pelo que nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação com a ingestão de alimentos frescos, nutritivos e saudáveis. Praticamente todos esses alimentos são comumente consumidos frescos ou enlatados (Comerford, 2015). Recentes pesquisas divulgaram que as conservas de alimentos são nutricionalmente comparáveis aos alimentos frescos (Bragadeste, 2019). Esta indústria deverá atingir os 105 mil milhões de dólares até 2021, apresentando uma taxa de crescimento global composta de 3,8% (*Food Executive*, 2017). Este crescimento do mercado é impulsionado pelos agitados estilos de vida do mundo moderno que requerem produtos práticos, pela gradual preferência dos consumidores por alimentos de conveniência e pela crescente preocupação com a segurança que exigem produtos com longa vida útil. Atualmente, o mercado dos alimentos enlatados é dominado pela Europa, seguido pela América do Norte. Mudanças nos hábitos alimentares conjuntamente com o aumento da população impulsionam também o crescimento da indústria de conservas noutros países, destacando-se a Índia e a China (*Food Executive*, 2017).

No sector das conservas, o segmento de peixe e marisco é o que mais tem crescido dada a elevada procura de produtos oriundos de fontes sustentáveis e de adequado valor económico (*Food Executive*, 2017). Em Portugal, o consumo anual *per capita* de pescado é de 61,5 kg, o que faz do país o terceiro da união europeia com maior consumo. A nível mundial, é ultrapassado pela Coreia (78,5 kg) e pela Noruega (66,6 kg) (ACOPE, 2018) .

Em geral o peixe é um alimento com baixo teor de gordura e rico em proteínas e é tradicionalmente visto como um alimento essencial para uma dieta equilibrada e saudável. Tanto o peixe fresco como o peixe congelado contêm níveis úteis de micronutrientes, mas há uma falta de clareza sobre como o armazenamento do produto afeta a composição nutricional. Os principais micronutrientes fornecidos pelos peixes são os minerais, fósforo, selénio, potássio, iodo, zinco e magnésio (Ruxton, 2011). A ingestão de peixe sob a forma de conservas é uma boa opção para incluir este alimento tão nutritivo na alimentação diária (Healthy Food Guide, 2019).

No que se refere a estatísticas mundiais e europeias sobre o consumo e venda de conservas de pescado, não foi encontrado nenhum documento disponível; apenas foi possível consultar estatísticas referentes às produções e vendas a nível nacional. As quantidades produzidas pela indústria transformadora de pescado no ano de 2017 são apresentadas na Figura 1. O volume

total produzido decresceu cerca de 2,6% em relação ao ano anterior. Em contrapartida, o setor de “preparações e conservas” aumentou 13,3% (INE, 2018).

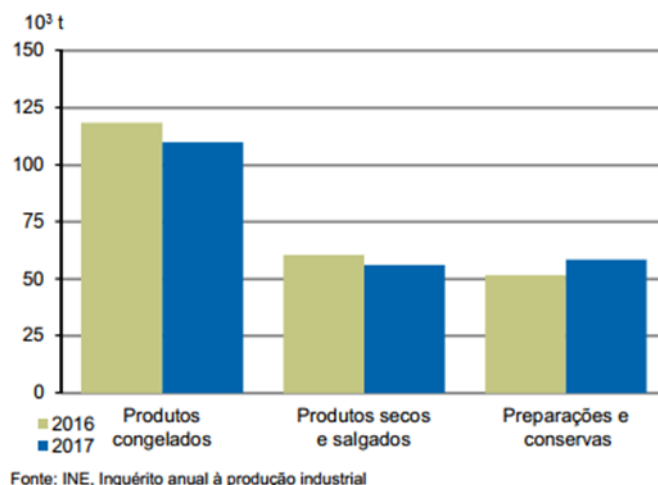


Figura 1: Quantidades produzidas de produtos “congelados”, “secos e salgados” e “Preparações e conservas” pela Indústria transformadora de Pescado (Retirado de INE, 2018)

Relativamente às vendas dos produtos de pescado, no ano de 2017 houve um aumento de 1,6% relativamente ao ano de 2016 devido à valorização dos “congelados” e das “preparações e conservas” (Figura 2). Este aumento traduziu-se em acréscimos do valor de vendas de 18 e de 28 milhões de euros, respetivamente (INE, 2018).

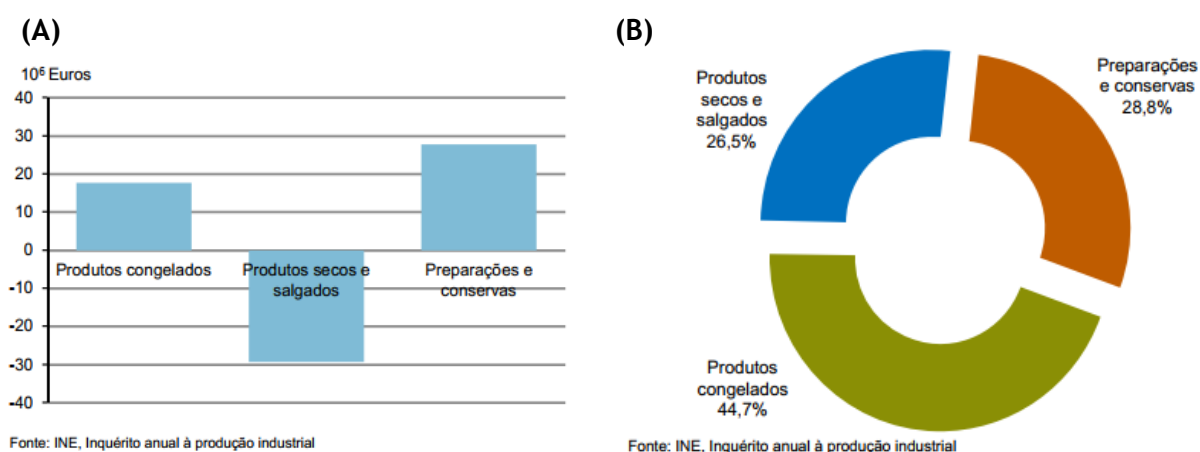


Figura 2: (A) Variação do valor das vendas referentes entre 2016 e 2017; (B) Fração mássica das vendas referentes entre 2016 e 2017 (Retirado de INE, 2018)

Assim, as vendas por setor em 2017 foram alteradas face ao ano anterior. As “preparações e conservas” subiram para segundo lugar com 28,8 % do total de vendas (26,5 % em 2016)

relegando para a terceira posição os “secos e salgados”. “Produtos congelados” continuou a ser o setor principal no negócio, originando o maior volume de vendas (INE, 2018).

2.2 Processo de produção de conservas de pescado

O processo de produção de conservas foi introduzido há cerca de 200 anos e tem sido um dos principais meios de preservação de alimentos, juntamente com a refrigeração e a congelação. O conceito de conservas de alimentos começou no final do século XVIII em França, quando Nicholas Appert descobriu que a aplicação de calor aos alimentos num recipiente de vidro selado evitava a deterioração dos mesmos. Mais tarde, foram desenvolvidos métodos de conservação que se baseavam no isolamento dos alimentos em recipientes de estanho. Esta ideia foi aproveitada e melhorada por Bryan Dorkin e John Hall, que instalaram a primeira fábrica de conservas comerciais em Inglaterra (Vergara-Balderas, 2016). Alguns anos mais tarde, Louis Pasteur demonstrou que os microrganismos eram responsáveis pela deterioração dos alimentos, reforçando a importância do enlatamento (Vergara-Balderas, 2016). Gradualmente, a produção de conservas tornou-se mecanizada e o enlatamento foi sendo aprimorado de forma a destruir os microrganismos patogénicos sem danificar o conteúdo e impedir novamente a sua contaminação (Vergara-Balderas, 2016). Atualmente o processo de produção de conservas, dependendo do peixe usado como matéria prima, pode englobar até 11 etapas: receção, congelamento/armazenamento, descongelamento, salmoura, preparação, cozedura, enlatamento, cravação, esterilização, embalagem e expedição.

Receção

A qualidade e o prazo de validade das conservas dependem da frescura do peixe utilizado na sua produção e do grau de manuseio no momento de captura (Wych, 1994; Moody, 2003). De facto, muitas vezes, o pescado desembarca dos navios de pesca para um armazenamento temporário ou para um transporte que os leva até às fábricas de processamento (Moody, 2003). Nas fábricas, este pode ser rececionado de diferentes formas (inteiro, eviscerado, fresco, refrigerado ou até congelado) e com diferentes tamanhos, dependendo da sazonalidade das recolhas, e do tempo e da distância a que se encontra do seu destino final (Wych, 1994; Corey, 1998; Moody, 2003).

Congelamento/Armazenamento

Quando o pescado é fresco, o seu prazo de validade é relativamente curto e fortemente dependente da sua qualidade e das condições de armazenamento. Para se obter uma vida útil máxima, o peixe deve ser armazenado a temperaturas próximas do ponto de congelamento da água (0 °C) (Moody, 2003). A essa temperatura, a carne não congelará, mas as atividades

bacterianas e enzimáticas serão minimizadas (Moody, 2003). À medida que as temperaturas de armazenamento aumentam, as atividades podem aumentar significativamente, reduzindo drasticamente o prazo de validade.

De acordo com as necessidades de produção, o pescado fresco pode ser congelado. No entanto, nem todas as espécies de peixes são adequadas para congelamento como os peixes com elevado teor de gordura. Segundo Moody (2003), o peixe congelado não tem atividade microbiológica significativa, apenas atividade enzimática e para cessar essa atividade, o peixe deve ser mantido a temperaturas extremamente baixas. O mesmo autor refere ainda que pesquisas mostram que temperaturas de armazenamento na faixa de -23 a -29 °C são aceitáveis, pois não é economicamente viável recorrer a temperaturas mais baixas. Segundo o Decreto-Lei nº 37/2004, que estabelece as condições de comercialização de produtos da pesca e aquicultura congelados, ultracongelados e descongelados destinados à alimentação humana, os produtos congelados devem ser armazenados a uma temperatura estável de -18 °C ou inferior. Durante o processo de transporte admite-se uma temperatura máxima de 3 °C (Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas, 2004).

Descongelamento

Para que ocorra a descongelação do pescado, o peixe não deve ser exposto a um aumento excessivo de temperatura. Segundo o Decreto-Lei nº 375/98, a temperatura do peixe descongelado não deve ultrapassar a temperatura do gelo fundente (0 °C) (Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, 1998). Desta forma, com o auxílio de câmaras de refrigeração ou gelo, apenas deve ser assegurado que após o processo de descongelação a temperatura do peixe não excede os 5 °C (ASAE, 2017). A evolução da temperatura ao longo do tempo deve ser monitorizada com precaução, para haver um melhor controlo do desenvolvimento de microrganismos e de histamina (CODEX, 2004).

Salmoura

A salmoura tem como objetivo remover o lodo e sangue dos peixes, eliminando o risco de notas de sabor no produto final. Permite ainda firmar e branquear a carne, aumentar a adesão da pele, facilitando o manuseio do peixe, e salgar o peixe. Permite ainda aumentar o seu peso e melhorar o seu sabor. Este procedimento fornece controle e uniformidade (Wych, 1994; Featherstone, 2016).

Preparação

Nesta etapa são incluídas atividades de descabeçamento, evisceração e limpeza. Os peixes são eviscerados manualmente e, em alguns casos, as cabeças e as caudas são removidas, assim

como a espinha. De seguida, são lavados com água potável para remover os microrganismos patogénicos que se possam encontrar no sangue e, essencialmente, nos intestinos e na pele do peixe (Corey, 1998). Consoante o tipo de produto final pretendido as atividades de preparação podem variar.

Cozedura

Após a preparação, o peixe é cozido. O tempo de cozimento depende do tempo necessário para que o centro do peixe atinja a temperatura pretendida. A temperatura variará, não só dependendo do tamanho e do teor de gordura do peixe, mas também da concentração de sal e do uso de outros aditivos alimentares (Moody, 2003). O cozimento faz coagular as proteínas do peixe e liberta a água que se encontra nos seus tecidos, melhorando a aparência final. Após o cozimento o peixe está praticamente livre de microrganismos, de atividade bacteriana e enzimática (Tato e Martins, 2000). Contudo, durante o período de arrefecimento é possível o desenvolvimento de microrganismos que resistiram à cozedura, podendo causar deterioração do pescado, pelo que o produto pós-cozedura deve ser arrefecido e mantido em câmara de refrigeração até à sua utilização (Moody, 2003).

Enlatamento

Após o cozimento, as chapatas (redes que contêm o peixe) passam para a fase de enlatamento realizada manualmente por operários. Estes estão localizados em ambos os lados de um tapete transportador que se move lentamente com latas vazias e esterilizadas por vapor. Os operários descamam, tiram a pele (dependendo do produto final) e cortam o peixe de acordo com o modo de embalamento (Wych, 1994). De seguida ocorre a adição de molho e eventualmente outros ingredientes adicionais, dependendo da especificação do produto final (Moody, 1996). Esta fase do processo do enlatamento é automatizada, tendo apenas um operador responsável pelo controlo do peso e pela monitorização do enchimento das latas (Wych, 1994).

Cravação

As latas que vêm no tapete, após a adição do molho entram na cravadeira. A cravação é a operação na qual se une mecanicamente o tampo e o corpo da lata, de modo a obter uma embalagem hermeticamente fechada. A vedação hermética é essencial para manter a integridade do produto durante todo o processamento. Os vazamentos causam deterioração e comprometem a segurança do produto (Moody, 2003). Como as conservas de peixe são alimentos com baixo teor de acidez, isto é, com pH superior a 4,6 existe um maior crescimento de microrganismos (Vergara-Balderas, 2016). Assim, após este procedimento, as latas seguem para o processo de esterilização (Moody, 2003).

Esterilização

A esterilização é o procedimento de expor as latas, já hermeticamente fechadas a elevadas temperaturas de forma a destruir microrganismos patogénicos e esporos bacterianos (Vergara-Balderas, 2016). As latas são esterilizadas num autoclave, usando vapor sob pressão (Moody, 1996). O nível de calor aplicado a um alimento depende de vários fatores que afetam a sua composição (a sua acidez, densidade, composição e resistência à transferência de calor), assim como o tempo do processo depende do tamanho da lata, da temperatura inicial do peixe no momento do processamento e da temperatura interna do autoclave. (Moody, 2003; Vergara-Balderas, 2016). Posteriormente, as latas são arrefecidas com água potável para parar a cozedura do produto (Wych, 1994). Os processos térmicos devem ser otimizados para garantir a obtenção de produtos estáveis, seguros e com adequadas características sensoriais e nutricionais (Vergara-Balderas, 2016).

Rotulagem/Armazenamento e expedição

Após o arrefecimento das latas, os carros de esterilização seguem para o armazém onde as latas são acondicionadas em caixas de cartão e armazenadas até à sua expedição ou podem seguir diretamente para o embalamento. O processo de rotulação e embalamento é automatizado (Corey, 1998). Após o embalamento, de acordo com as encomendas, o produto é expedido. As conservas são comumente destinadas a longos períodos de armazenamento à temperatura ambiente, pelo que os seus recipientes devem ser mantidos secos.

2.3 Perigos nas conservas de pescado

Todos os intervenientes no fabrico alimentar têm de garantir que o alimento, na produção do qual estão envolvidos, não causam danos a quem o ingere (FAO/OMS, 2003). Na área alimentar, o “perigo” pode ser causado por um *“agente biológico, químico ou físico presente no alimento, ou pela condição do alimento com capacidade para causar alterações à saúde humana”* (FAO/OMS, 2003). Segundo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), os perigos podem ser classificados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Identificação de alguns dos Perigos físicos, biológicos e químicos (Mil-Homens, 2007)

Perigos físicos	Perigos biológicos	Perigos químicos
Fragmentos de vidro; Metal; Plástico; Madeira; Pedras; Aglhas; Espinhas; Casca; Areia; Adornos; Qualquer material estranho que possam causar injúria ao consumidor	Bactérias; Vírus; Parasitas patogénicos	Pesticidas; Contaminantes inorgânicos tóxicos; Antibióticos promotores de crescimento; Aditivos alimentares tóxicos; Lubrificantes; Tintas; Toxinas do marisco; Histamina (pescado); Micotoxinas, dioxinas, nitrosaminas; Partículas dos materiais de embalagem

Os peixes e produtos derivados de peixe estão entre os alimentos mais perecíveis. A sua decomposição e deterioração começam imediatamente após a sua pesca, podendo apenas ser minimizadas com extremo cuidado e diligência por parte do pescador e do processador. As duas principais causas de deterioração nos peixes são microbiológicas e enzimáticas (Moody, 2003).

2.3.1 Perigos Físicos

Perigo físico pode ocorrer através de um objeto estranho que possa surgir num determinado género alimentício, que não faça parte do mesmo, e que cause dano físico ao consumidor. Os perigos físicos podem ter diversas origens, resultando normalmente de uma contaminação acidental devido aos meios mecânicos utilizados, de práticas incorretas de higiene dos manipuladores, da degradação das infraestruturas e equipamentos, ou da inexistência ou ineficácia de planos de higienização e controlo de pragas (Amaral e Oliveira, 2013).

2.3.2 Perigos biológicos

De um modo geral, as empresas do sector alimentar têm elevadas preocupações com as possíveis doenças de origem alimentar causadas por contaminação biológica (Veiga *et al.*, 2009). Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos (ASAE, 2005). São conhecidas mais de 250 bactérias, vírus e parasitas origem alimentar, que representam um perigo para o consumidor. Contudo, desses, apenas um número reduzido é encontrado com mais frequência (Veiga *et al.*, 2009). Os alimentos que apresentem um pH ácido ($\text{pH} < 4,6$) dificultam a proliferação de microrganismos patogénicos e, por isso, tratamentos térmicos leves (como a pasteurização) são suficientes para destruir os microrganismos nesses alimentos. No entanto, nos alimentos com baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$), os microrganismos patogénicos devem ser eliminados por esterilização durante o processo de conservação. Estes alimentos devem receber um processo térmico severo, sendo submetidos

sob pressão a elevadas temperaturas (cerca de 120 °C) durante longos períodos (Vergara-Balderas, 2016).

2.3.3 Perigos Químicos

O uso de compostos químicos aumentou drasticamente nos últimos anos devido ao desenvolvimento económico no sector da indústria, transportes e agricultura. Atualmente, são conhecidos mais de 10 milhões de compostos químicos, mas apenas cerca de 15 mil compostos foram sinalizados como potenciais causadores de efeitos adversos para a saúde (Veiga *et al.*, 2009).

De facto, os compostos químicos irão inevitavelmente surgir no meio ambiente através de descargas diretas (ex. descargas de processos industriais ou esgotos) ou indiretas (ex. descargas de efluentes das estações de tratamento de águas residuais) ou do processamento inadequado dos resíduos sólidos e subsequente lixiviação de aterros. Estes contaminantes podem ser absorvidos por plantas e animais, que ao serem consumidos por animais de níveis tróficos superiores serão, também, contaminados (biomagnificação). Deste modo, os alimentos são mais suscetíveis de ser contaminados por agentes químicos de diferentes origens ou fontes. O pescado está entre os alimentos com maior número de notificações de alerta relativos à presença de metais pesados (Veiga *et al.*, 2009). Contudo, são poucos os contaminantes químicos que estão presentes em concentrações suficientemente elevadas para representar um perigo para a saúde humana. O risco de intoxicação química aguda é muito baixo e somente a exposição prolongada a baixas concentrações de contaminantes pode estar associada a doenças graves (danos neurológicos, defeitos congénitos, atividade cancerígena, etc.) (FAO, 2003). Dentro desta classe de contaminantes estão incluídos os metais pesados, que têm vindo a ser detetados em órgãos e tecidos dos peixes (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008), bem como a histamina, objeto de estudo desta dissertação, e que será abordada mais pormenorizadamente.

Histamina

A preocupação com a qualidade do pescado é um tema recorrente, visto ser por um lado um alimento de alto valor nutricional e por outro um alimento perecível. Um dos fatores decorrentes da sua deterioração é a histamina (Souza *et al.*, 2015). A histamina ($C_5H_9N_3$) é uma amina biogénica, formada por descarboxilação enzimática bacteriana de aminoácidos. É classificada numa diamina heterocíclica com base na sua estrutura química e no número de grupos amina (Comas-Basté *et al.*, 2019). Esta amina é não volátil e termoestável (Al-badr e El-subbagh, 2001; Souza *et al.*, 2015; San Mauro Martin *et al.*, 2016; Hariri *et al.*, 2018).

