INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

PORTO

MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR – RECURSOS MARINHOS

PEIXE-ESPADA-PRETO: CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E CONSERVAÇÃO EM ATMOSFERAS MODIFICADAS

Maria Helena Morgadinho Pacheco

Dissertação de Tese submetida de acordo com os requisitos
para obtenção do grau de Mestre

15 de Julho de 1999

RESUMO

O peixe-espada-preto é uma das mais importantes espécies capturadas na ZEE nacional e muito apreciada pela população Portuguesa. Nesta medida, foi objectivo deste trabalho caracterizar o peixe-espada-preto sob o ponto de vista nutricional e estudar as alterações de qualidade registadas durante a armazenagem em refrigerado, de filetes preparados industrialmente, embalados em atmosfera modificada (70%CO_2/30%O_2), contribuindo para a definição de períodos máximos de armazenagem de filetes de peixe-espada-preto.

Os resultados da caracterização nutricional indicam que esta espécie é magra, contudo com um bom perfil de ácidos gordos, que as proteínas apresentam elevado valor biológico e que as percentagens de sais minerais são apreciáveis. É igualmente de referir que os teores em mercúrio foram sempre inferiores ao valor máximo admissível para consumo humano.

A atmosfera seleccionada revelou-se eficiente, uma vez que permitiu uma extensão do "tempo de prateleira" de sete dias, de acordo com os resultados da análise sensorial, tendo como suporte análises (bio)químicas e microbiológicas.

ABSTRACT

Black scabbardfish (*Aphanopus carbo)* is one of the most important species caught of in the Portuguese EEZ and every much appreciated by Portuguese consumers as well.

Having this in mind, it was objective of this work: (i) to characterise this species in what concerns the nutritional value, (ii) to study the quality changes observed in fish fillets prepared in industrial conditions packaged in modified atmosphere ($70\%CO_2/30\%O_2$) and stored under refrigeration, in order to define shelf life periods for the storage of black scabbardfish fillets.

Results of nutritional composition allow to conclude that species is lean, although presenting a well balanced fatty acid profile; proteins show a high biological value and the percentages of minerals are quite noticeable. It should be also stressed that the mercury levels were in all samples lower than the maximum indicated for human consumption.

The selected atmosphere was very efficient, once allow a shelf life extension of seven days, according to results from sensory analysis supported by the values of (bio)chemical and microbiological determination.

AGRADECIMENTOS

À Eng.ª Maria Leonor Nunes, pela amizade, pela sua pronta disponibilidade para a orientação deste trabalho e ainda pelo constante apoio prestado ao longo da sua realização.

À Sra Prof.ª Doutora Maria Armanda Henriques um agradecimento especial, quer na qualidade de Coordenadora deste curso de mestrado, quer no apoio que sempre disponibilizou.

À Dra Amparo Gonçalves agradeço toda a ajuda, desde o primeiro dia no laboratório até à fase final da realização desta tese, cuja ajuda foi indispensável.

À Susana Sequeira todo o empenho e colaboração nas análises bioquímicas e sensorial.

A toda a equipa do Laboratório de Microbiologia – Eng.ª Madalena, Dra Sónia, D. Lurdes, D. Ana Margarida e D. Maria do Carmo – pela imprescindível colaboração e simpatia dispensadas na realização das análises microbiológicas.

À Dra Narcisa Bandarra, ao Eng.º Irineu Batista, à Dra Helena Lourenço e à Dra Maria José e ao Dr. Rogério Mendes agradeço o apoio disponibilizado.

À Dra Teresa Pereira a sua preciosa ajuda na elaboração de alguns resultados .

A toda a equipa do DITVPP pela colaboração e simpatia demonstradas durante a realização deste trabalho, nomeadamente à D. Júlia, ao Sr. Manuel, ao Sr. Angelino e ainda à D. Teresa Menezes.

Agradeço à ArtesanalPesca a oferta dos filetes de peixe-espada-preto utilizados neste estudo.

À minha família, especialmente à minha irmã Sílvia, à minha mãe, aos meus sogros, e à minha filha Inês, agradeço o companheirismo e a total disponibilidade.

Ao meu marido, um agradecimento muito especial, pelo grande incentivo de iniciar e terminar este trabalho, pela paciência, carinho e apoio constantes ao longo de todo o tempo deste curso, principalmente nos momentos mais difíceis.