O peixe é um alimento suscetível de conter elevados níveis de histamina por ser vulnerável à degradação microbiológica, na qual bactérias ativas podem apresentar capacidade

aminogénica. Os alimentos ricos em histidina livre são mais suscetíveis à acumulação de histamina. No pescado, a histamina é sintetizada por descarboxilação do seu aminoácido precursor - L-histidina - pela ação da enzima bacteriana L-histidina descarboxilase (Comas-Basté *et al.*, 2019) (Figura 3).

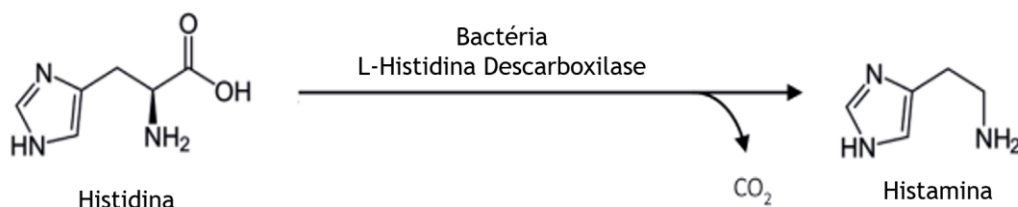


Figura 3: Síntese de histamina através de reação de descarboxilação (Adaptado de Comas-Basté *et al.*, 2019)

Primeiramente, acreditava-se que os peixes escombrídeos das famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae* (principalmente atum, cavala, bonito e sarda) eram os responsáveis pela intoxicação derivada à ingestão de histamina. No entanto, verificou-se o mesmo tipo de intoxicação após o consumo de peixes de outras famílias (Dalgaard *et al.*, 2008). De facto, algumas espécies de pescado são mais suscetíveis à formação de histamina devido à quantidade de histidina livre nelas existentes. Desta forma, entende-se por espécies formadoras de histamina as pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae* (ex. atum, cavala, sarda, sardinha e biqueirão) (Batista *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2015). Curiosamente, nenhum peixe de água doce parece causar esta intoxicação histamínica (Dalgaard *et al.*, 2008). Em Portugal, a sardinha, carapau e cavala perfazem cerca de 60 % do volume pescado - consequentemente, estas três espécies, juntamente com o atum, são o objeto do presente estudo (ACOPE, 2016)

As principais bactérias responsáveis pela descarboxilação da histidina são membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo também encontrada em algumas bactérias associadas ao peixe, como *Vibrio spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Photobacterium spp.* (Asae, 2012; Hariri *et al.*, 2018). Normalmente estes microrganismos estão presentes na flora microbiana dos peixes vivos de água salgada (brânquias, pele, vísceras e cavidade abdominal). No entanto, a maioria parece derivar da contaminação pós-captura a bordo de navios de pesca, do processo de distribuição ou o processamento (Lehane e Olley, 2000; Asae, 2012).

A concentração da amina nos alimentos depende da multiplicação das bactérias que produzem a enzima L-histidina descarboxilase, da ação destas e das condições favoráveis à sua atividade (San Mauro Martin *et al.*, 2016). A maioria das espécies de peixes suscetíveis à formação de histamina são capturadas em água morna ($T > 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após a captura, os peixes podem permanecer na água, em redes de cerco ou em palangres, o que poderá potenciar o aumento

da sua temperatura corporal. Assim, para evitar o início da sua deterioração, controlando a proliferação de bactérias e consequentemente a síntese de histamina, é essencial que o peixe seja rapidamente arrefecido após a sua captura, sendo introduzido em câmaras de refrigeração e mantido a condições de temperatura ($T \approx 0^{\circ}\text{C}$) e higiene adequadas (higienização periódica da embarcação, bom escoamento de água, controlo de pragas, utensílios de manuseio limpos e em bom estado de conservação) (Lehane e Olley, 2000; Batista *et al.*, 2015). Porém, este controlo deve ser efetuado durante todo o processo, principalmente no manuseio e armazenamento (Hariri *et al.*, 2018). Durante o processo de evisceração ou de filetagem, na ausência das boas práticas de higiene, a carne dos peixes pode ser diretamente exposta às bactérias produtoras da L-histidina descarboxilase, acelerando o processo de produção de histamina (Asae, 2012).

Esta amina é termoestável, isto é, estável a elevadas temperaturas. Já a enzima L-histidina descarboxilase pode ser inativada através da confeção. Contudo, a histamina existente não é eliminada, mantendo-se às temperaturas de refrigeração, congelação e de esterilização (Asae, 2012). Segundo Lenistea (1973), a histamina é apenas parcialmente destruída em conservas de sardinha (de ≈ 250 g) após 3 horas de aquecimento a 102°C ou 90 minutos a 116°C (Do Carmo *et al.*, 2010). Ou seja, uma vez formada, a histamina pode estar presente no pescado cru, cozido, congelado e até mesmo em conservas, sendo assim de grande perigo ao ser humano (Souza *et al.*, 2015).

Na literatura, é referido que a temperatura de armazenamento é um dos fatores mais importantes na prevenção da formação de histamina. Valores de temperatura entre os 25 e 30°C são favoráveis à atividade dos microrganismos histaminogénicos e entre 4 e 10°C ainda ocorre formação significativa de histamina. Somente o armazenamento próximo dos 0°C retarda a formação de histamina (Comas-Basté *et al.*, 2019).

O perigo da produção de histamina em pescado é intensificado pela sua característica de não volatilidade. Esta característica confere toxicidade ao produto antes deste ser considerado deteriorado ou sensorialmente inaceitável. Assim, o teor de histamina é considerado um critério de qualidade de pescado (Souza *et al.*, 2015). Em pessoas saudáveis, a diamina oxidase (DAO) degrada rapidamente a histamina, mas os consumidores com défice desta enzima podem desenvolver sintomas adversos. Contudo, geralmente, os sintomas são leves e frequentemente desaparecem após 24 horas (SIGHI, 2017; Hariri *et al.*, 2018). Embora os problemas de saúde associados ao consumo de histamina sejam bem conhecidos, existem algumas incertezas relativamente à concentração limite de ingestão desta amina. As concentrações de histamina consideradas como responsáveis por surtos de intoxicação são extremamente variáveis. De acordo com dados da União Europeia, o consumo de peixes e produtos de pesca estragados é a principal causa de surtos de intoxicação por histamina (Comas-Basté *et al.*, 2019). Desta forma,

segundo o Regulamento (CE) N° 2073/2005, o valor médio de histamina em produtos da pesca de espécies de peixes associadas a um elevado teor de histidina não deve exceder $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sendo que nenhum dos valores deverá exceder os $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Já em produtos da pesca que tenham sido submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura, fabricados a partir de espécies de peixe associadas a um elevado teor de histidina, o valor médio não deve exceder os $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sendo o limite máximo de $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Em relação ao mercado dos Estados Unidos da América, o limite é de $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (CE, 2005; FDA, 2011).

Salienta-se que teores elevados de histamina podem não ser acompanhados por outros sinais visíveis, como a deterioração do peixe, sendo indetetáveis por outros meios que não a análise química laboratorial (Asae, 2012). É necessário um rastreamento desde a sua colheita até ao consumidor final para auxiliar os produtores no controlo de qualidade (Souza *et al.*, 2015).

2.4 Controlo de Qualidade

Ao longo do capítulo anterior, foram mencionadas as etapas do processamento de conservas e alguns perigos alimentares, nomeadamente a contaminação por histamina. Contudo, para assegurar a boa qualidade das conservas de pescado, é ainda necessário monitorizar e controlar o cumprimento das especificações das matérias-primas e dos processos. Nesta sequência é indispensável abordar o Controlo de Qualidade.

O Controlo de Qualidade é o sistema responsável pela implementação e controlo das medidas de boas práticas (o conjunto de medidas adotadas, necessárias, para a segurança alimentar) de modo a retardar a deterioração dos produtos (Espejo-Hermes e Orejana, 1984). Este controlo permite determinar a ocorrência dos perigos nos géneros alimentícios, assim como a sua origem, permitindo a implementação de ações que previnem a sua ocorrência. Esta monitorização durante a receção e preparação dos alimentos, assim como a realização de auditorias aos fornecedores, são cruciais para a definição e manutenção das boas práticas (Amaral & Oliveira, 2013). Desta forma, pretende-se aumentar a qualidade dos produtos, minimizar as reclamações e aumentar a produtividade (FAO, 2001).

Como mencionado anteriormente, quando o peixe está sujeito a uma longa exposição a elevadas temperaturas durante o seu processamento fica suscetível à proliferação bacteriana e portanto à possível disseminação de histamina (Asae, 2012; Jakšić *et al.*, 2017). Uma vez que a histamina representa um risco para a segurança alimentar e, consequentemente, para a saúde é importante determinar com precisão o seu nível nos peixes (Altieri *et al.*, 2016). Os estados membros da União Europeia seguem planos nacionais de controlo para garantir a segurança dos alimentos e a verificação do cumprimento da legislação alimentar. Segundo o regulamento (CE) N° 2073/2005, mencionado anteriormente, os valores observados são considerados satisfatórios quando o valor médio de histamina de nove amostras representativas de um lote (amostragem

regulamentadas), ao serem analisadas pelo método de referência - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) - não excede o limite inferior de $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Para além deste requisito, apenas duas das nove amostras observadas podem estar situadas entre 100 e $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e nenhum dos valores obtidos pode exceder o limite máximo (CE, 2005). Porém, é reservada flexibilidade aos complexos fabris para, dentro dos parâmetros estabelecidos pelos regulamentos anteriormente mencionados, estabelecerem os seus requisitos e valores limites locais. Segundo Rogers e Staruszkiewicz (2000), os peixes de boa qualidade contêm um nível de histamina inferior a $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e um nível de $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ já é indicativo de uma significativa deterioração. Na unidade fabril “A Poveira” o valor considerado limite que obriga à realização de uma maior quantidade de análises ao lote, ou mesmo à sua eliminação, é de $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. O efeito da histamina na saúde humana é dependente da sensibilidade do organismo, no entanto a dose mencionada como crítica (quando administrada de forma oral) ronda os 100 e $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Jakšić *et al.*, 2017).

Foi reportado em vários estudos que a determinação analítica de aminas biogénicas não é simples devido à complexidade da maioria das matrizes a serem analisadas. A matriz de pescado pode conter variadas aminas (espermina, espermidina, tiramina, triptamina, cadaverina, putrescina e trimetilamina), não sendo possível muitas vezes alcançar a mesma taxa recuperação para todas elas. Muitas vezes são utilizados métodos cromatográficos para separar e detetar as aminas das matrizes alimentares, tais como, cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC). No entanto, a maioria das análises inclui uma etapa de derivatização que consome tempo no processo analítico (Lázaro de la Torre e Conte-Júnior, 2013). Esta etapa tem como objetivo converter histamina, através de uma reação química, num novo composto possuindo melhores propriedades cromatográficas, isto é, capacidade de absorver radiação ultravioleta ou de emitir fluorescência (Ribeiro e Volpato, 2005). Contudo, uma vez que as especificações do pescado devem ser determinadas no ato da inspeção, na seleção, pré-processamento e sempre que haja qualquer suspeita, é necessário o uso de testes laboratoriais simples, rápidos e baratos (FAO/OMS, 2003; Patange *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2016). Para a determinação do teor de histamina pode-se recorrer a testes enzimáticos, imunológicos (imunoenzimáticos) ou a métodos instrumentais de análise (Jakšić *et al.*, 2017). Os métodos instrumentais são usualmente mais sensíveis, versáteis e apropriados para análises mais frequentes, contudo nesses métodos são utilizados equipamentos mais complexos e de custo superior (Tyner e Francis, 2017). Geralmente, exigem também uma extensa pré-preparação das amostras (incluindo uma etapa de extração e pré-concentração). Dentro dos métodos instrumentais de análise que permitem a quantificação de aminas biogénicas como a histamina, destaca-se a cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) (Lázaro de la Torre e Conte-Júnior, 2013). Esta é uma técnica que permite separar, identificar e quantificar diversos componentes numa mistura. Embora seja a metodologia considerada de

referência para a análise desta amina biogénica (Jakšić *et al.*, 2017), esta requer o uso de equipamento e pessoal especializados, pois envolve procedimentos de análise complexos e elevado tempo de preparação, não sendo por isso o método mais adequado para a utilização em meio industrial, onde se requer métodos rápidos, simples e eficazes (Lázaro de la Torre e Conte-Júnior, 2013). Já os ensaios enzimáticos permitem a determinação quantitativa, que consiste na conversão do substrato num produto que absorve radiação na faixa do visível ou radiação UV (Jacobson e Dunbar, 2006). Por vezes estes ensaios são combinados com ensaios colorimétricos. Assim, na presença de um transportador de eletrões ocorre alteração de um corante adicionado (R-Biopharm, 2018). Os ensaios enzimáticos são simples e rápidos o que é uma vantagem requerida a nível industrial. Embora sejam testes confiáveis e precisos, especialmente para a determinação de concentrações críticas de histamina (100 - 200 mg·kg⁻¹), estes tendem a sobrestimar os níveis de histamina (Jakšić *et al.*, 2017).

Relativamente aos testes imunoenzimáticos (ex. métodos ELISA), estes são métodos muito sensíveis e específicos; necessitam, porém, de um processo de extração do analito, derivatização e períodos de incubação prolongados (Rogers e Staruszkiewicz, 2000).

De acordo com o Regulamento (CE) N° 853/2004, não é necessário utilizar nenhum método específico para a quantificação de histamina em géneros alimentícios de origem animal, apenas é necessário assegurar que não são excedidos os limites impostos pela legislação referida anteriormente (Parlamento Europeu, 2004). Desta forma, os métodos de triagem, rápidos, precisos e simples são os mais utilizados na indústria.

Pelas razões mencionadas anteriormente, e uma vez que o peixe é um alimento com alto risco de formação de histamina, é essencial um controlo rígido de todo o processo de produção de conservas de pescado através da implementação de técnicas de monitorização (Lázaro de la Torre e Conte-Júnior, 2013; Jakšić *et al.*, 2017). Deste modo, e no seguimento de um estudo de mestrado realizado anteriormente na “A Poveira” (Teixeira, 2019), a presente dissertação teve como principal objetivo determinar a evolução dos níveis de histamina no processo de produção de conservas de diferentes espécies de pescado, estudando especificamente temperaturas e tempos de armazenamento. Para este fim, as amostras foram incubadas as três diferentes temperaturas ao longo de oito dias.

3 Materiais e Métodos

3.1 Sistema HACCP para Identificação de Perigos

O sistema HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point* - permite identificar, avaliar e controlar os perigos mais significativos a que um alimento está sujeito, de modo a garantir a sua segurança. Este método tem como finalidade principal identificar os pontos críticos de controlo e implementar medidas para os atenuar ou mesmo eliminar (CODEX, 2004). O HACCP é uma ferramenta que permite elaborar sistemas focados na prevenção, ao invés da análise do produto final. O sistema deve ser aplicado, separadamente, a cada operação específica e a sua aplicação deve ser baseada em evidências científicas de riscos para a saúde humana ou efeitos adversos conhecidos (Hariri *et al.*, 2018). O método de HACCP é constituído por sete princípios ou etapas: (i) realização de uma análise de perigos, (ii) determinação dos pontos críticos de controlo (PCC), (iii) estabelecimento do(s) limite(s) crítico(s), (iv) estabelecimento de um sistema para monitorizar o controlo dos PCC, (v) definição da ação corretiva a ser adotada quando a monitorização indicar que um determinado PCC não está sob controlo, (vi) definição de procedimentos de verificação para confirmar que o sistema HACCP está a funcionar de forma eficaz, (vii) estabelecimento de um sistema de documentação de todos os procedimentos e os registos apropriados a esses princípios e à aplicação dos mesmos.

Decisões como a necessidade (ou a propriedade) de uma alteração às práticas estabelecidas durante o processo, assim como a fase do processamento em que esta deve ser implementada e o seu nível de precisão, devem ser baseadas numa avaliação de riscos assente na estrutura do Sistema HACCP. Deste modo, devem ser consideradas as diversas atividades e os múltiplos graus de riscos envolvidos na produção de alimentos.

Para assegurar o controlo e prevenção de não conformidades, “A Poveira” utiliza o método HACCP de modo a identificar os perigos que possam ocorrer durante o processamento do pescado e avaliar os riscos que os mesmos representam para a integridade do produto final. Desta forma, numa primeira etapa desta dissertação foi feita uma identificação dos principais perigos físicos, químicos e biológicos para o consumidor, de modo a determinar qual a problemática que deveria ser estudada. Assim, através da probabilidade e severidade, seguida de uma avaliação de risco, foi identificado o principal perigo a que o produto está sujeito durante o seu processamento, na conserveira “A Poveira”.

A metodologia adotada foi centrada no primeiro princípio do sistema HACCP, a “Análise de Perigos”. O princípio consiste em identificar, através da análise detalhada do processo industrial, potenciais perigos que devam ser evitados, reduzidos para níveis aceitáveis ou mesmo eliminados (Batista *et al.*, 2003; Veiga *et al.*, 2009). Intrínseco a esta análise de perigos

está a avaliação do respetivo risco, que consiste em avaliar em função da probabilidade, da severidade do perigo ocorrido e de possíveis medidas preventivas, a relevância dos perigos identificados. Uma vez que a severidade avalia o potencial de risco de um perigo para a saúde humana e a probabilidade avalia a frequência com que ocorre um dado incidente, esta é uma análise qualitativa baseada em dados epidemiológicos, dados locais, dados da empresa e na revisão bibliográfica. Deve assim ter-se em consideração as reclamações dos clientes, os resultados de análises laboratoriais, assim como devoluções e incidentes.

Após a realização do estudo foi elaborada uma tabela onde foram mencionados os perigos, as severidades, as probabilidades e as suas justificações. Como nem todos os perigos causam, com o mesmo impacto, efeitos adversos (ex. doenças ao consumidor), a severidade é classificada de acordo com três níveis: alta (3), média (2) e baixa (1). A primeira, causa efeitos graves para a saúde, podendo conduzir ao internamento ou até levar à morte; a segunda apresenta um menor grau de gravidade, podendo os seus efeitos ser suprimidos por atendimento médico, enquanto que as terceiras não passam de sintomas passageiros, indisposição e mal-estar. A probabilidade pressupõe uma análise estatística, mas os dados estatísticos nem sempre estão disponíveis. Desta forma, a distinção entre uma probabilidade alta (3), média (2) e baixa (1) foi definida com base nas ocorrências e conhecimentos da empresa, assim como em dados estatísticos. A Figura 4 representa uma forma de resumir os resultados obtidos e a indicação dos perigos. De acordo com a avaliação da probabilidade e severidade a zona a sombreado representa os perigos mais significativos, sendo que entre esses, o menor perigo é o de alta probabilidade e baixa severidade e o maior perigo o avaliado em alta probabilidade e severidade.

Probabilidade	Alta (3)			
	Média (2)			
	Baixa (1)			
		Baixa (1)	Média (2)	Alta (3)
		Severidade		

Figura 4: Probabilidade versus Severidade das ocorrências (retirado: Monraia et al., 2006)

3.2 Determinação do teor de histamina

O método utilizado pela empresa “A Poveira” para determinar quantitativamente a concentração de histamina nas amostras de pescado baseia-se num método enzimático seguido de análise colorimétrica, utilizando o *kit* comercial no formato de microplaca *RIDASCREEN® Histamine (enzymatic)* fabricado pela R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemanha) e fornecido pela Ambifood (Porto, Portugal). Neste teste, a enzima histamina desidrogenase catalisa a desaminação oxidativa da histamina. Esta reação, que ocorre na presença de um transportador de eletrões, converte o corante incorporado nos poços num produto de cor amarelada.

3.2.1 Reagentes e Materiais

O *Kit RIDASCREEN® Histamine (enzymatic)* inclui uma microplaca com 96 poços, seis soluções padrão de histamina (0, 1, 5, 10, 15 e 20 mg·L⁻¹), uma solução enzimática (enzima histamina desidrogenase), uma solução tampão e uma solução para ensaios de fortificação (500 mg·L⁻¹ de histamina).

As soluções padrão foram utilizadas para traçar a reta de calibração, para posteriormente determinar a concentração de histamina na amostra. Para a realização do teste é necessária, para além dos reagentes incluídos no *kit*, água destilada, sendo esta fornecida pelo destilador da ETAR da fábrica. Os materiais usados para a preparação e medição das amostras ao longo dos ensaios foram: (i) tubos cónicos de polipropileno com capacidade de 50 mL fornecidos pela LaborSpirit (Lisboa, Portugal), (ii) tubos cónicos de polipropileno com capacidade de 2 mL fornecidos pela VWR (Pensilvânia, Estado Unidos), (iii) uma balança de marca OHAUS, modelo NVT6401, com uma incerteza associada de $\pm 0,05$ g, (iv) uma centrífuga de marca VWR, modelo MicroStar12, (v) um banho termostático digital NAHITA®, modelo 601 com um sensor de alta precisão de ± 1 °C, (vi) pipetas monocal mecânicas de volume variável com capacidade entre 10-100 μ L e 100-1000 μ L fornecida pela VWR, (vii) uma pipeta repetitiva para volumes de 10 e 150 μ L, fornecida pela Ambifood (Porto, Portugal). Por fim, foi necessário um espectrofotómetro de placa com microtitulação (Stat Fax 4700) e um *software RIDASOFT® Win.NET.Ink* (versão 1.93) para processamento dos dados.

É importante chamar a atenção para o facto de o material utilizado na determinação da histamina ser de polipropileno, dado que a histamina adsorve nas superfícies de vidro.

3.2.2 Seleção das amostras e preparação da amostragem

Para a análise da evolução dos níveis de histaminas nas conservas, diferentes espécies de pescado foram selecionadas: sardinha (*Sardina pichardus*), cavala (*Scomber colias*), carapau (*Trachurus trachurus*) e atum (*Katsuwonus pelamis*). Porém, estas espécies de pescado foram rececionadas de diferentes formas (fresco, refrigerado, refrigerado cozido, congelado ou

congelado cozido). Para além disso, algum pescado chegou à fábrica inteiro ou descabeçado e eviscerado, e no caso do atum em forma de lombos e migas. A seleção de amostras encontra-se descrita em maior pormenor na Tabela 2.

Tabela 2: Espécies de peixe analisadas

Espécie	Tipo de conservação	Forma de apresentação	Origem
Sardinha	Fresco	Inteira	Portugal (PT)
			Espanha (ES)
	Congelado cru	Inteira	Comunidade Europeia (CE)
		Eviscerada e descabeçada	Marrocos (MAR)
Carapau	Fresco	Inteira	Portugal (PT)
	Congelado cru		Comunidade Europeia (CE)
Cavala	Congelado cru	Inteira	Comunidade Europeia (CE)
	Congelado cozido	Filetes	China (CH)
Atum	Congelado cozido	Lombos	La Gondola (provenientes de outra fábrica do grupo)
		Migas	
	Refrigerado cozido	Lombos	Comunidade Europeia (CE)
		Migas	

Todas as amostras congeladas utilizadas durante o presente trabalho foram recebidas durante o ano de 2019, tendo sido armazenadas em câmara de conservação ($T = -18 \pm 2^\circ \text{C}$) até ao momento da sua utilização. Já os peixes refrigerados, armazenados em câmara de refrigeração ($T = 3 \pm 1^\circ \text{C}$), e os frescos foram rececionados entre os meses de outubro 2019 e dezembro 2019 no complexo fabril “A Poveira”.

O estudo da evolução da concentração de histamina foi planeado de modo a iniciar o registo dos valores no dia em que o pescado entrava na fase de produção ($t=0$) e ao fim de 2, 6 e 8 dias. As amostras foram, durante esses dias, expostas à temperatura ambiente ($T = 25 \pm 5^\circ \text{C}$) e à temperatura de refrigeração. No caso da cavala, sardinha e carapau, após a entrada de uma espécie no processo foram retiradas 9 amostras após a etapa de salmoura e 9 amostra após a etapa de cozedura. Para além destas, foram recolhidas adicionalmente 54 amostras após as duas etapas, para expor à temperatura ambiente e à temperatura de refrigeração. Contudo, através da revisão bibliográfica e da observação dos primeiros dados obtidos, foi tomada a decisão de expor também as amostras a uma temperatura intermédia ($T_i = 10 \pm 2^\circ \text{C}$). Desta forma, passaram a ser retirados 81 peixes após os processos de salmoura e cozedura (Figura 5).

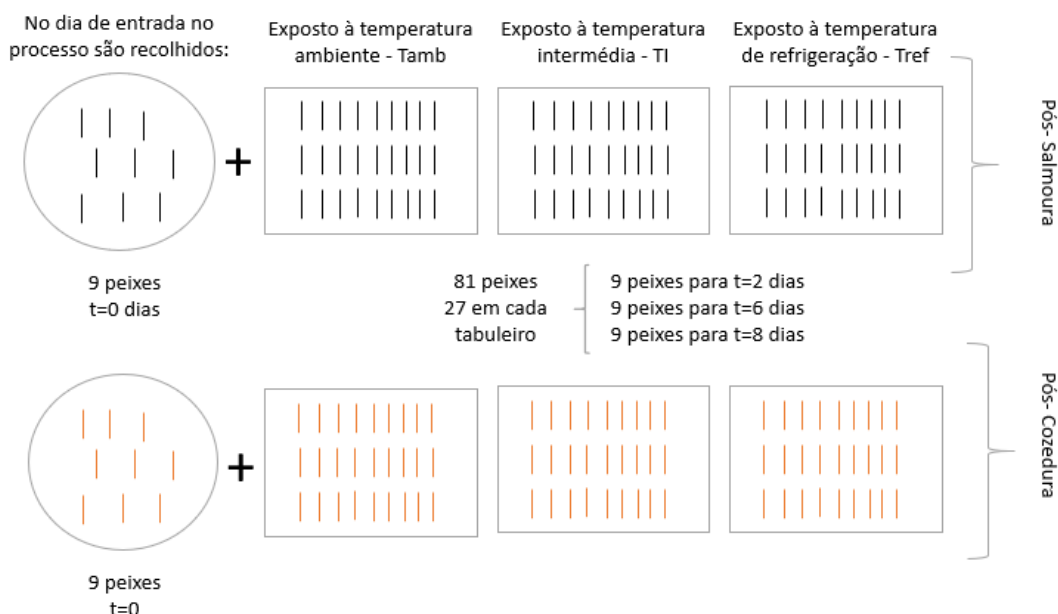


Figura 5: Esquema resumo da recolha da amostragem de sardinha, cavala e carapau durante o processo

De seguida, os tabuleiros, contendo 27 peixes cada, envolvidos em filme estirável transparente - para evitar contaminação cruzada - e com a devida identificação, foram colocados nos respetivos locais, de modo a manter a temperatura pretendida.

No caso do atum, os lombos e migas foram rececionados refrigerados e congelados. Parte dos lombos e migas refrigerados foram utilizados diretamente, sendo os restantes armazenados em câmara de refrigeração. Já os lombos e migas congelados foram armazenados em câmara de congelação para posterior utilização. Os lombos, após a receção, foram recolhidos em quantidades iguais à sardinha, cavala e carapau. Para a análise das migas foram recolhidas, aproximadamente 750 g, de diversos cestos para expor a cada temperatura mencionada anteriormente. A matéria-prima atum só é rececionada no complexo fabril “La Gondola” e sendo um peixe de maior tamanho, apenas foram recolhidas 24 e expostas 18 amostras de atum às referidas temperaturas (Figura 6).

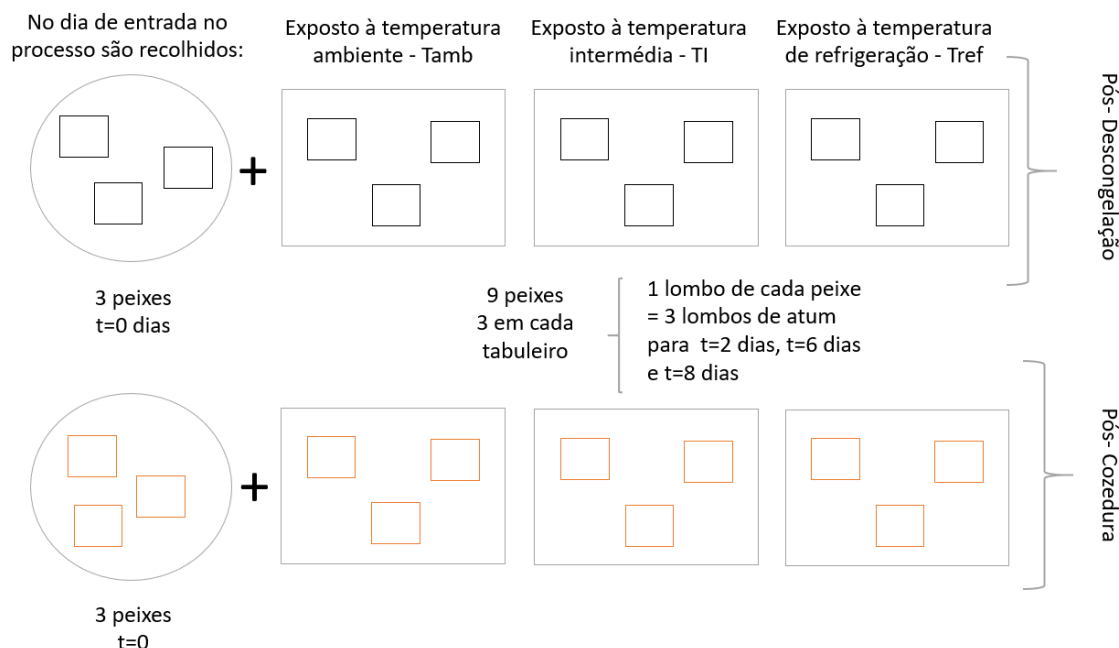


Figura 6: Esquema resumo da recolha da amostragem de atum como matéria-prima

3.2.3 Avaliação do teor de histamina por testes enzimáticos

Pré-preparação das amostras

No caso da cavala, sardinha e carapau cada ponto de amostragem foi constituído por nove peixes. O peixe é aberto de forma a retirar o lombo de carne próximo das vísceras. Após a extração dos lombos, estes são cortados em pedaços de 2 a 3 mm e misturados para tornar a amostra homogénea. No caso do atum, foram retirados 3 lombos de cada peixe exposto a cada temperatura de trabalho, seguindo-se o corte dos lombos em pequenos pedaços e a sua mistura. Nas migas foram recolhidas 250 g de cada tabuleiro.

Preparação dos extratos

Pesou-se 5 g de amostra homogeneizada para tubos cónicos de polipropileno com capacidade de 50 mL. De seguida foram adicionados 20 mL de água destilada, seguindo-se uma vigorosa e curta agitação, de modo a suspender a amostra. Esta foi incubada durante 20 minutos num banho a 100 °C, 10 minutos após o qual foi efetuada nova agitação, de modo a manter a amostra em suspensão. Após o período de incubação, os tubos foram deixados em repouso para arrefecerem até à temperatura ambiente. Após esta extração, 2 mL do sobrenadante foram recolhidos para um tubo cónico de polipropileno com capacidade de 2 mL e centrifugados durante 2 minutos a 12300 g numa microcentrífuga VWR Micro Star 12 (Leuven, 2015). O sobrenadante deve ser o mais claro possível, e, caso houvesse partículas em suspensão, estas eram filtradas com recurso a papel de filtro (90 mm Ø) Filter-Lab (Barcelona, Espanha). No caso

de ser detetada uma camada de gordura sobre o extrato, este foi retirado da camada inferior com uma pipeta de Pasteur, filtrado e centrifugado novamente.

Determinação quantitativa da concentração de histamina nos extratos de pescado

Após a centrifugação, pipetou-se 100 µL deste extrato para os micropoços da microplaca RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) e adicionou-se 150 µL da solução tampão contida no kit. Esta solução visa reduzir a interferência de outros componentes da amostra no ensaio. Agitou-se a microplaca cuidadosamente por 3 segundos e, após 3 minutos, foi feita a primeira leitura da absorvância (A1), utilizando o espectrofotômetro de microplacas ($\lambda = 450 \text{ nm}$). De seguida, a cada um dos poços adicionou-se 10 µL da solução enzimática. Seguiu-se uma agitação da placa manualmente por 3 segundos e após incubação de 10 minutos, o segundo valor de absorvância (A2) foi lido ao mesmo comprimento de onda de absorção (Figura 7).

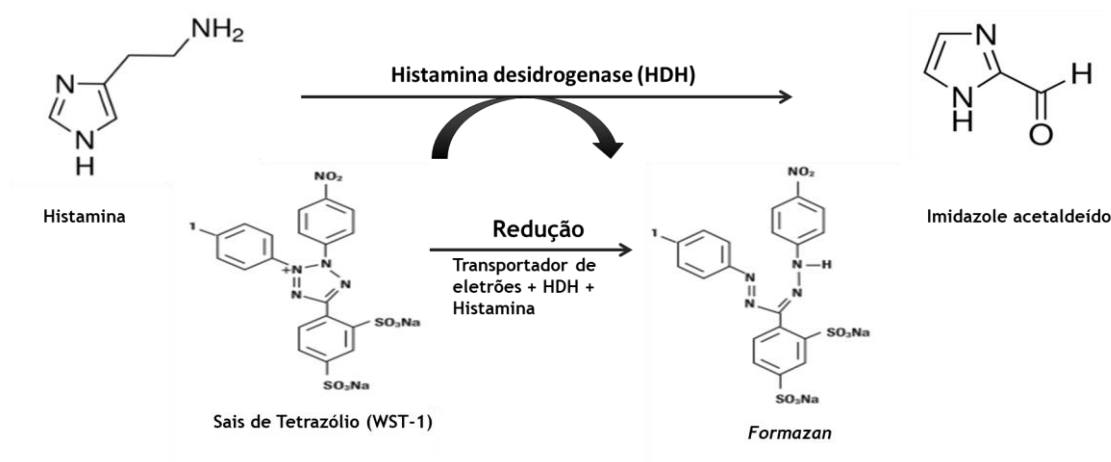


Figura 7: Reação nos micropoços na presença de histamina (Adaptado de Yamaguchi et al., 2018)

Embora não seja explicado no kit enzimático utilizado, pensa-se que os micropoços estão revestidos com uma fina camada de sais de tetrazólio (WST-1) e um transportador de elétrons (provavelmente *1-methoxy-5-methyl-phenazinium*, também conhecido por *1-methoxy PMS*). Assim, o sal de tetrazólio (WST-1) desenvolve a cor devido à transferência de elétrons (formação de WST-1 *formazan*), e a concentração de histamina é calculada medindo o aumento da absorvância a 450 nm. Como a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de histamina, a alteração da cor da solução indica a presença ou ausência desta (Figura 8).



Figura 8: Coloração da solução na ausência (transparente) e presença de histamina (amarelo)

A leitura da absorvância A2 é feita após a adição da enzima - esta vai permitir a conversão de histamina em imidazole acetaldeído e detetar a amina presente na amostra, pela transformação do WST-1 em WST-1 formazan. Desta forma, a diferença entre as absorvâncias A2 e A1 determina a quantidade de histamina presente nos extratos. De seguida, através da reta de calibração e multiplicando pelo fator de diluição obtém-se a sua concentração em $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Segundo o kit, dependendo do alimento em estudo, a histamina é lida numa gama diferente de valores. Para o peixe, e sendo o seu limite legal para a concentração de histamina de $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, é utilizado o fator 5, de modo a que o intervalo de valores se situe entre $2\text{-}100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3.2.4 Validação da metodologia analítica utilizada

De forma a certificar que os resultados obtidos ao longo do estudo são confiáveis, foram elaborados cálculos estatísticos clássicos (média e o desvio-padrão). Para validar a metodologia analítica utilizada foi traçada a reta de calibração e definida a gama de linearidade, determinado o limite de deteção e de quantificação, precisão e exatidão. A precisão foi avaliada através de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, e foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%). A exatidão foi avaliada através da determinação da recuperação (R%), usando o método de adição de padrão (ensaios em triplicado, fortificando com $500\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ numa amostra de cavala, sardinha, carapau e atum - $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Para os ensaios de repetibilidade foram lidos em duplicado os seis padrões do *kit* (0, 1, 5, 10, 15 e $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e semanalmente, foram também efetuadas leituras em duplicado de uma solução de controlo de $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ou de um dos padrões para os ensaios de precisão intermédia (Apêndice D). Tendo sido realizados 3 e 13 ensaios, respetivamente.

As leituras em triplicado dos valores de concentração de histamina do pescado apresentam elevada dispersão (Apêndice E). Contudo, uma vez que se recorreu aos métodos descritos, concluiu-se que estes valores não estão relacionados com falta de rigor da leitura das amostras por parte do espectrofotómetro - podem ser explicados pela distribuição não uniforme de histamina na carne do peixe e pelo manuseamento imperfeito por parte do operador. Apesar do extrato ser homogeneizado durante a sua preparação, os peixes que constituem a amostra, embora pertencentes ao mesmo lote, não estiveram sujeitos às mesmas condições no meio aquático. De facto, aquando da sua captura, as características de cada peixe podem variar de acordo com a sua idade, condições fisiológicas e morfológicas. Ainda, as condições iniciais de conservação de peixes capturados em conjunto não são iguais: o peixe junto à rede encontra-se a menor temperatura que o peixe no meio da rede.

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise de Perigos e avaliação de riscos

Como mencionado no capítulo 3, foi desenvolvido um estudo baseado no primeiro princípio do método HACCP - a realização de uma análise de perigos -, com o intuito de selecionar o maior perigo na indústria das conservas de peixe a ser estudado na presente dissertação. O pescado, desde a sua captura até à sua receção na unidade fabril, passa por vários processos e, consequentemente, por oscilações nas condições de preservação. Desde a receção da matéria prima na fábrica, os colaboradores prezam por proporcionar os cuidados e práticas necessárias de modo a evitar a sua degradação, pelo que matéria prima (no momento da receção) é o estado mais vulnerável em termos de exposição a doenças e parasitas.

Desta forma, o estudo foi centrado nos perigos associados ao pescado aquando da sua entrada na fábrica, fresco ou congelado, à exceção do atum (lombos e migas) que é rececionado cozido. Através da literatura, da comunicação com os colaboradores e em conjunto com o departamento de qualidade foram destacados os principais perigos químicos (Q) e biológicos (B) associados às matérias-primas (Tabela 3).

Tabela 3: Identificação de Perigos nas matérias-primas

Matérias-primas	Perigo Identificado	
Sardinha, Cavala e Carapau		
Metais Pesados	Q	Cádmio- Exposição alimentar ao cádmio, uma vez que os géneros alimentícios são a principal fonte de ingestão de cádmio pelos seres humanos (Comissão Europeia, 2014).
	Q	Mercúrio- O metilmercúrio é a forma química mais preocupante e pode constituir mais de 90 % do mercúrio total presente no peixe e no marisco (Comissão das Comunidades Europeias, 2006).
	Q	Chumbo - Apesar de não ser um elemento comum nas águas naturais é facilmente introduzido no meio ambiente por uma série de processos e produtos humanos. A principal exposição ao chumbo resulta do consumo alimentar (Comissão das Comunidades Europeias, 2006; Rocha, 2009).
Histamina	Q	Desenvolvimento de Histaminas, devido ao elevado teor de histidina (Comissão das Comunidades Europeias, 2007).
Bactérias	B	<i>Listeria</i> , <i>Bacillus (B.cereus)</i> , <i>Staphylococcus (S. aureus)</i> , <i>Vibrio (V. cholerae, V. parahaemolyticus,V. vulvinicus)</i> , <i>Salmonella spp</i> (Abreu, 2014).
Parasitas	B	Anisakis, são as espécies mais frequentemente envolvidas em casos de infeção em humanos causados por nemátodos, encontrados nos peixes (ASAE, 2005); <i>Diphyllobothrium</i> .
Atum cozido		No atum cozido os perigos são semelhantes aos mencionados nas matérias-primas anteriores, com exceção da ausência de parasitas e do tipo de bactérias predominantes.
Bactérias	Q	<i>Listeria</i> , bactéria patogénica particularmente perigosa e letal para pessoas com fraco sistema imunológico (Comission, 2018); <i>Staphylococcus (S.aureus)</i> .

Após a identificação dos perigos, foi elaborada a tabela de avaliação de risco (tabela 4) considerando a severidade e a probabilidade de cada um dos perigos mencionados, assim como, a justificação para eliminar cada perigo do estudo central da presente dissertação.

Tabela 4: Avaliação de Risco das matérias-primas

Avaliação de Risco				
Matéria-prima: Sardinha, Cavala e Carapau				
Perigo:	Severidade	Probabilidade	Total	Justificação:
Metais Pesados:				
Cádmio	1	1	1	Os limites admissíveis de metais pesados são pequenos, só são prejudiciais se se consumirem numa quantidade considerável (Comissão das Comunidades Europeias, 2006; Comissão Europeia, 2014).
Chumbo	1	1	1	
Mercúrio	1	1	1	
Histamina:				
	2	1	2	A formação de histaminas é controlada pelo tempo e temperatura das operações (Dalgaard <i>et al.</i> , 2008). Segundo o RASFF 2018, em Portugal não há relatos de contaminação por histamina nas matérias-primas mencionadas (Comission, 2018).
Parasitas:				
<i>Anisakis</i>	3	1	3	É eliminado na congelação, podendo ser eliminado por cozedura e posteriormente pela esterilização (Veiga <i>et al.</i> , 2009).
Bactérias:				
<i>Bacillus (B.cereus)</i>	1	1	1	As bactérias são eliminadas no processo de cozimento, exceto a <i>Listeria</i> . Esta última pode aparecer durante o processamento. O cumprimento das boas práticas de higiene e fabrico são indispensáveis para o seu controlo (Veiga <i>et al.</i> , 2009).
<i>Staphylococcus (S. aureus)</i>	1	1	1	
<i>Vibrio</i> <i>V. cholerae</i> <i>V.parahaemolyticus</i> <i>V. vulvinicus</i>	3	1	3	
<i>Salmonella spp.</i>	2	1	2	
<i>Listeria</i>	3	1	3	
Matéria-prima: Atum cozido				
Perigo:	Severidade	Probabilidade	Total	Justificação:
Bactérias:				
<i>Listeria</i>	3	1	3	A justificação para o risco da <i>Listeria</i> no atum cozido é a mesma que foi apresentada anteriormente para a sardinha, cavala e carapau.
<i>Staphylococcus (S. aureus)</i>	1	1	1	

Todos os dados apresentados foram discutidos com o departamento de qualidade; contudo, na perspectiva de reforçar a sua veracidade, os mesmos foram baseados em documentos oficiais e de referência. A informação relativa à severidade dos metais pesados foi recolhida dos regulamentos mencionados na Tabela 3, os valores apresentados para a severidade dos parasitas está assente no livro de classificação de risco dos agentes biológicos (Ministério da Saúde, 2017) e os dados acerca das bactérias, à exceção da *Listeria* (Comission, 2018) e da *Salmonella spp* (FDA, 2012), foram adaptados de uma tabela de referência da ASAE (Veiga *et al.*, 2009). No caso da histamina, o valor total referido - 2 - foi baseado na ausência de mortes devido a intoxicação (Escombroides)(FDA, 2012).

Pela observação das pontuações atribuídas na Tabela 4, apesar de a histamina representar uma pontuação total de 2, foi concluído que tanto a histamina como o parasita *Anisakis*, a bactéria *Vibrio* e *Listeria* podiam ser considerados perigos aquando do consumo de peixe. Contudo, o parasita *Anisakis* e a bactéria *Vibrio*, rapidamente foram excluídas. De facto, estes podem ser eliminados facilmente: o primeiro por cozedura a 60 °C ou por congelação durante 7 dias, e o segundo quando submetido a temperaturas superiores a 70 °C. Já a *Listeria* e a histamina necessitam de um maior controlo. Após o cozimento, a ausência da *Listeria* não é garantida, sendo fundamental o cumprimento de boas práticas de higiene e de fabrico, em especial no que se refere à contaminação cruzada. Por sua vez, a histamina presente nos alimentos não pode ser eliminada. Esta amina biogénica pode e deve ser controlada, mas através das bactérias e enzimas responsáveis pela sua formação. O processo de cozedura inativa as bactérias e as enzimas, mas se após este processo o peixe for submetido a elevadas temperaturas, este pode ser novamente contaminado. Quando o pescado é mantido a temperaturas de refrigeração e de congelação, a enzima permanece ativa, embora a velocidade da atividade enzimática diminua consideravelmente.

Na Tabela 4 é apresentada, também, a avaliação dos riscos no atum cozido. Os perigos são semelhantes aos mencionados nas matérias-primas anteriores, no entanto, como é cozido, os parasitas são eliminados e o tipo de bactérias predominantes variam. Nesta matéria-prima só a *Listeria* seria relevante. No entanto, com os cuidados mencionados anteriormente e medidas de controlo implementadas por parte do departamento de qualidade, esta não constituiria um caso de preocupação.

De facto, o fator determinante para a seleção da histamina como foco do presente estudo, foi terem surgido na fábrica, no passado, problemas relacionados com a sua presença, algo que nunca aconteceu com a *Listeria*.

4.2 Avaliação do método de determinação de histamina

Para elaborar a reta de calibração, assim como para avaliar a precisão recorreu-se à leitura em duplicado das soluções-padrão do kit (Apêndice C), assim como, por vezes, à leitura da solução *spike* e de uma das solução-padrão (Apêndice D).

Segundo o *Kit* da R-Biopharm, encontra-se linearidade numa gama entre 0 e 100 mg·kg⁻¹ (0-20 mg·L⁻¹) e, como tal, o limite de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) é de 0,75 mg·kg⁻¹ e 2 mg·kg⁻¹, respetivamente (R-Biopharm, 2019). A Figura 9 está representada a reta de calibração traçada para a determinação da concentração de histamina, utilizando um teste enzimático. Esta reta é obtida pela regressão linear entre o sinal instrumental - absorvância (variável dependente) e a concentração de histamina (variável independente), expressa em mg·L⁻¹.

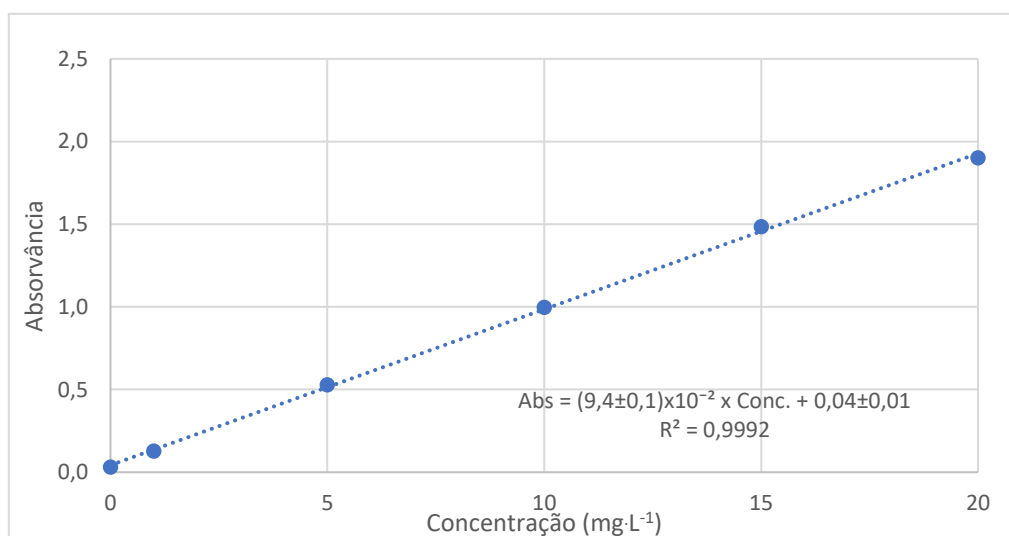


Figura 9: Reta de calibração para determinação da concentração de histamina, utilizando um teste enzimático.

Como se pode observar, a reta de calibração apresenta 6 pontos e a gama de concentrações estende-se ao longo de 20 mg·L⁻¹, apresentando, assim, um intervalo de linearidade adequado. A equação 1 representa a respetiva regressão linear, assim como os seus erros associados (desvio-padrão do declive - S_a e desvio padrão da ordenada na origem - S_b).

$$\text{Absorvância} = [(9,4 \pm 0,1) \times 10^{-2}] \text{Concentração} + (0,04 \pm 0,01) \quad (1)$$

Com o intuito de avaliar se a reta de calibração obtida é adequada, é necessário assegurar que, o desvio-padrão relativo do declive (S_a/a) é menor que 5%, a ordenada na origem contenha a própria origem ($b - S_b < 0 < b + S_b$), e que o coeficiente de correlação (R) seja superior a 0,995. A Tabela 5 contém os parâmetros determinados.

Tabela 5: Parâmetros de avaliação da reta de calibração para a determinação da concentração de histamina

Parâmetros	
Sa/a (%)	1,37
b-Sb	0,03
b+Sb	0,06
R	0,999

Como se pode verificar na Tabela 5, não é possível garantir que a ordenada na origem contém, efetivamente, o ponto (0;0), uma vez que $b-Sb > 0$. Este valor pode indicar a presença de interferências na leitura devido à homogeneização deficitária do substrato dos poços ou mesmo, devido a erros do operador. Contudo, a reta não foi rejeitada, uma vez que demonstrou ser adequada para o fim a que se destina.

A repetibilidade foi avaliada pelos ensaios em duplicado da diferença das absorvâncias das soluções padrão com enzima e sem enzima (Tabela 6).

Tabela 6: Cálculos para avaliação da precisão

Padrão (mg·L ⁻¹)	Desvio-Padrão	Coefficiente de Variação (%)
0	0,002	7,2
1	0,007	5,6
5	0,004	0,8
10	0,001	0,1
15	0,020	1,3
20	0,048	2,5

Em todos casos, os valores de coeficiente de variação são inferiores a 10 %, sendo o método considerado preciso.

Após a determinação da precisão, foram realizados ensaios de recuperação, em triplicado, às quatro matérias-primas utilizadas na fábrica “A Poveira” (sardinha, cavala, carapau e atum cozido) (Tabela 7), uma vez que os coeficientes de variação das análises efetuadas, em triplicado, à amostragem variaram numa gama de intervalo entre 0,3 e 131 % (Apêndice E).

Tabela 7: Ensaios de Recuperação em triplicado para cada uma das matérias-primas

Matéria-prima	Concentração de histamina inicial (mg·kg ⁻¹)	Concentração de histamina final (mg·kg ⁻¹)	Concentração de histamina esperada (mg·kg ⁻¹)	Recuperação (%)
Cavala	2,0	45,7	52,0	88±8
Sardinha	0,0	42,4	50,0	85±7
Carapau	0,0	41,7	50,0	83±3
Atum cozido	0,0	43,4	50,0	87±8

Os valores de recuperação estão dentro do intervalo descrito pelo fornecedor ($R = [85-105\%]$), o que comprova que o método para além de preciso, é também exato.

4.3 Comparação da evolução de concentração de histamina após diferentes etapas do processo

Como mencionado anteriormente, foi considerado expor as matérias-primas apenas a duas temperaturas diferentes. É por esta razão que o carapau fresco, tendo sido cronologicamente o primeiro peixe a ser estudado, foi exposto apenas às temperaturas ambiente ($T_{amb} = 25 \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$) e de refrigeração ($T_{ref} = 3 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$) como verificado na Figura 10A e A1. Os testes de histamina foram efetuados unicamente a estas temperaturas, e após estas duas análises, foi introduzida a exposição das amostras a uma terceira temperatura, designada de temperatura intermédia ($T_i = 10 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$).

Assim, nas Figuras 10 a 13 é representada a evolução da concentração de histamina às referidas três temperaturas de armazenamento, após o processo de salmoura e após o processo de cozedura. O atum, que não é sujeito ao processo de salmoura, é apresentado após o processo de descongelação e após o processo de cozedura. Já os lombos e as migas, uma vez que chegam ao recinto fabril cozidos, foram estudados e são apresentados apenas após o processo de refrigeração e congelação, dependendo do seu estado de conservação. Ainda, ao contrário das outras matérias-primas, que são pescadas nas zonas FAO 27 e 34, situadas no Oceano Atlântico, o atum é pescado nas zonas FAO 51 e 57, no Oceano Índico. A temperatura da água é mais baixa nas Zonas FAO 27 e 34.

Com o intuito de elaborar uma análise clara e estruturada, são apresentados, primeiramente, os resultados referentes ao peixe fresco (Figura 10). Estes são seguidos pelos peixes congelados (Figura 11), pelo atum e os seus derivados (Figura 12), e, por último, é exposta a cavala cozida congelada (Figura 13).

De notar que os gráficos apresentados têm os eixos numa escala igual, de 0-200 mg·kg⁻¹. Uma vez que os diferentes peixes estudados apresentam uma grande variação na concentração de histamina durante o período de ensaios, certas retas têm menos visibilidade. Esta mesma questão é também responsável pela dificuldade na visualização das linhas de desvio padrão em alguns gráficos.

É necessário reforçar que o estudo foi elaborado com uma matéria-prima muito heterogénea, pelo que algumas oscilações na evolução da concentração de histamina não têm qualquer justificação científica. Pode justificar-se pelas condições aquáticas a que estão submetidos os peixes (temperatura da água, microflora), condições físicas individuais, condições a que são sujeitos após a captura. Ainda, falhas na preparação das amostras e variações nas condições de armazenamento a que o pescado foi exposto, podem ter comprometido os valores, uma vez que o método de análise é sensível.

Como mencionado no capítulo 2, o aumento da histamina é mais acentuado a temperaturas mais elevadas (Comas-Basté *et al.*, 2019). Todos os gráficos apresentados nesta secção devem, portanto, ser discutidos tendo por base este facto.

Foram efetuadas análises ao peixe fresco em pelo menos três momentos distintos, contabilizados a partir do momento em que os mesmos entram na fábrica. O primeiro teste foi efetuado dois, três ou quatro dias após o recebimento, enquanto que o segundo foi efetuado sempre seis dias após o início do processo; por sua vez, o terceiro e último momento de análise foi oito ou dez dias após o início do processo. A variação do tempo decorrido até ao primeiro e terceiro momentos de análise explica-se pelo facto de a matéria-prima ser rececionada fresca, pelo que não é possível controlar a sua entrada na produção - com efeito, tal prende-se com o dia de pesca do peixe, um fator externo à fábrica. Os testes químicos efetuados estão, então, sujeitos ao calendário de fornecimento do peixe na fábrica e, uma vez que não era possível fazer-se análises ao fim-de-semana, o tempo em que as referidas análises foram efetuadas foi variável. A título de exemplo, um peixe recebido numa terça-feira ou quarta-feira terá sido testado na quinta ou sexta-feira respetivamente (após 2 dias), enquanto que um peixe recebido na quinta-feira terá sido testado apenas na segunda-feira da semana seguinte, isto é, após 4 dias. O segundo teste foi efetuado, consistentemente, seis dias após a entrada do peixe.

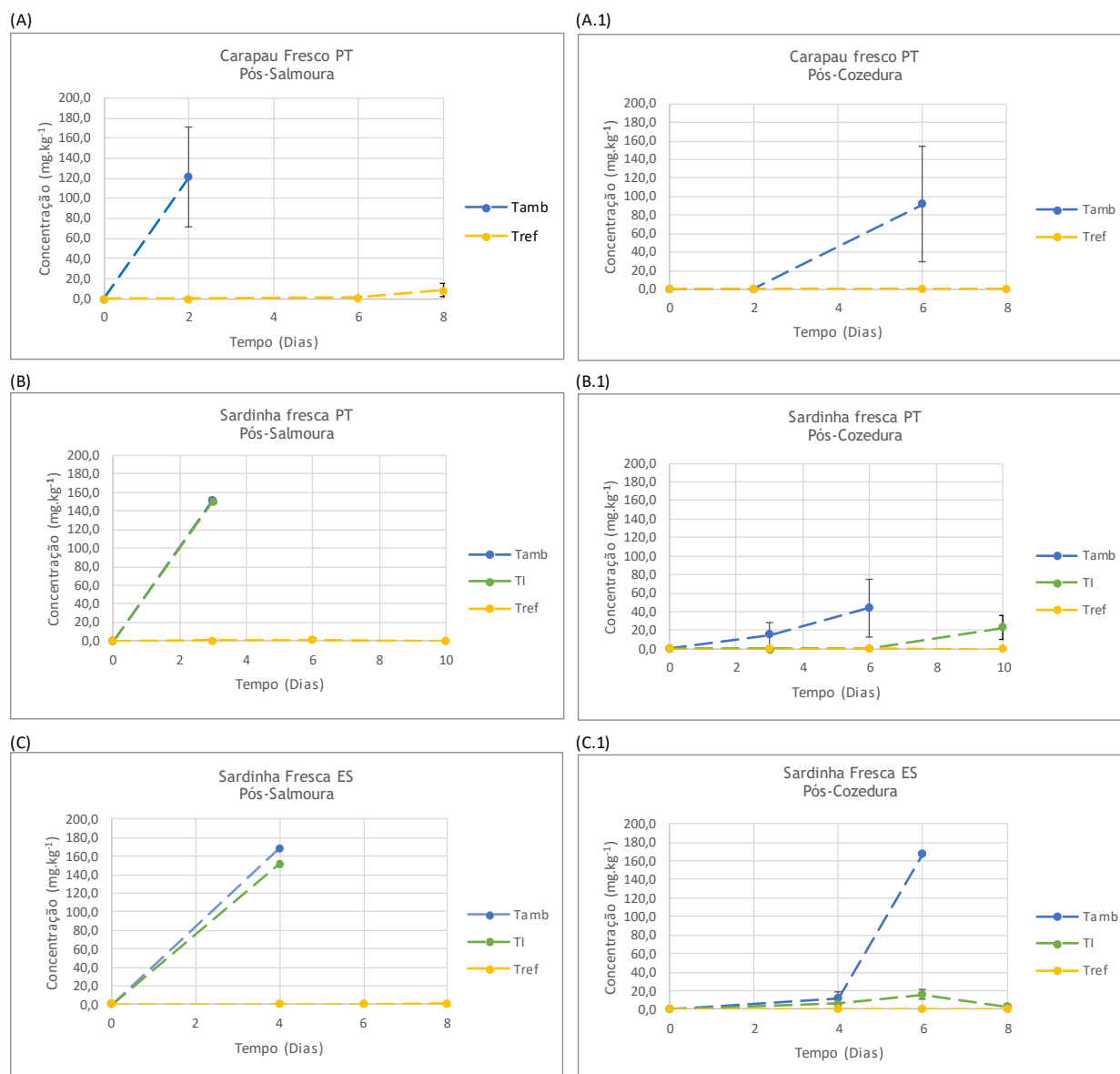


Figura 10: Evolução da concentração de histamina nos Peixes Frescos após os processos de salmoura e cozedura

Apesar de os primeiros ensaios não terem sido realizadas nos mesmos períodos, é verificado que a evolução das concentrações médias de histamina é aproximadamente igual após o processo de salmoura à temperatura T_{amb} e T_I , (Figura 10B e C). Embora a temperatura T_I seja cerca de 10 graus Celcius inferior à temperatura T_{amb} , não há praticamente distinção (visível) entre a evolução dos níveis de histamina às duas temperaturas, o que sugere que a velocidade da reação enzimática é semelhante nos dois casos. Segundo Morii e Kasama (2004) a enzima histidina descarboxilase da bactéria *P. phosphoreum* é induzida ativamente a temperaturas de crescimento entre 7 e 25 °C. Deste modo, é provável que ambas as amostras contivessem enzimas derivadas desta bactéria, o que explica os resultados semelhantes após o teste. Paralelamente, verifica-se que nas Figuras 10A, B e C para T_{amb} e T_I , após a primeira análise não estão representados os valores de histamina, o que se deve ao aumento da degradação do

peixe, tendo sido atingido um nível de histamina demasiado alto para ser quantificado pelo método utilizado. Já a concentração de histamina à T_{ref} é praticamente nula durante os oito dias de armazenamento, tanto após o processo de salmoura, como após o processo de cozimento.

Após o processo de cozimento (Figura 10 B.1 e C.1), o efeito da temperatura de armazenamento na evolução dos níveis de histamina é evidente. Há uma clara distinção entre a evolução da concentração à T_{amb} e de T_I . À temperatura ambiente, apesar de no carapau fresco e na sardinha fresca de Portugal os valores de concentração atingidos serem inferiores ao limite legal de $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (aproximadamente 90 e $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ respetivamente), o peixe apresentava um elevado nível de degradação, apresentando-se coberto de fungos e já em estado de putrefação. Tal não permitiu o corte de lombos de peixe sem a junção de espinhas, pele e fungos. Deste modo, não foi possível continuar o estudo. À temperatura denominada de T_I , como a temperatura é consideravelmente inferior à ambiente, os níveis de histamina são menores. Tanto na Figura B.1 como no C.1, ao fim de 8 dias, a concentração de histamina é inferior a $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Através da análise da Figura 10 conclui-se que o processo de cozedura provoca um aumento menos acentuado nos níveis de histamina, o que se traduz numa maior duração do peixe.

Após a cozedura, tanto o carapau fresco (Figura A1) como a sardinha fresca de Portugal (B1) apresentam ao longo dos 8 dias um nível de histamina abaixo do regulamentado, ao contrário da sardinha fresca de Espanha (C1). A sardinha de Espanha, ao contrário dos outros peixes frescos, apresenta, após cozedura, um crescimento anormal na concentração de histamina. Até ao dia 4 a sua evolução foi praticamente nula, mas a partir desse dia o seu crescimento é exponencial.

A primeira constatação é corroborada pela literatura - a histamina não é eliminada, mas as suas bactérias e enzimas podem ser inativadas pelo cozimento (FSAI, 2019). A segunda pode estar relacionada com o percurso do peixe desde a sua captura até à sua entrega na fábrica: a distância percorrida pelo pescado proveniente de Espanha é maior, assim o transporte pode ter efeitos adversos na sua preservação (ex. nas paragens são desligados os camiões e consequentemente as arcas frigoríficas). Para além disso, pode ser mais suscetível a nova contaminação por parte de bactérias formadoras de histamina após o processo de cozedura devido às condições a que a amostra é submetida (Asae, 2012; FAO e WHO, 2013).

Como os peixes frescos e a cavala congelada (Figura 11D) apresentavam, ao fim de dois dias de exposição à temperatura ambiente e após o processo de salmoura, uma concentração de histaminas superior a $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, foram também realizadas análises ao fim de um dia à sardinha congelada de Marrocos e à sardinha congelada CE. Tal foi motivado pela perceção de que a realização de testes apenas após dois dias se mostrava ineficiente.

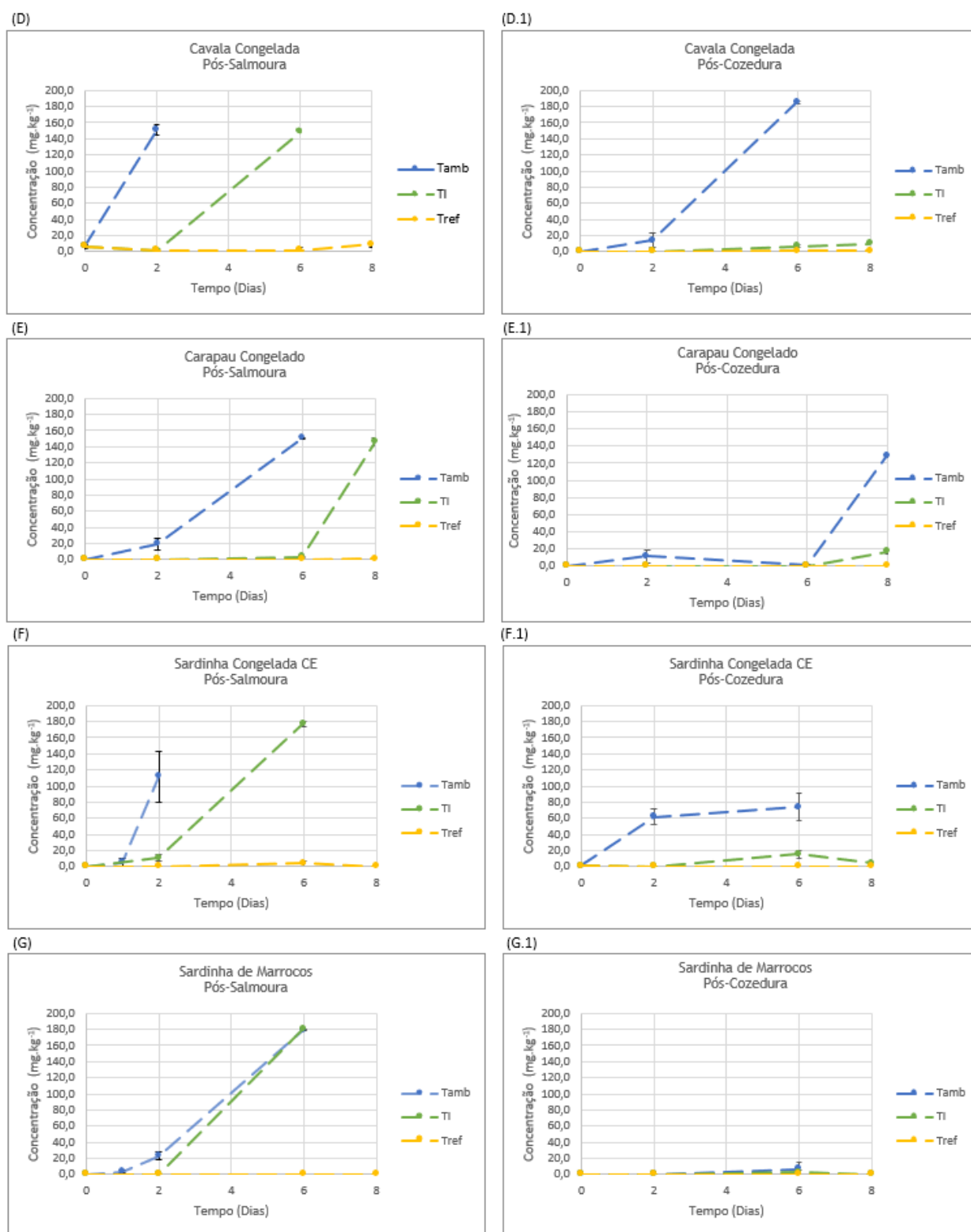


Figura 11: Evolução da concentração de histamina nos peixes congelados após os processos de salmoura e cozedura

As análises, no caso dos peixes congelados, têm por referência o dia em que o peixe entrou em processamento, pois estes já se encontram nas instalações, nas câmaras de conservação de congelados. Como referido anteriormente, foram executados ensaios ao fim de 1 dia à temperatura ambiente e após o processo de salmoura, à sardinha congelada de Marrocos e à cp0 e 1, este não foi verificado - em ambos os casos as suas concentrações subiram ligeiramente, para 3 e 5 mg·kg⁻¹, respetivamente. Foi deduzido que o aumento significativo da concentração da amina se inicia a partir das 24 horas de exposição.

As amostras submetidas à temperatura intermédia apresentaram, no mesmo intervalo de tempo, um menor desenvolvimento de histamina que as amostras submetidas à temperatura ambiente (Figura 11D, E, F e G). A presença de histamina à temperatura intermédia, após ambas as etapas - salmoura e cozedura - tornou-se visível após dois dias, enquanto que à temperatura ambiente a sua concentração ao fim de dois dias era já notável. Após o processo de salmoura a evolução do teor de histamina varia entre aproximadamente 20-150 mg·kg⁻¹, enquanto que após o processo de cozimento varia entre 0,3 e 60 mg·kg⁻¹.

No caso do carapau congelado, apresentado na Figura 11E, a síntese da amina a T_i é iniciada quatro dias mais tarde que nos restantes casos de estudo. Não foi encontrado nenhum estudo que o justificasse, contudo pensa-se que as bactérias responsáveis pela produção da enzima L-histidina descarboxilase tenham uma produção mais lenta e/ou que a atividade enzimática nesta espécie seja induzida após um maior intervalo de tempo devido ao tipo de enzima produzida consoante a bactéria (Morii e Kasama, 2004).

Apesar da sardinha congelada de Marrocos ter estado sujeita às mesmas condições de temperatura, este peixe é capturado por embarcações pequenas e sem câmaras de refrigeração, o que, naturalmente, condiciona a sua qualidade. Desta forma, deteriora-se mais rapidamente que o carapau congelado. Mais uma vez, são confirmadas as considerações encontradas na bibliografia, ou seja, a temperaturas entre os 4 e 10°C, as bactérias e enzimas promovem a formação de histamina, apesar de em menor quantidade.

Os peixes apresentam um crescimento de histaminas mais lento após o cozimento, como evidenciado na Figura 11 D.1, E.1, F.1 e G.1. Quando comparado com o estado do peixe após o processo de salmoura, à temperatura T_{amb} todos os peixes evidenciam uma evolução na concentração de histamina mais lenta. Desta forma, uma vez que a sua deterioração é mais lenta, é possível analisar as amostras ao fim de seis dias, que apresentam concentrações entre 7 e 180 mg·kg⁻¹. Após este período, apesar de a sardinha de Marrocos apresentar aproximadamente 7 mg·kg⁻¹, não foi possível continuar os seus ensaios devido ao seu estado de degradação e oxidação, à semelhança do ocorrido no caso de outros peixes, como explicado anteriormente. Mais uma vez, o carapau apresenta-se mais resistente ao aumento da

concentração de histamina, tornando-se o aumento da sua concentração significativo apenas ao fim de 6 dias.

A cavala, representada na Figura 11D.1, apresenta valores superiores a todos os outros peixes ao fim de seis dias ($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), sendo a única espécie que ultrapassa o limite legal regulamentado ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Por comparação, à temperatura T_1 não há uma evolução considerável dos níveis de histamina, o que era esperado por se tratar de uma temperatura inferior à temperatura ambiente e pelo facto de os peixes já terem sido submetidos ao processo de cozimento (FSAI, 2019). De facto, a espécie que evidencia uma maior tendência para a deterioração é a cavala, enquanto que o carapau revela um menor desenvolvimento de histamina e, consequentemente, um maior tempo de vida útil.

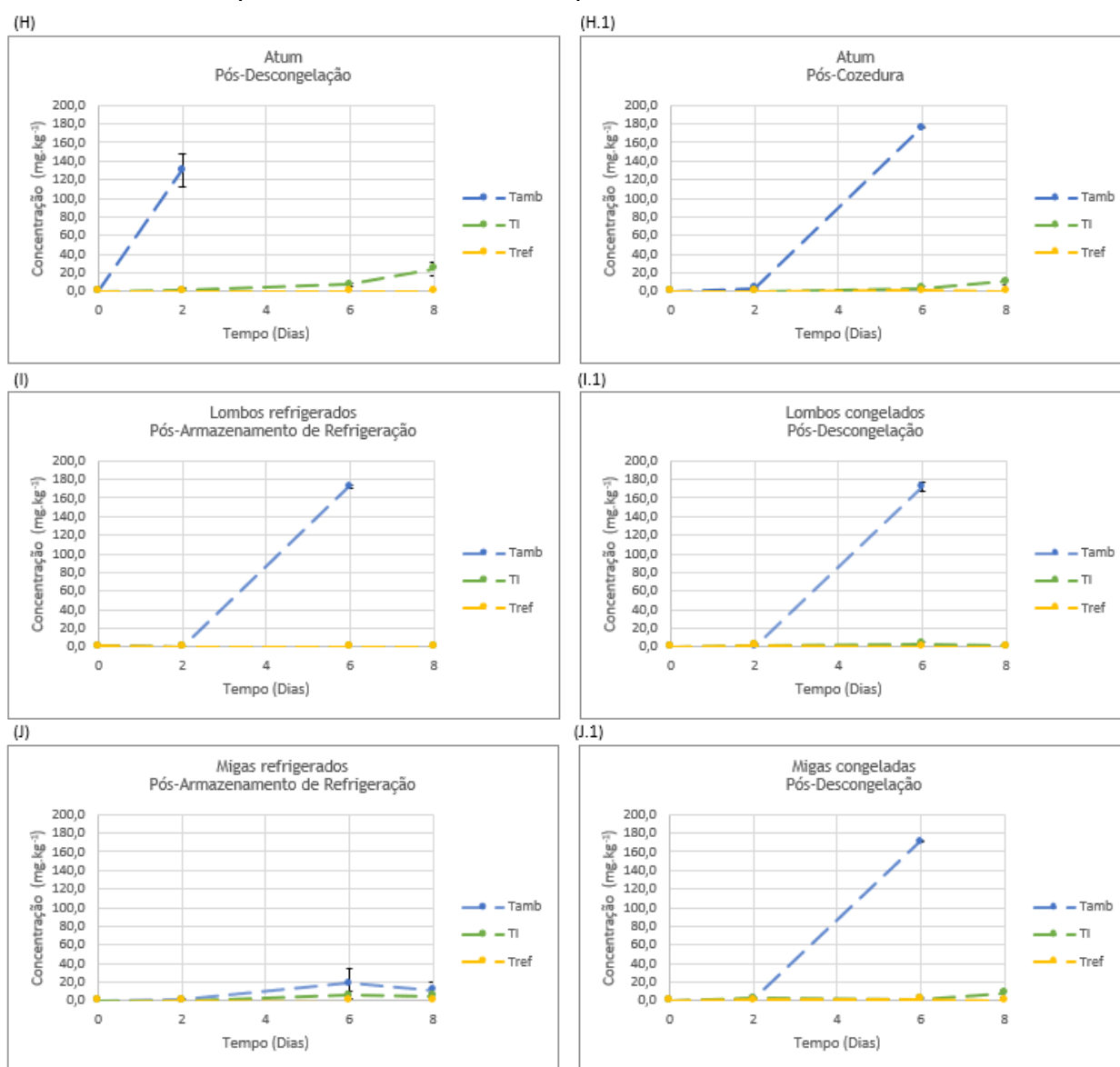


Figura 12: Evolução da concentração de histamina no atum e seus derivados

O atum, além de ser um peixe de maiores dimensões, pescado em zonas mais quentes, não passa pelo processo de salmoura e é confeccionado na fábrica “La Gondola”; o mesmo acontece

com os seus derivados, as migas e os lombos. Na Figura 12H verifica-se que o aumento da concentração de histamina, para o mesmo intervalo de tempo, a T_{amb} , é mais significativo que em H.1. De facto, ao fim de dois dias, a concentração de histamina no atum pós-descongelação é de $130 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, enquanto que no caso da pós-cozedura ainda é praticamente nula. Em comparação, à temperatura T_I há uma clara diferença na evolução da concentração da amina, pois ao fim de oito dias as concentrações no atum pós-descongelação e pós-cozedura são de aproximadamente 24 e $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respetivamente. O menor desenvolvimento de histamina à temperatura de T_I , após o processo de descongelação, é explicado pelo facto de o atum sofrer o processo de descongelação em câmara de descongelação. Desta forma, ao recolher as amostras de atum cru, estas ainda se encontravam semi-congeladas. Ao colocar à temperatura intermédia o peixe continuou a descongelar durante algum tempo, sendo, então, a evolução da concentração de histamina menor.

Os valores medidos para os lombos e as migas refrigerados e congelados são comparados na Figura 12 I, I.1, J e J.1. Era esperado que as migas apresentassem uma maior evolução na concentração de histamina quando comparadas com os lombos, uma vez que são um subproduto da limpeza superficial dos lombos e que na sua preparação está envolvida uma mistura de vários lotes. Também, previa-se que nos lombos e migas congeladas a concentração de histamina fosse mais elevada nos ensaios realizados pós-refrigeração, uma vez que são submetidas a mais um processo físico, a congelação. Porém, isto só se verifica nas migas. Entre os gráficos I e I.1 não há praticamente diferenças. Em relação às migas, exibidas na Figura 12J, o nível de histamina encontra-se dentro dos limites legais ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) para as três temperaturas consideradas, ao longo dos oito dias. Tal não se verifica nas migas congeladas. Estas atingem, à temperatura ambiente, cerca de $160 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, corroborando assim a ideia de que o aumento do número de etapas de processamento a que o pescado é sujeito induz o aumento de concentração de histamina.

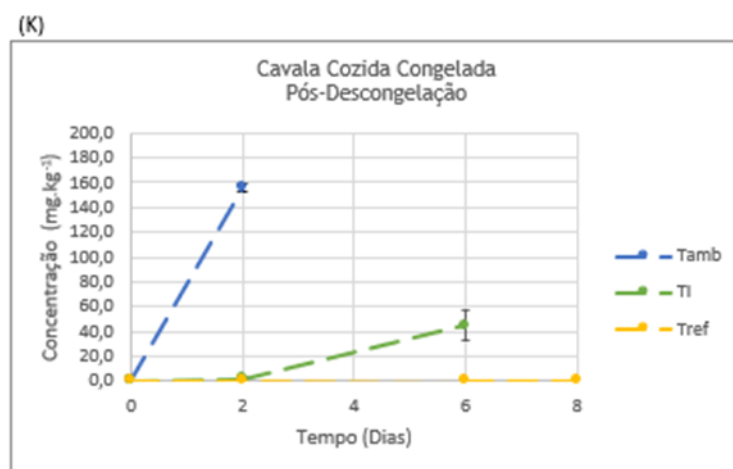


Figura 13: Evolução na concentração de histamina na cavala cozida congelada

Para além dos estudos mencionados anteriormente, foi estudada a cavala cozida congelada (Figura 13K), rececionada na forma de filete. Esta sofre na fábrica apenas o processo de descongelação em câmara. Comparando com a cavala congelada, carapau congelado, sardinha congelada CE, sardinha de congelada de Marrocos e atum congelados, tanto a T_{amb} como a T_I , observa-se, após o processo de cozedura, uma evolução mais rápida no nível de histamina, atingindo rapidamente o nível de concentração máximo regulamentado. Quando exposta à temperatura ambiente a sua concentração é, ao fim de dois dias, superior ou equiparada à dos restantes peixes ao fim de seis dias. À temperatura intermédia, apesar de estar contida no limite determinado, continua a ser superior à dos restantes peixes. Por ser recebida em forma de filetes cozidos e congelados pressupõe-se que a cavala tenha passado por, pelo menos, dois processos a mais que os peixes rececionados congelados, nomeadamente a cozedura e a preparação. Durante estes processos, que decorrem antes de o peixe chegar à fábrica, são desconhecidos os cuidados de higiene e fabrico; após a chegada ao destino, a cavala é ainda submetida ao processo de descongelação em câmara. Por estas razões, a cavala, apesar de cozida, desenvolve níveis de histamina equiparada a um peixe após o processo de salmoura. Mais uma vez, o crescente número de processos a que o peixe é submetido tem um impacto importante na degradação do mesmo, através do aumento da concentração de histamina.

4.4 Comparação da evolução de concentração de histamina de todas as amostras à temperatura ambiente, intermédia e de refrigeração

A evolução da concentração de histamina em função do processo a que o peixe foi submetido, assim como em função da sua temperatura de conservação, foi também comparada.

Todas as espécies de peixe analisadas foram agrupadas de acordo com a sua temperatura de armazenamento, de modo a facilitar a compreensão da evolução relativa dos níveis de histaminas (Figura 14). A análise e discussão dos seguintes gráficos será centrada em torno do valor estipulado pela “A Poveira” para a eliminação dos lotes considerados degradados, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. É de ressaltar que a diferença de concentração de histamina entre as diferentes espécies de peixe está também relacionada com o tipo e número de bactérias descarboxiladoras de histidina com os quais os peixes podem estar contaminados (Patange *et al.*, 2005).

A discussão da Figura 14 irá desenrolar-se a partir da leitura dos gráficos da direita para a esquerda, de modo, a perceber o tempo que cada espécie demora a desenvolver o teor de histamina estabelecido pela empresa. Primeiramente serão referidos os peixes congelados, seguidos dos peixes frescos e por último uma breve conclusão. Em todos os gráficos, é atribuída a mesma cor a cada peixe.

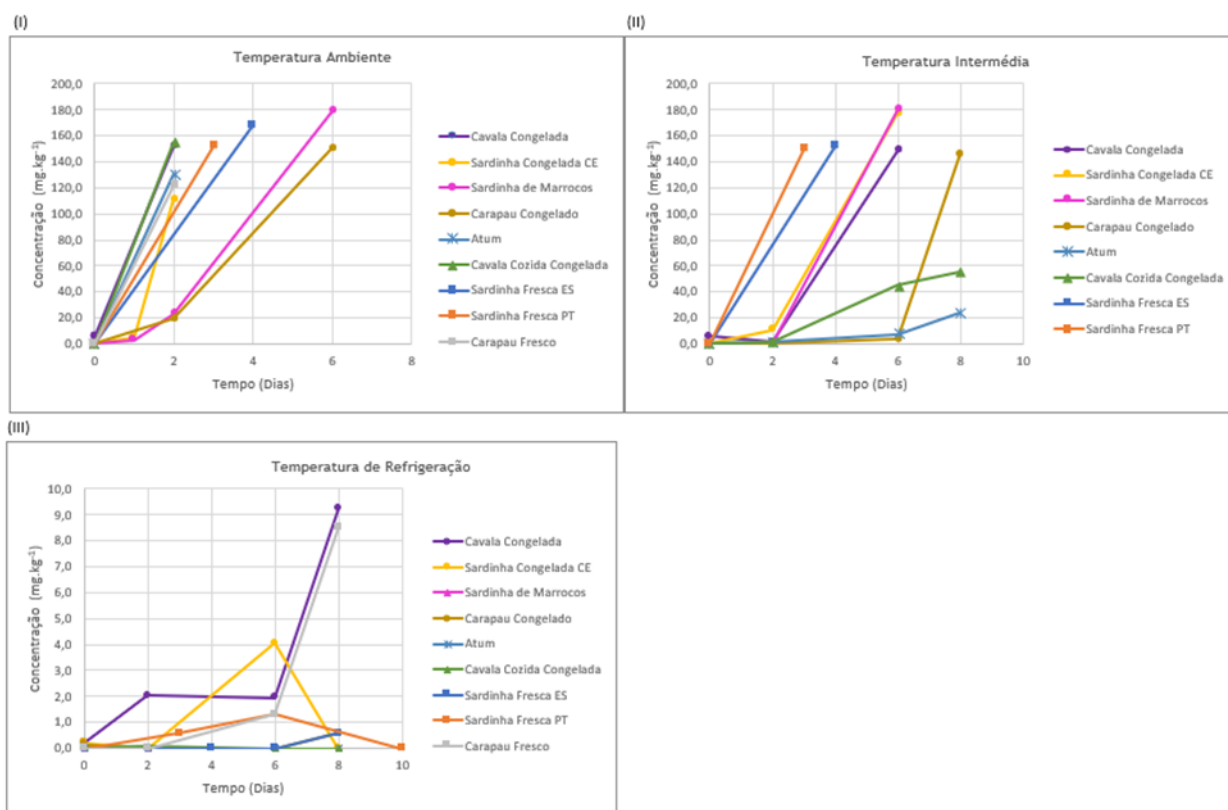


Figura 14: Evolução da concentração de histamina dos vários tipos de pescado em função da temperatura de armazenamento após o processo de salmoura

Constata-se na Figura 14I que à temperatura ambiente o carapau congelado (amarelo escuro) é a matéria-prima que mais tempo resiste ao aumento da concentração de histamina, sendo então o que mais tempo demora a atingir o limite estabelecido de histamina no complexo fabril (aproximadamente 3 dias). Dentro dos peixes congelados, segue-se a sardinha de Marrocos congelada e a sardinha congelada CE (rosa e amarelo, respetivamente) que demoram cerca de 2 dias e meio e 1 dia e meio a atingir os $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respetivamente. A cavala (roxo) é o peixe que, para os mesmos intervalos de tempo, desenvolve maior quantidade de histamina, sendo ligeiramente maior a concentração na cavala cozida congelada (cor verde sobreposta à representação da cavala congelada). Para atingir a concentração fixada, esta espécie demora menos de um dia. A cavala tem uma maior dimensão que os restantes peixes considerados neste estudo, o que implica que o peixe conta com uma maior quantidade de histidina inerente, o que leva a uma elevada concentração de histamina (Abe, 1983). O atum (azul) necessita de aproximadamente 18 horas para ultrapassar o valor limite, e situa-se então entre a cavala e os peixes frescos no *ranking* de concentração de histamina. Em relação a estes últimos - azul, laranja e cinzento - há uma maior dificuldade em afirmar qual o mais vulnerável, uma vez que os testes não foram efetuados no mesmo número de dias após início do processamento. Contudo, ao centrar a discussão de resultados no valor de $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, foi concluído que o

carapau fresco é o mais vulnerável à contaminação por histaminas, pois ultrapassa esse mesmo valor primeiro que a sardinha fresca de Espanha e Portugal.

À temperatura intermédia, disposta no gráfico II, verifica-se que a cavala cozida congelada e o carapau congelado ultrapassam o valor crítico de $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ após sensivelmente 6,5 dias. A esta temperatura, o atum é o peixe que desenvolve menor quantidade de histamina, permanecendo abaixo do limite estipulado ao longo dos 8 dias. Os restantes peixes congelados atingem concentrações entre 150 e $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ao fim de seis dias, atingido o valor crítico após aproximadamente três dias de exposição à temperatura em causa. Por sua vez, os peixes frescos atingem essa mesma concentração ao fim de um dia, atingindo a concentração de $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ao fim de três a quatro dias. A sardinha fresca de Espanha demora mais tempo até atingir a mesma concentração detetada na sardinha fresca de Portugal. Através da análise conclui-se que o carapau congelado deve ser aceite durante seis dias e a cavala cozida congelada e o atum, por sua vez, podem ser aceites ao longo de 8 dias; a Sardinha CE congelada, a sardinha congelada de Marrocos e a cavala congelada são-no durante três dias. Os peixes frescos são aceitáveis durante o primeiro dia, começando a perder as suas qualidades, e consequentemente tornando-se impróprios para consumo, apenas no segundo dia, com o crescimento mais acentuado de histamina.

Por fim, no gráfico III, relativo ao pescado armazenado à temperatura de refrigeração verifica-se que ao longo dos 8 dias nenhum peixe atinge os $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Contudo, a cavala congelada é, de forma similar ao armazenamento a T_{amb} , a espécie que mais propicia à formação de histamina pela razão já mencionada. Estes resultados eram os esperados, pois à temperatura de refrigeração ($3 \pm 1^\circ\text{C}$) a produção de histamina é menor, apesar da enzima continuar ativa (SILVA *et al.*, 2006).

Como explanado ao longo desde capítulo, na Figura 15IV, V e VI, o pescado após o processo de cozedura evidencia que pode ser exposto durante mais tempo à temperatura ambiente antes de se dar a sua degradação. Assim, com a exceção da cavala cozida congelada e da sardinha congelada CE, o restante pescado pode ficar expostos durante dois dias à temperatura ambiente sem ultrapassar o valor estipulado. No caso da temperatura intermédia, todos os peixes permanecem estáveis até ao último dia definido, isto é, o dia oito. Com a ressalva da cavala cozida congelada, nenhum dos peixes ultrapassa o limite estipulado pela fábrica, permanecendo entre 0 e $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. À temperatura de refrigeração os valores são inferiores a $1,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, continuando a cavala congelada a que apresenta uma evolução mais rápida nos níveis de concentração de histamina.

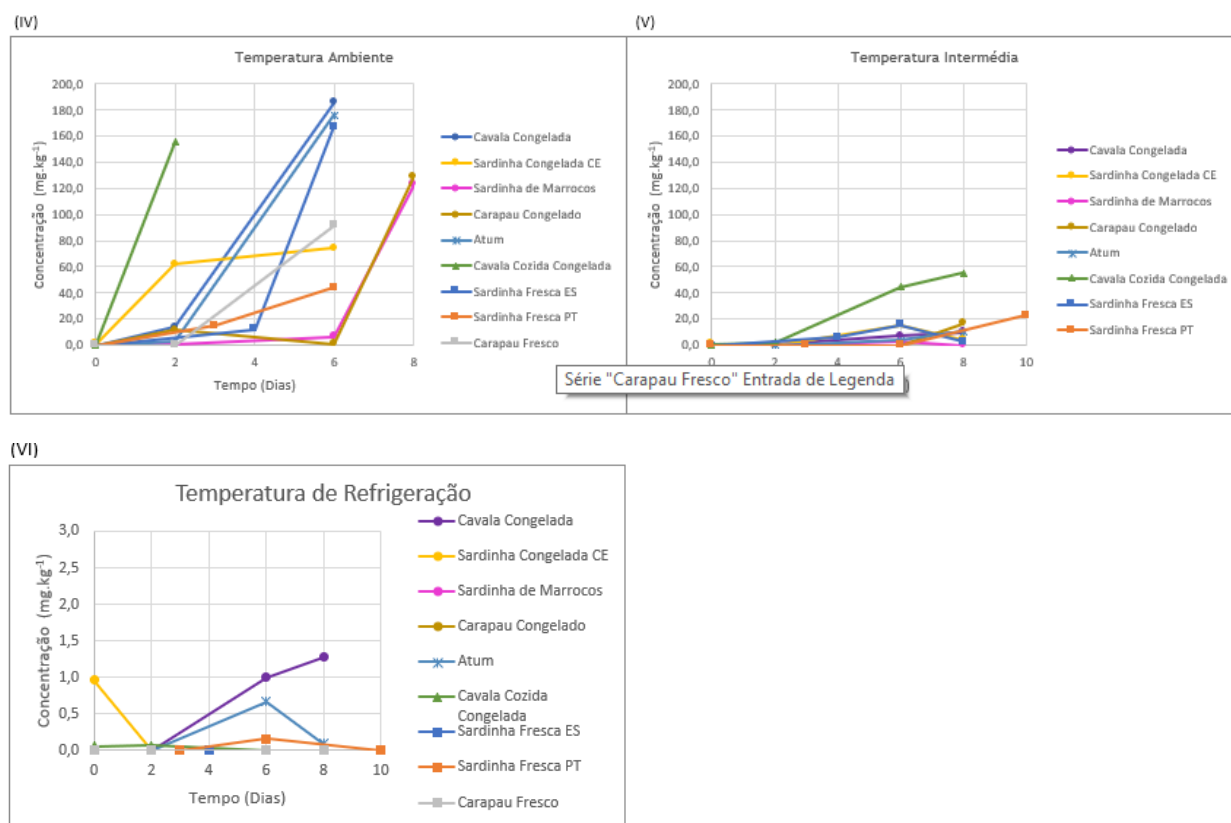


Figura 15: Evolução da concentração de histamina dos vários tipos de pescado em função da temperatura de armazenamento após o processo de cozedura

Por fim, foi realizado um estudo à cavala congelada, sardinha (de Marrocos e CE) congelada e atum congelado, de modo a determinar se, ao fim de um dia de trabalho (± 8 horas), o peixe exposto à temperatura ambiente após o processo de salmoura continha histamina. Assim, a cada hora foram retiradas amostras para analisar o teor de histamina. Com este estudo foi concluído que ao fim de 8 horas o peixe permanecia com uma concentração de histamina inferior a $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, como representado na Figura 16.

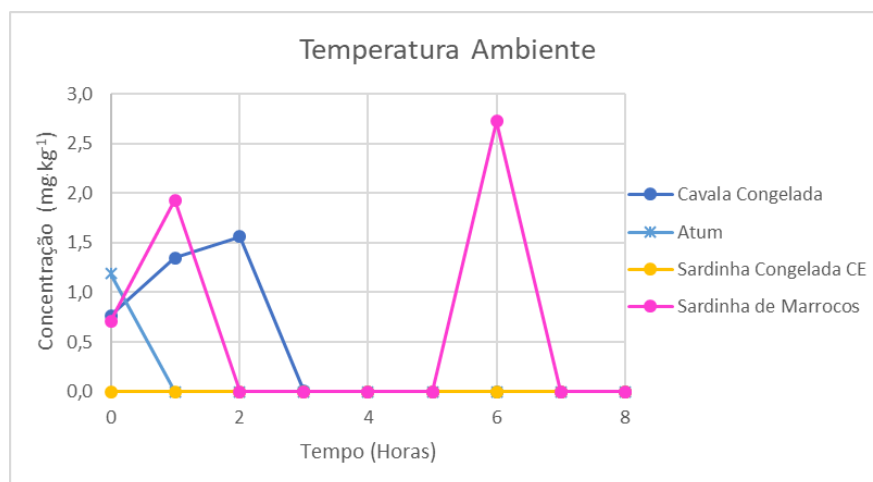


Figura 16: Evolução da concentração de histamina à temperatura ambiente após o processo de salmoura ao longo de um dia laboral

5 Conclusões

A presente dissertação teve como principal objetivo estudar a evolução da concentração de histamina nas matérias-primas utilizadas na produção de conservas de pescado, de modo a determinar quanto tempo estas se conservavam quando expostas à temperatura ambiente de 25 ± 5 °C, temperatura intermédia de 10 ± 2 °C e temperatura de refrigeração de 3 ± 1 °C. Tal análise teve como objetivo retificar, caso necessário, o limite para a concentração de histamina permitida na fábrica “A Poveira” e procedimentos adotados.

Para tal, e com a colaboração do departamento de qualidade da empresa, foi elaborado um plano de recolha de amostras de pescado e determinadas condições propícias ao crescimento desta amina biogénica. Medidas preventivas em relação à sua contaminação cruzada foram, também, tomadas.

Em paralelo à preparação da amostragem foram calculados parâmetros de precisão e de exatidão de forma, a determinar a fiabilidade do sistema de medição utilizado pelo departamento. Ao longo do estudo verificou-se que para algumas amostras os valores de coeficiente de variação relativos ao valor de histamina eram bastante discrepantes (em alguns casos atingiu os 131 %). Tal valor levantou questões relativas à amostragem, preparação das amostras e medição dos ensaios. Em discussão com o departamento e através da análise da literatura foi compreendido que os valores de coeficiente de variação eram elevados devido à complexidade da matriz em estudo, às condições a que as amostras podiam ser submetidas antes da sua receção no complexo industrial e a possíveis erros de manuseamento por parte do operador.

Após a validação do método de análise e através dos resultados obtidos, foram elaborados gráficos que relacionam a evolução da concentração de histamina no peixe após o processo de salmoura e cozedura, para as três diferentes temperaturas.

Em seguida foram discutidos os resultados referentes aos peixes frescos, seguidos dos congelados e do atum e seus derivados. Ainda na mesma linha de pensamento, foram elaborados 6 gráficos fixando a temperatura e etapa de produção com todos os peixes envolvidos, independentemente da sua forma de apresentação e tipo de conservação.

Do ponto de vista evolutivo e comparando o processo de salmoura com o processo de cozedura, verificou-se que após o processo de cozedura o aumento da concentração de histamina é inferior. À temperatura intermédia, à exceção da cavala cozida congelada, nenhum dos peixes analisados ultrapassa uma concentração de histamina de $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e à temperatura de refrigeração a concentração máxima atingida é de $1,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Em relação às espécies estudadas, independentemente da sua forma de conservação e tipo de apresentação, concluiu-

se que a cavala é o peixe que apresenta uma evolução mais rápida nos níveis de histamina, considerando o mesmo intervalo de tempo.

Analisando os dados em conjunto com as variáveis em causa e tendo como modelo o peixe que contém uma maior evolução de concentração de histamina - a cavala - foi constatado que o limite estipulado pela fábrica é adequado, visto que a concentração especificada, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, é metade do limite regulamentado ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), indicando que se trata de uma margem de erro confiável de forma a evitar o aparecimento de conservas contaminadas no mercado. Desta forma, considerando os procedimentos implementados e garantindo o seu cumprimento ao longo dos processos, principalmente a nível de controlo de temperatura e tempos de espera, após o processo de salmoura e descongelação, o peixe pode ficar exposto à temperatura ambiente até 12 horas. À temperatura intermédia, o peixe fresco não deve ultrapassar um dia sem conservação, enquanto o pescado congelado pode permanecer até 3 dias. Após o processo de cozimento o prazo definido mantém-se, no caso de exposição à temperatura ambiente, pois a cavala cozida congelada ao fim de um dia atinge $78 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. À temperatura intermédia, com exceção da cavala cozida congelada, o pescado pode permanecer até oito dias. Generalizando, o pescado apenas pode permanecer até 6 dias à referida temperatura. Por fim, após ambos os processos, o pescado pode ser mantido em câmara durante 8 dias à temperatura de refrigeração. No entanto, outras propriedades do peixe podem ser alteradas.

Se o peixe permanecer exposto ao longo dos períodos estipulados, às três temperaturas referidas, é sugerido que antes da sua utilização se realizem análises com um maior número de amostras. De modo a determinar a quantidade de peixes recolhidos na amostragem e com que regularidade os ensaios deveriam ser elaborados teriam de ser efetuados mais estudos. Para um maior aprofundamento do tema, sugere-se que sejam efetuadas análises a todo o tipo de pescado estudado ao longo da presente dissertação, com novo espaçamento temporal entre as análises. Estas devem ser realizadas entre as 12 horas e 24 horas para o caso da temperatura ambiente, e entre 1 e 3 dias à temperatura intermédia. Contudo, é necessário ressaltar que não faz parte das boas práticas da fábrica deixar o peixe exposto a tais temperaturas ao longo de períodos tão extensos. Porém, o presente estudo foi importante não só para comprovar que o valor limite determinado pelo departamento de qualidade é pertinente e adequado, como para estabelecer limites de tempos e temperatura para o caso de eventuais falhas no controlo de lotes e na produção. Ainda, perante os resultados, demonstrou-se que as temperaturas de refrigeração utilizadas após a salmoura do peixe e após a cozedura são adequadas.

O estudo veio assim permitir a confirmação de medidas implementadas pelo departamento de qualidade da fábrica “A Poveira”, assim como, se necessário, auxiliar na tomada de decisões de procedimentos relacionados com a histamina.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um estudo que permitisse perceber a evolução de concentração de histamina quando as matérias-primas são submetidas a certas temperaturas durante um determinado tempo de armazenamento. Isto permitiria determinar o tempo de exposição do pescado sem exceder o limite regulamentado pela comunidade Europeia e permitir agir perante as condições simuladas. Neste projeto foi também proposto verificar se o valor determinado pelo departamento de qualidade para eliminação de lotes que continham amostras com histamina seria o mais adequado, assim como estabelecer limites de tempos e temperatura para o caso de eventuais falhas no controlo de lotes e na produção. O objetivo principal definido foi cumprido. O estudo foi elaborado para todos os peixes utilizados com mais regularidade na fábrica e foram conseguidas as conclusões pretendidas. Quanto à análise do tempo de exposição máximo antes de ocorrer a deterioração do pescado às temperaturas referidas, é sugerido que se realizem análises suplementares utilizando um número superior de amostras. Sugere-se ainda que sejam efetuadas análises ao pescado estudado nesta dissertação a diferentes tempos de exposição. Estas devem ser realizadas entre as 12 e 24 horas para o caso da temperatura ambiente, e entre 1 e 3 dias à temperatura intermédia. Durante os cinco meses passados no laboratório de qualidade da empresa “A Poveira”, e tendo por base a aprendizagem do funcionamento de um laboratório de controlo de qualidade, foi ainda possível aprender e realizar ensaios relacionados com o controlo de qualidade das matérias-primas e do produto acabado, destacando-se a análise da cravação, determinação da %sal e humidade, caracterização organolética, etc. Colaborei ainda com o departamento de inovação na elaboração de uma nova conserva, que permitiu perceber a íntima ligação de um departamento de inovação ao negócio.

6.2 Apreciação Final

A realização da presente dissertação em ambiente empresarial permitiu o desenvolvimento de várias competências transversais, como organização, proatividade, sistematização e resolução de problemas, assim como trabalho em equipa. Uma vez que o presente projeto foi integrado num laboratório no seio de uma fábrica, foi necessário desenvolver relações interpessoais e compreender a dinâmica de uma fábrica de grandes dimensões. O facto de os estudantes poderem elaborar a tese em ambiente empresarial é uma mais valia para a sua preparação, quer a nível pessoal, quer profissional, permitindo conhecer uma realidade totalmente diferente da proporcionada no ambiente académico.

7 Referências

- A Poveira (2018) *História*. Disponível em: <https://www.apoveira.pt/a-poveira> (Acedido: 22 de setembro de 2019).
- Abe, H. (1983) 'Distribution of Free L-Histidine and its Related - Compounds in Marine Fishes', *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, pp. 1683–1687.
- Abreu, L. M. dos S. (2014) *Avaliação de risco em empresa processamento de peixe congelado Ribapeixe - Comércio de Produtos Alimentares, Lda*. Instituto Politécnico de Santarém.
- ACOPE (2016) *60% do peixe pescado em Portugal é sardinha, cavala e carapau*. Disponível em: <https://www.cope.pt/noticias/893-60-do-peixe-pescado-em-portugal-e-sardinha-cavala-e-carapau.html> (Acedido: 30 de outubro de 2019).
- ACOPE (2018) *Portugal é o país da União Europeia com maior consumo de peixe*. Disponível em: <https://www.cope.pt/noticias/1115-portugal-e-o-pais-da-uniao-europeia-com-maior-consumo-de-peixe.html> (Acedido: 5 de novembro de 2019).
- Al-badr, A. A. e El-subbagh, H. I. (2001) 'Analytical Profiles of Histamine', in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, pp. 163–183.
- Altieri, I., Semeraro, A., Scalise, F., Calderari, I. e Stacchini, P. (2016) 'European official control of food: Determination of histamine in fish products by a HPLC-UV-DAD method', *Food Chemistry*, 211, pp. 694–699. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.111.
- Amaral, R. e Oliveira, B. (2013) 'Perigos Físicos: Importância da sua identificação para o Sistema de Segurança Alimentar', *Revista Nutricias*, (19), pp. 10–12. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2182-72302013000400003.
- Asae (2012) *Riscos e Alimentos*. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/espaco-publico/publicacoes/riscos-e-alimentos/riscos-e-alimentos-2012-2011.aspx> (Acedido em: 6 de Outubro de 2019)
- ASAE (2005) *Anisakis*, ASAE. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/anisakis.aspx> (Acedido em: 4 de Outubro de 2019).
- ASAE (2005) *Perigos de Origem Alimentar*, ASAE. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx> (Acedido: 15 de novembro 2019).
- ASAE (2017) *Conservação dos Alimentos no Frio*. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/perguntas-frequentes1/conservacao-dos-alimentos-no-frio.aspx> (Acedido: 8 de novembro de 2019).
- Batista, P., Pinheiro, G. e Alves, P. (2003) *Sistemas de Gestão de Segurança Alimentar*. 1st edn. Disponível em: http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_5.pdf.
- Bragadeste, C. (2019) *Tudo o que deve saber sobre: Conservas de Peixe, Diário de uma Dietista*. Disponível em: <https://diariodeumadietista.com/tudo-o-que-deve-saber-sobre-conservas-de-peixe/> (Acedido: 3 de fevereiro de 2020).
- Do Carmo, F. B. T., Mársico, E.T., São Clemente, S.C., Carmo, R.P. e Freitas, M.Q. (2010) 'Histamina Em Conservas De Sardinha', *Revista UFG*, 11(1), pp. 174–180. doi: 10.5216/cab.v11i1.4819.
- Castro-González, M. I. e Méndez-Armenta, M. (2008) 'Heavy metals: Implications associated to fish consumption', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(3), pp. 263–271. doi: 10.1016/j.etap.2008.06.001.
- CBI (2019) *The European market potential for canned fish | CBI - Centre for the Promotion of Imports from developing countries*. Disponível em: <https://www.cbi.eu/market-information/fish-seafood/canned-fish/market-potential/> (Acedido: 11 de outubro de 2019).
- CE (2005) 'Regulamento N.º 2073/2005', *Jornal Oficial da União Europeia*, pp. 1–14.
- CODEX (2004) *Código de práticas para peixe e produtos da pesca (CAC/RCP 52-2003, Rev. 1-2004)*. Disponível em: <http://www.esac.pt/noronha/manuais/Codex%20-%20CBP%20Peixe.pdf> (Acedido em: 10 de outubro de 2019)
- Comas-basté, O., Latorre-Moratalla, M.L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M.T e Vidal-Carou, M.C. (2019) 'Histamine and Other Biogenic Amines in Food . From Scombroid Poisoning to Histamine Intolerance', in, pp. 1–19.
- Comerford, K. B. (2015) 'Frequent canned food use is positively associated with nutrient-dense food group consumption and higher nutrient intakes in US children and adults', *Nutrients*, 7(7), pp. 5586–5600. doi: 10.3390/nu7075240.
- Comissão das Comunidades Europeias (2006) 'REGULAMENTO (CE) N.º 1881/2006', *Jornal Oficial da União Europeia*, 2006(8).
- Comissão das Comunidades Europeias (2007) 'REGULAMENTO (CE) N.º 1441/2007', *Jornal Oficial da União Europeia*, (7).
- Comissão Europeia (2014) 'REGULAMENTO (UE) N.º 488/2014', *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 9(2). doi: 10.2903/j.efsa.2011.1975.
- Comission, E. (2018) *The Rapid Alert System for Food and Feed 2018*. doi: 10.2772/48887.
- Corey, R. (1998) *Industry & Trade Summary- Canned Fish, Except Shellfish*.
- Dalgaard, P., Emborg, J., Kjolby, A., Sorensen, N.D. e Balin, N.Z. (2008) 'Histamine and biogenic amines: Formation and importance in seafood', in Børresen, T. (ed.) *Improving Seafood Products for the Consumer*. 1st edn, pp. 292–324. doi: 10.1533/9781845694586.3.292.

- Espejo-Hermes, J; Orejana, F. (1984) 'Quality Assurance in the Fish Processing Industry', in, pp. 77–83. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- FAO/OMS (2003) *Codex Alimentarius: Higiene dos alimentos*. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=286-codex-alimentarius-higiene-dos-alimentos-textos-basicos-6&category_slug=seguranca-alimentar-e-nutricao-997&Itemid=965 (Acedido: 10 de outubro de 2019)
- FAO (2001) *Quality Control in the Fish Industry*, TORRY ADVISORY NOTE No. 58. Disponível em: <http://www.fao.org/3/x5934e/x5934e01.htm> (Acedido: 6 de dezembro 2019).
- FAO (2003) *Assessment and Management of Seafood Safety and Quality*. Disponível em: <http://www.fao.org/3/y4743e/y4743e0e.htm> (Acedido: 20 de novembro 2019).
- FAO and WHO (2013) *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products., Meeting report*.
- FDA (2011) 'Scombrototoxin (Histamine) Formation', in *Environmental Chemical Contaminants and Pesticides*. 4th edn, pp. 113–148.
- FDA (2012) *Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Introduction*. doi: 10.5860/choice.44-0962.
- Featherstone, S. (2016) *Canning of fish and seafood, A Complete Course in Canning and Related Processes*. doi: 10.1016/b978-0-85709-679-1.00006-4.
- Ferreira, A. (2019) *Expresso | Conservas. A Poveira torna-se galega*. Disponível em: <https://expresso.pt/economia/2019-09-10-Conservas.-A-Poveira-torna-se-galega> (Acedido: 25 de outubro de 2019).
- FoodExecutive (2017) *Trends and forecasts on global canned food market*. Disponível em: <https://www.foodexecutive.com/en/marketing/2358-canned-food-market.html> (Acedido: 10 de dezembro de 2019).
- FSAI (2019) *Histamine in Fish and Fishery Products, Food Safety Authority of Ireland*. Disponível em: https://www.fsai.ie/faq/histamine_fish.html (Acedido: 15 de janeiro de 2020).
- Hariri, O. El, Bouchriti, N. e Bengueddour, R. (2018) 'Risk assessment of histamine in chilled, frozen, canned and semi-preserved fish in Morocco; implementation of risk ranger and recommendations to risk managers', *Foods*, 7(10). doi: 10.3390/foods7100157.
- Healthy Food Guide (2019) *How to choose canned fish*. Disponível em: <https://www.healthyfood.com/healthy-shopping/how-to-choose-canned-fish/> (Acedido: 5 de novembro de 2019).
- INE (2018) *Estatísticas da Pesca 2018*.
- Irineu Batista, Isabel Guerreiro, Maria Leonor Nunes, T. P. (2015) *Manual de boas práticas para embarcações de pesca*. Docapesca. Disponível em: <http://www.amigosdocaster.org/wp-content/uploads/ama/manualboaspraticasespacosverdes.pdf>.
- Jacobson, J. W. and Dunbar, S. A. (2006) *Instrumentation and analytical methods., MLO: medical laboratory observer*. doi: 10.1016/b978-0-12-407821-5.00001-2.
- Jakšić, S., Balos, M.Z., Prodanov Radulovic, J. e Nesić, K. (2017) *Comparison of analytical methods for the determination of histamine in reference canned fish samples, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. doi: 10.1088/1755-1315/85/1/012066.
- Josupeit, H. (2016) *Investigação para a Comissão PECH - Mercados da pequena pesca: cadeia de valor, promoção e rotulagem*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- K.Krader (2019) *Millennials Tried To Kill It, But Tinned Fish Is Making a Comeback, Bloomberg*. Disponível em: <https://www.bloomberg.com/news/articles/2019-03-06/canned-fish-makes-a-comeback-no-matter-what-millennials-think> (Acedido: 10 de outubro de 2019).
- Lázaro de la Torre, C. A. and Conte-Júnior, C. A. (2013) 'Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin', *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(6), pp. 430–446. doi: 10.11606/issn.1678-4456.v50i6p430-446.
- Lehane, L. e Olley, J. (2000) 'Histamine fish poisoning revisited', *International Journal of Food Microbiology*, 58(1–2), pp. 1–37. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00296-8.
- MarketersMedia (2019) *Canned Seafood Market 2018 - Size, Share, Trend, Industry News, Production, Gross Margin, Key Players and Fast Forward Research*. Disponível em: <https://www.marketwatch.com/press-release/canned-seafood-market-2018---size-share-trend-industry-news-production-gross-margin-key-players-and-fast-forward-research-2019-01-08> (Acedido: 2 de novembro de 2019).
- Mil-Homens, S. (2007) *HACCP*. Disponível em: https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx?fbclid=IwAR23_r1lIPzCmc_v1-2ZEEYpsf71NYzLk36YatgijNVAI_Z1-ZFkpHmKcg (Accessed: 20 December 2019).
- Ministério da Agricultura, do R. e das P. (1998) *Decreto-Lei n.º 375/98*.
- Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas (2004) *Decreto-Lei n.º 37/2004*. Disponível em: <https://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/2004/02/048A00/10061009.PDF>.
- Ministério da Saúde (2017) *Agentes Biológicos Classificação de Risco dos Agentes Biológicos, Ministério da Saúde*.
- Moody, M. W. (2003) *FISH/Processing, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (second edition)*.
- Morii, H. e Kasama, K. (2004) 'Activity of two histidine decarboxylases from Photobacterium phosphoreum at different temperatures, pHs, and NaCl concentrations', *Journal of Food Protection*, 67(8), pp. 1736–1742. doi: 10.4315/0362-028X-67.8.1736.

- Parlamento Europeu (2004) 'Regulamento (CE) N° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004', *Jornal Oficial da União Europeia*, 139, pp. 1–51.
- Patange, S. B., Mukundan, M. K. e Kumar, K. A. (2005) 'A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh', *Food Control*, 16(5), pp. 465–472. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.05.008.
- R-Biopharm (2018) *Enzymatic assays - Food & Feed Analysis*. Disponível em: <https://food.r-biopharm.com/technologies/enzymatic-assays/> (Acedido: 29 de dezembro de 2019).
- R-Biopharm (2019) *RIDASCREEN® Histamine (enzymatic)*.
- Ribeiro, A. F. e Volpato, N. M. (2005) 'Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa', *Química Nova*, 28(5), pp. 852–858. doi: 10.1590/s0100-40422005000500024.
- Rocha, A. F. Da (2009) 'Cádmio, chumbo, mercúrio: a problemática destes metais pesados na Saúde Pública: monografia', p. 63. Disponível em: <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/54676>.
- Rogers, P.L., Staruszkiewicz, W. (2000) 'Histamine Test Kit Comparison', *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(2), pp. 5–16. doi: 10.1300/J030v09n02.
- Moreira da Silva, A.R. e Torrinha, M.B. (2016) *Determinação do conteúdo em ferro num solo por EAA de chama Relatório Final Métodos Instrumentais de Análise*.
- Ruxton, C. H. S. (2011) 'The benefits of fish consumption', *British Nutrition Foundation*, 36(1), pp. 6–19. doi: 10.1111/j.1467-3010.2010.01869.x.
- San Mauro Martin, I., Brachero, S. e Garicano Vilar, E. (2016) 'Histamine intolerance and dietary management: A complete review', *Allergologia et Immunopathologia*. SEICAP, 44(5), pp. 475–483. doi: 10.1016/j.aller.2016.04.015.
- SIGHI (2017) 'Dieta de eliminação da histamina'.
- Silva, C., Da Ponte, D. e Dapkevicius, M.. (2006) 'Storage Temperature Effect on Histamine Formation in Big Eye Tuna and Skipjack', *Journal of Food Science*, 63(4), pp. 644–647. doi: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15803.x.
- Medeiros de Souza, A. L., Calixto, F., Mesquita, E., Packness, P. e Azeredo, D. (2015) 'Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura', *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, pp. 1–11. doi: 10.1590/1808-1657000382013.
- Tato, I. e Martins, B. (2000) *Boas Práticas de Fabrico para a Indústria de Conservas de Peixe*. Disponível em: http://www.esac.pt/noronha/manuais/bPF_pescado.pdf.
- Technavio (2017) *Canned Food Market - Industry Analysis And Overview, Research Report*. Disponível em: <https://www.technavio.com/report/global-canned-food-market> (Acedido: 27 de outubro de 2019).
- Teixeira, J. (2019) *Qualidade em conservas de peixe*.
- Tyner, T. e Francis, J. (2017) 'Classical Methods of Analysis', in *ACS Reagent Chemicals*. ACS Publications. doi: 10.1021/acsreagents.1002.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Barreto Dias, M., Seabra, M.J., Borges, M., Fernandes, P. e Nunes, S. (2009) *Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal, ASAE*.
- Vergara-Balderas, F. T. (2016) *Canning: Process of Canning*. 3rd edn, *Encyclopedia of Food and Health*. 3rd edn. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00110-0.
- Wych, W. (1994) *Canned Sardine Project Report*. Disponível em: <http://www.frdc.com.au/Archived-Reports/FRDC Projects/1992-125.12-DLD.pdf>.
- Yamaguchi, H., Nakata, K., Tatsumi, M., Sugiki, M., Miyano, H. e Mizukoshi, T. (2018) 'Development of a novel L-histidine assay method using histamine dehydrogenase and a stable mutant of histidine decarboxylase', *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc., 570, pp. 13–20. doi: 10.1016/j.ab.2018.12.017.

Anexo A - Preparação da solução *spike* e da solução para o controlo de recuperação

- Solução *spike* de $10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

A solução foi preparada com a adição de $100 \mu\text{L}$ de solução de histamina $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $4,9 \text{ mL}$ de água destilada num tubo cónico de polipropileno com capacidade de 50 mL . Para o ensaio utilizou-se $100 \mu\text{L}$ da solução.

- Controlo de recuperação com adição de uma concentração de histamina de $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Numa amostra homogénea de 5 g foi adicionado $500 \mu\text{L}$ de solução de histamina $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. De seguida, foram adicionados $19,5 \text{ mL}$ de água destilada. Para a realização da leitura foram pipetados $100 \mu\text{L}$ da solução de amostra após incubação.

Apêndice A - *Esquema do processo de produção do pescado estudado*

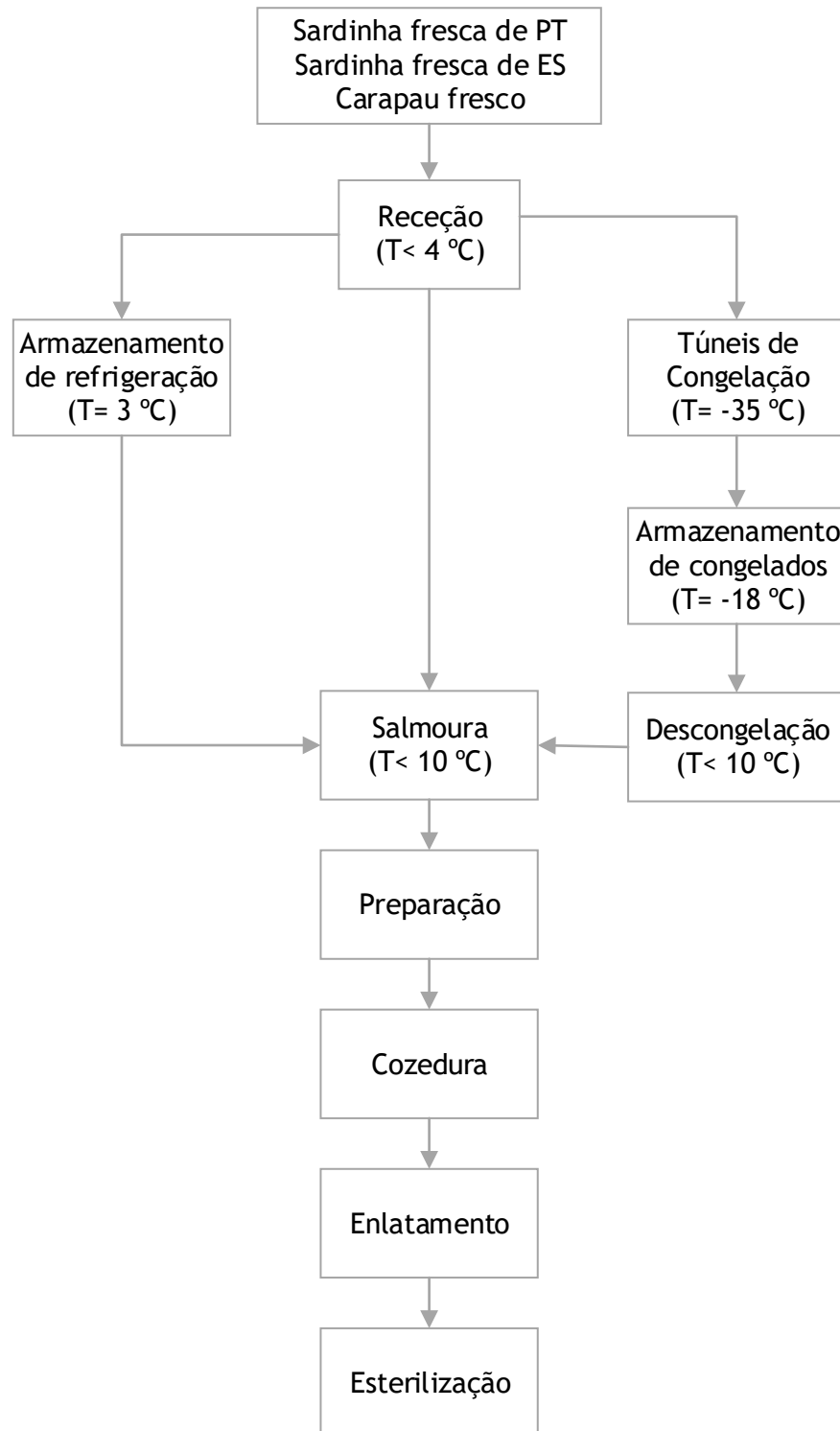


Figura 17: *Esquema do processo de produção de peixe fresco*

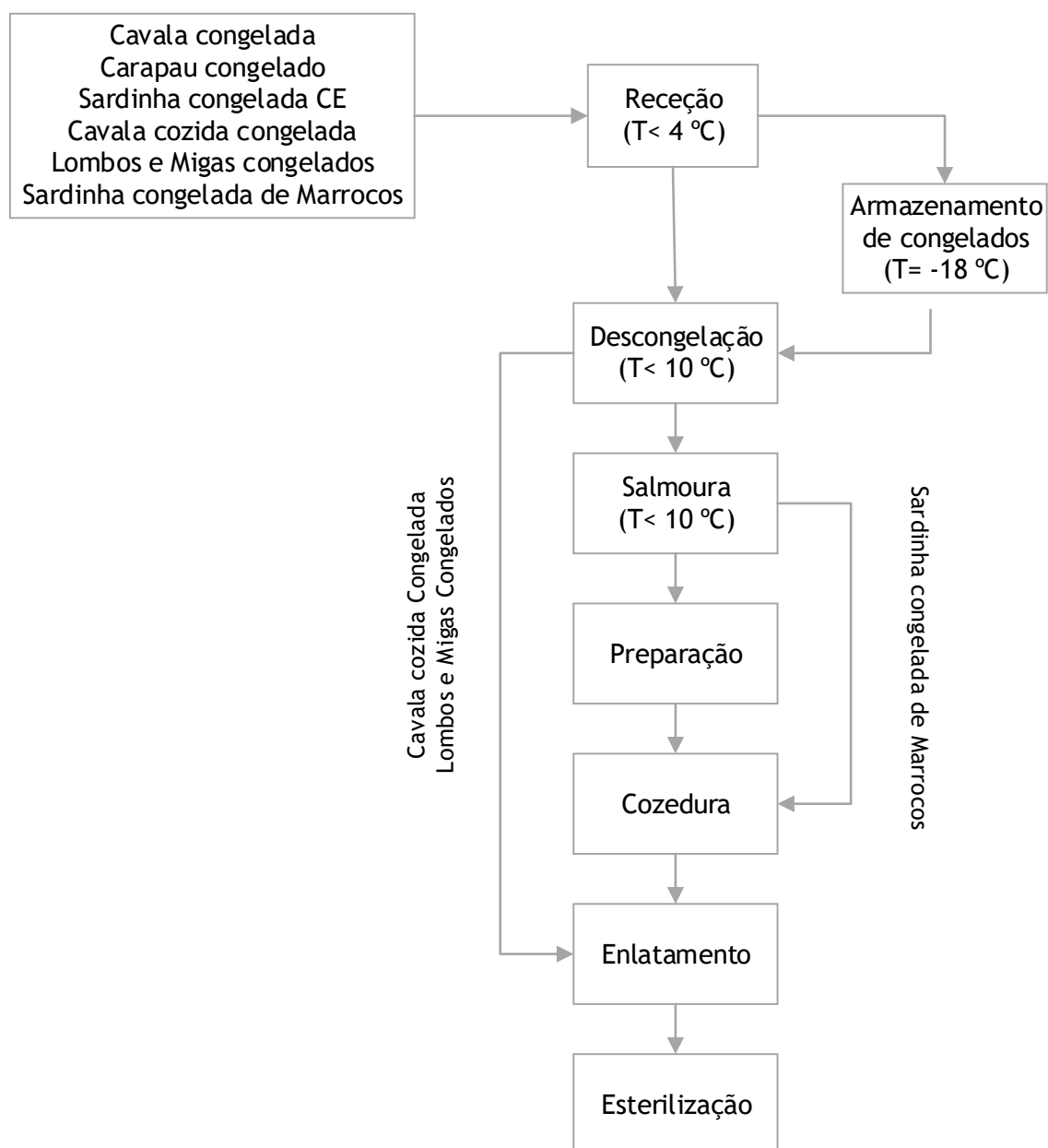


Figura 18: Esquema do processo de produção do peixe congelado

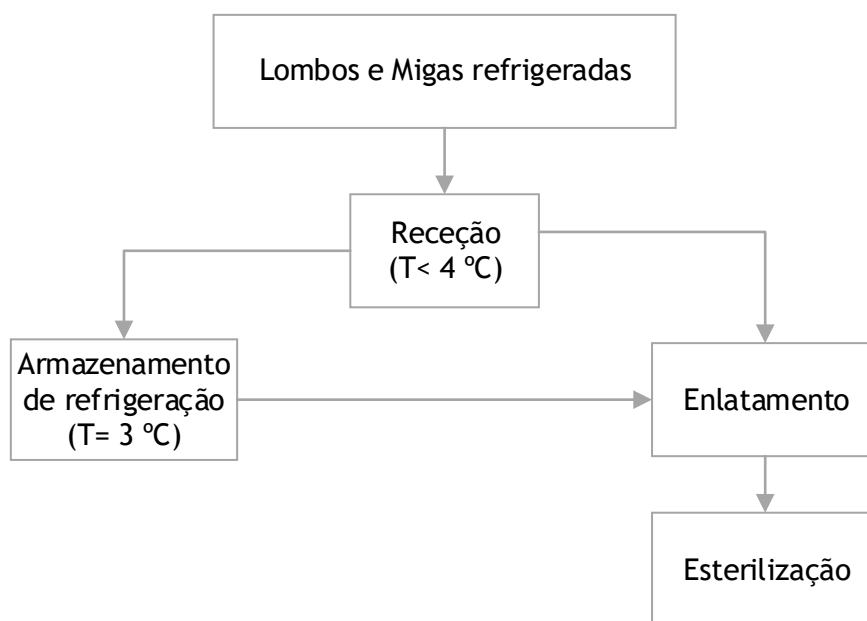


Figura 19: Esquema do processo de produção do Peixe Refrigerado (lombos e Migas refrigeradas)

Apêndice B - Características das *matérias-primas*

Tabela 8: Características das espécies estudadas

Espécie:	Carapau	Cavala
		
Corpo:	Corpo alongado em tons de azul e cinza nas costas, uma barriga prateada e flancos.	Corpo alongado e sem escamas, cor clara e prateada na barriga e cor azul esverdeado nas costas. Linhas escuras desiguais - aparência de um “tigre”.
Fauna:	Atlântico Nordeste, na Madeira e no Mediterrâneo - Habita nas áreas costeiras, da superfície ao fundo, entre 100 e 200 m de profundidade	Atlântico Nordeste e no Mediterrâneo - Habita nas áreas costeiras até 250 m de profundidade
Tamanho mínimo de captura legal:	15 cm	20 cm
Alimentação:	Pequenos crustáceos, peixes e moluscos	Peixes, moluscos e pequenos crustáceos
Pesca:	Redes de cerco, redes de arrasto e redes de emalhar	Redes de cerco, redes de arrasto e redes de emalhar
Espécie:	Sardinha	Atum
		
Corpo:	Corpo alongado coberto de escamas, com um dorso azul-prateado mais escuro e laterais e barriga prateadas mais claras.	Corpo alongado, o que o torna um excelente nadador, fazendo migrações de longo alcance em alta velocidade. Linhas verticais escuras na barriga
Fauna:	Atlântico Nordeste e no Mediterrâneo - Habita em zonas costeiras entre 25-100 m de profundidade.	Atlântico Nordeste e Mediterrâneo - Habita principalmente perto da superfície. - Pode fazer mergulhos curtos por volta dos 500 m de profundidade
Tamanho mínimo de captura legal:	11 cm	3,2 kg
Alimentação:	algas e pequenos crustáceos	lulas, crustáceos e uma variedade de peixes
Pesca:	redes de cerco	redes de cerco, redes de arrasto e redes de emalhar

Apêndice C - Obtenção da reta de Calibração para a determinação da concentração de histamina

Tabela 9: Leitura em duplicado das seis soluções-padrão

Padrão (mg·L ⁻¹)	Leitura 1		C/ enzima - S/ enzima	Leitura 2		C/ enzima - S/ enzima
	Sem enzima	Com enzima		Sem enzima	Com enzima	
0	0,021	0,049	0,028	0,055	0,086	0,031
1	0,034	0,166	0,132	-0,005	0,117	0,122
5	0,115	0,640	0,525	0,077	0,608	0,531
10	0,030	1,027	0,997	0,009	1,005	0,996
15	0,042	1,512	1,470	0,012	1,51	1,498
20	0,038	1,904	1,866	0,065	1,999	1,934

Tabela 10: Elaboração da reta de calibração

Padrão (mg·L ⁻¹)	Média Solução C/ enzima	Média Solução S/ enzima	Valores da Reta
0	0,068	0,038	0,030
1	0,142	0,015	0,127
5	0,624	0,096	0,528
10	1,016	0,020	0,997
15	1,511	0,027	1,484
20	1,952	0,052	1,900

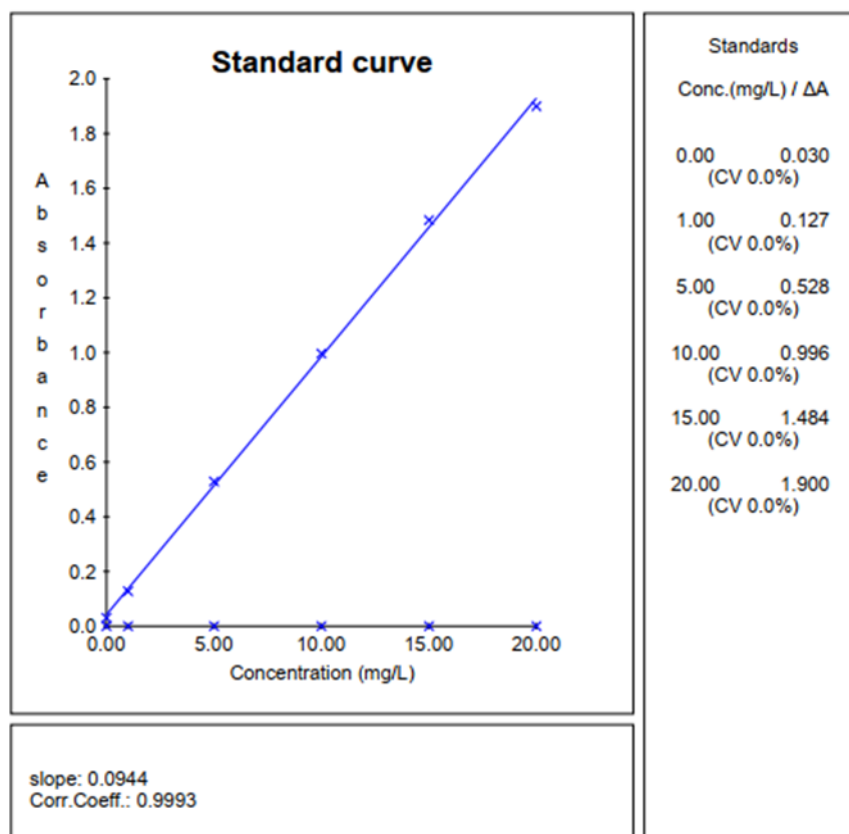


Figura 20: Curva de calibração obtida através dos padrões do kit enzimático pelo software RIDASOFT® Win.NET.lnk

Apêndice D - Resultados dos ensaios de precisão intermédia

Tabela 11: Ensaios de precisão intermédia recorrendo à utilização das soluções-padrão fornecidas pelo kit

Padrão (mg·L ⁻¹)	Média da absorvância	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
0	0,030	0,002	7,19
1	0,127	0,004	2,80
	0,171	0,013	7,44
5	0,549	0,010	1,80
	0,481	0,016	3,23
	0,561	0,014	2,52
10	0,986	0,002	0,21
	1,027	0,048	4,70
	0,908	0,019	2,10
15	1,342	0,060	4,48
	1,459	0,021	1,41
20	1,816	0,025	1,40
	1,887	0,076	4,05

Tabela 12: Ensaios de precisão intermédia recorrendo à utilização da solução spike fornecidas pelo kit

Solução Spike (mg·L ⁻¹)	Média da absorvância	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
10	0,941	0,096	10,22
	0,984	0,011	1,15
	0,987	0,050	5,09

Apêndice E - Níveis de histamina obtidos para os diferentes tipos de pescado

As tabelas em baixo representadas contemplam todos os ensaios a que o pescado foi sujeito.

Tabela 13: Ensaios para a determinação do teor de histamina no carapau fresco

Carapau Fresco	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	151,2	121,6	49,4	40,7
		64,5			
		149,1			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	21,4	91,5	62,2	68,0
		112,9			
		140,1			
	T _{ref}				
	Pós-Salmoura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 8				
	T _{ref}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-salmoura	7,9	8,5	6,7	78,4
		2,2			
		15,4			

Tabela 14: Ensaios para a determinação o teor de histamina na sardinha fresca de PT

Sardinha fresca PT	Dia 3				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	153,1	152,3	1,1	0,7
		151,1			
		152,8			
	Pós-cozedura	27,2	22,3	6,9	31,1
		n.d.			
		17,4			
	T _i				
	Pós- Salmoura	150,4	151,0	1,0	0,7
		150,4			
		152,2			
	T _{ref}				
	Pós-Salmoura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Cozedura	80,1	44,1	31,5	71,5
		21,6			
		30,5			
	T _{ref}				
	Pós-salmoura	n.d.	2,0	0,1	3,6
1,9					
2,0					

Tabela 14: Ensaios para a determinação do teor de histamina na sardinha fresca de PT (cont.)

Sarinha fresca de PT	Dia 6				
	T _{ref}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	n.d.	n.d	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 10				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	10,2	22,9	13,0	56,7
		36,2			
		22,4			

Tabela 15: Ensaios para a determinação do teor de histamina na sardinha fresca de ES

Sardinha fresca de Es	Dia 4				
	T_{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	168,5	168,1	0,6	0,4
		168,5			
		167,4			
	Pós- Cozedura	19,4	12,0	6,6	54,4
		6,8			
		10,0			
	T_i				
	Pós- Salmoura	150,4	151,4	0,8	0,6
		151,8			
		151,9			
	Pós- Cozedura	11,9	8,6	4,7	54,3
		5,3			
		n.d.			

Tabela 15: Ensaios para a determinação do teor de histamina na sardinha fresca de ES (cont.)

Sardinha fresca de Es	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	167,1	167,4	0,4	0,2
		167,3			
		167,8			
	TI				
	Pós-cozedura	21,7	15,6	5,3	33,8
		12,2			
		13,0			
	Dia 8				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	n.d.	3,8	2,0	52,1
		5,2			
		2,4			
Pós-salmoura	n.d.	-	-	-	
	n.d.				
	n.d.				

Tabela 16: Ensaios para a determinação do teor de histamina na Cavala congelada

Cavala congelada	Dia 2				
	T_{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	143,6	151,4	6,8	4,5
		154,5			
		156,2			
	Pós-Cozedura	24,0	13,8	9,0	65,2
		10,7			
		6,8			

Tabela 16: Ensaios para a determinação do teor de histamina na cavala congelada (cont.)

Cavala congelada	Dia 2				
	T _I	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	3,8	3,2	0,9	29,2
		2,5			
		n.d.			
	Pós-Cozedura	n.d.	-	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	T _{ref}				
	Pós-Salmoura	1,1 (<LOQ)	2,0	1,3	64,2
		1,5 (<LOQ)			
		3,5			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	186,8	185,4	2,0	1,1
		183,1			
		186,4			
	T _I				
	Pós-salmoura	148,8	148,8	0,4	0,3
		149,2			
		148,4			
	Pós-cozedura	5,8	6,9	2,2	31,7
		5,5			
		9,5			

Tabela 16: Ensaios a determinação do teor de histamina na cavala congelada (cont.)

Cavala congelada	Dia 6				
	T _{ref}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-salmoura	n.d.	5,1	-	-
		n.d.			
		5,1			
	Pós-cozedura	1,0 (<LOQ)	1,4 (<LOQ)	0,5	36,7
		1,7 (<LOQ)			
		n.d.			
	Dia 8				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	11,8	9,9	2,0	20,2
		7,8			
		9,9			
	T _{ref}				
Pós-salmoura	10,8	9,2	3,0	33,1	
	5,7				
	11,2				
Pós-cozedura	n.d.	1,6 (<LOQ)	0,3	17,7	
	1,8 (<LOQ)				
	1,4 (<LOQ)				

Tabela 17: Ensaios para a determinação do teor de histamina no atum

Atum	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	115,3	130,3	17,5	13,4
		149,5			
		126,1			
	Pós-Cozedura	4,1	3,2	0,9	28,4
		3,2			
		2,3			
	T _i				
	Pós- Salmoura	n.d.	-	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	176,9	176,0	1,2	0,7
		176,6			
		174,6			
	T _i				
	Pós-salmoura	9,1	7,6	1,5	19,2
		6,1			
7,6					
Pós-cozedura	4,8	3,7	2,0	52,8	
	4,9				
	1,5 (<LOQ)				
T _{ref}					
Pós-cozedura	n.d.	-	-	-	
	n.d.				
	n.d.				

Tabela 17: Ensaios para a determinação do teor de histamina no atum (cont.)

	Dia 8				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Atum	Pós-salmoura	17,0	24,2	7,3	30,2
		31,6			
		23,9			
	Pós-cozedura	14,5	10,4	3,6	34,2
		7,8			
		9,0			
	T _{ref}				
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			

Tabela 18: Ensaios para a determinação do teor de histamina na cavala cozida congelada

Cavala cozida congelada	Dia 0				
		Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	155,4	155,4	3,0	1,9
		158,3			
		152,4			
	T _i				
	Pós- Cozedura	n.d.	2,8	1,0	35,4
		3,5			
		2,1			
	T _{ref}				
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 6				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	56,3	44,7	12,5	28,1
		46,4			
		31,4			
	Dia 8				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	67,0	54,9	16,6	30,2
		61,8			
		36,0			

Tabela 19: Ensaios para a determinação do teor de histamina na sardinha congelada CE

Sardinha congelada CE	Dia 0				
		Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Salmoura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Pós-Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 1				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Salmoura	1,7 (<LOQ)	5,0	5,2	103,3
		2,4			
		11,0			
	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg.kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	99,6	111,5	30,9	27,7
		88,3			
		146,5			
	Pós- Cozedura	54,6	61,9	10,0	16,1
		57,9			
		73,3			
	TI				
	Pós-salmoura	10,5	10,7	4,5	41,8
		6,3			
		15,2			

Tabela 19: Ensaio para a determinação do teor de histamina na sardinha congelada CE
(cont.)

Sardinha congelada CE	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	94,2	74,1	17,5	23,6
		63,2			
		64,8			
	T _I				
	Pós-salmoura	173,6	177,2	3,6	2,0
		180,8			
		177,3			
	Pós-cozedura	18,3	15,1	5,0	33,0
		17,8			
		9,4			
	T _{ref}				
	Pós-salmoura	1,6 (<LOQ)	4,1	3,7	91,1
		8,3			
		2,3			
	Dia 8				
T _I	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)	
Pós-cozedura	5,3	4,4	0,8	18,7	
	3,7				
	4,3				

Tabela 20: *Ensaio para a determinação do teor de histamina na sardinha congelada de Marrocos*

Sardinha congelada de Marrocos	Dia 1				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Salmoura	3,4	3,1	1,7	55,1
		1,2 (<LOQ)			
		4,6			
	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	25,0	23,1	4,6	19,7
		26,5			
		17,9			
	Pós- Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-salmoura	179,7	179,0	0,6	0,3
		178,6			
		178,7			
	Pós-cozedura	0,9 (<LOQ)	6,6	8,8	131,6
		2,3			
		16,7			

Tabela 20: Ensaio para a determinação do teor de histamina na sardinha congelada de Marrocos (cont.)

Sardinha congelada de Marrocos	Dia 6				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-salmoura	178,8	180,2	1,3	0,7
		181,2			
		180,6			
	Pós-cozedura	2,4	3,5	1,6	44,4
		n.d.			
		4,6			
	Dia 8				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	134,0	122,8	10,6	8,6
		113,0			
		121,4			
	T _{ref}				
	Pós-salmoura	n.d.	n.d.	-	-
n.d.					
n.d.					

Tabela 21: Ensaios a determinação do teor de histamina no carapau congelado

Carapau congelado	Dia 0				
		Concentração (mg.kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Salmoura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg.kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Salmoura	16,0	19,4	6,9	35,7
		27,4			
		14,9			
	Pós- Cozedura	3,9	11,5	7,4	64,0
		18,6			
		12,1			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg.kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-salmoura	151,1	150,8	0,4	0,3
		150,4			
151,0					
Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-	
	n.d.				
	n.d.				

Tabela 21: Ensaio para a determinação do teor de histamina no carapau congelado (cont.)

Carapau congelado	Dia 6				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-salmoura	3,3	3,5	0,4	10,8
		3,4			
		4,0			
	Dia 8				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	131,1	129,0	2,0	1,6
		128,9			
		127,1			
	T _i				
	Pós-salmoura	140,7	145,9	4,5	3,1
		147,6			
		149,3			
	Pós-cozedura	15,8	16,7	2,5	15,2
		14,8			
		19,6			
T _{ref}					
Pós-salmoura	n.d.	n.d.	-	-	
	n.d.				
	n.d.				

Tabela 22: Ensaio para a determinação do teor de histamina nos lombos refrigerados

Lombos refrigerados	Dia 0				
		Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 2				
	T _I	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	T _{ref}				
	Pós-Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-Cozedura	170,9	172,3	1,9	1,1
		171,4			
		174,5			
	T _I				
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	T _{ref}				
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			

Tabela 23: Ensaios para a determinação do teor de histamina nas migas refrigerados

Migas refrigeradas	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	T _I				
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	T _{ref}				
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	29,4	28,2	1,7	6,0
		27,0			
		n.d.			
	T _I				
	Pós-cozedura	10,3	6,0	3,6	60,3
		4,1			
		3,8			
	Dia 8				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	1,0 (<LOQ)	11,2	9,1	81,4
		18,7			
		14,0			

Tabela 23: Ensaios para a determinação do teor de histamina nas migas refrigeradas (Cont.)

Migas refrigeradas	Dia 8				
	T_i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	3,6	4,6	3,6	77,7
		8,6			
		1,6 (<LOQ)			

Tabela 24: Ensaios para a determinação do teor de histamina nos lombos congelados

Lombos congelados	Dia 2				
	T _I	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós- Cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	T _I				
	Pós-cozedura	2,8	1,9	0,8	44,8
		1,6 (<LOQ)			
		1,2 (<LOQ)			
	T _{ref}				
	Pós-cozedura	n.d.	2,8	0,8	28,3
		2,2			
		3,3			
	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	166,4	171,3	4,8	2,8
		175,9			
171,7					
T _I					
Pós-cozedura	n.d.	4,7	0,2	4,6	
	4,5				
	4,8				
T _{ref}					
Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-	
	n.d.				
	n.d.				

Tabela 24: Ensaios para a determinação do teor de histamina nos lombos congelados (Cont.)

Lombos congelados	Dia 8				
	T_i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			

Tabela 25: Ensaios para determinar o teor de histamina nas migas congelados

Migas congeladas	Dia 0				
		Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-descongelação	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	Dia 2				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	2,9	1,8	1,0	53,8
		1,1 (<LOQ)			
		1,4 (<LOQ)			
	T _i				
	Pós-cozedura	2,3	2,6	0,3	11,4
		2,9			
		2,7			
	T _{ref}				
Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-	
	n.d.				
	n.d.				

Tabela 25: Ensaios para a determinação do teor de histamina nas migas congeladas (Cont.)

Migas congeladas	Dia 6				
	T _{amb}	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
	Pós-cozedura	170,9	170,5	0,9	0,5
		169,5			
		171,2			
	T _i				
	Pós-cozedura	n.d.	n.d.	-	-
		n.d.			
		n.d.			
	T _{ref}				
	Pós-cozedura	n.d.	4,8	-	-
		n.d.			
		4,8			
	Dia 8				
	T _i	Concentração (mg·kg ⁻¹)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação (%)
Pós-cozedura	10,4	8,3	3,8	45,5	
	10,6				
	3,9				