ÍNDICE

Resumo i

Abstract ii

Agradecimentos iii

Indice iv

Lista de Tabelas viii

Lista de Figuras x

Objectivo xiii

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1. GENERALIDADES SOBRE A ACTIVIDADE DA PESCA E O CONSUMO DE PESCADO EM PORTUGAL 1

1.1 A Actividade da pesca 1

1.2 Consumo e abastecimento do pescado 2

2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PESCADO 4

2.1 Água 5

2.2 Proteínas 5

2.2.1 Aminoácidos 7

2.3 Substâncias azotadas não proteicas 8

2.4 Lípidos 9

2.4.1 Lípidos principais do peixe 9

2.5 Minerais e vitaminas 10

2.6 Hidratos de carbono 12

3. ALTERAÇÕES QUALITATIVAS DO PESCADO FRESCO 12

3.1 Alterações sensoriais 13

3.2 Alterações (bio)químicas 16

3.3 Alterações físicas 20

3.4 Alterações microbiológicas 21

4.CONSERVAÇÃO DO PESCADO ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE ATMOSFERAS MODIFICADAS 27
4.1 Em que consiste 27
4.2 Como se aplicam 28
4.3 Tempo de conservação 30
4.4 Evolução das alterações do pescado em EAM 31
4.5 Segurança do pescado em EAM 40
5. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO PESCADO 40
5.1 Qualidade sensorial 41
5.2 Qualidade microbiológica 42

CAPÍTULO II — MATERIAL E MÉTODOS

A. CARACTERIZAÇÃO DO PEIXE-ESPADA-PRETO 44
A.1 Material biológico 44
A.2 Metodologia 44
2.1 Composição química 44
2.1.1 Humidade 45
2.1.2 Gordura extraível 45
2.1.3 Azoto total e proteína bruta 45
2.1.4 Cinza 46
2.2 Minerais 46
2.3 Aminoácidos totais 46
2.3.1 Hidrólise das proteínas 46
2.3.2 Doseamento e quantificação dos aminoácidos 47
2.3.3 Cálculo dos parâmetros nutricionais 47
2.4 Ácidos gordos 48

B. EVOLUÇÃO DA QUALIDADE DE FILETES DE PEIXE-ESPADA-PRETO EMBALADOS EM ATMOSFERA MODIFICADA 50
B.1 Material 50
1.1 Material biológico 50

1.2 Meios e reagentes 52
B.2 Metodologia 52
2.1 Acondicionamento em atmosfera condicionada 52
2.1.1 Embalagem 52
2.1.2 Preparação da atmosfera modificada 53
2.2 Análises 53
2.2.1 Composição centesimal das misturas 54
2.2.2 Análise sensorial 54
2.2.3 Análises bioquímicas 55
2.2.3.1 Composição química aproximada 55
2.2.3.2 Azoto básico volátil total (ABVT) 56
2.2.3.3 Azoto de trimetilamina (ATMA) 56
2.2.3.4 Azoto de óxido de trimetilamina (AOTMA) 56
2.2.4 Análise física 57
2.2.4.1 Medição do pH 57
2.2.5 Análises microbiológicas 57
2.2.5.1 Procedimento experimental 57
2.2.5.2 Quantificação dos microrganismos viáveis e pesquisa de microrganismos deteriorantes 59
2.2.5.3 Caracterização microscópica e bioquímica dos microrganismos isolados 60

CAPÍTULO III — RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. CARACTERIZAÇÃO DO PEIXE-ESPADA-PRETO 62
A.1 Características (Bio)ecológicas 62
A.2 Composição Química 63
A.3 Composição em minerais 64
A.4 Caracterização nutricional 66
4.1 Composição em aminoácidos 66
4.1.1 Valor nutricional das proteínas 68
4.2 Composição em ácidos gordos 69
4.2.1 Valor nutricional dos ácidos gordos 71

B. EVOLUÇÃO DO PEIXE-ESPADA-PRETO EM EMBALAGEM DE ATMOSFERA MODIFICADA 72
B.1 Composição centesimal das misturas 73
B.2 Análise sensorial 74
B.3 Análises (bio)químicas 80
3.1 Composição química aproximada 80
3.2 Azoto básico volátil total (ABVT), Azoto de trimetilamina (ATMA) e Azoto do óxido de trimetilamina 81
B.4 Análise física 83
4.1 Evolução do pH 83
B.5 Análises microbiológicas 84
5.1 Contagens de microrganismos viáveis 85
5.1.1 Quantificação de microrganismos totais viáveis (CTV) e produtores de H_2S em IA 85
5.1.2 Quantificação e isolamento de microrganismos viáveis em outros meios 87
5.2 Pesquisa de bactérias de deterioração 90

C. CONCLUSÕES 91
C.1 Caracterização nutricional do peixe-espada-preto 91
C.2 Evolução da qualidade de filetes de peixe-espada-preto embalados em atmosfera modificada 91

D. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 92

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 94

ANEXOS

QUADROS

		Pág.
Quadro 1	Desembarque total em Portugal, em quantidade (ton.), de peixe espada preto.	2
Quadro 2	Balança alimentar portuguesa do pescado – capitação edível diária.	2
Quadro 3	Capitação de pescado na UE – média do triénio 1992-1994.	3
Quadro 4	Composição química aproximada de algumas espécies de pescado.	4
Quadro 5	Aminoácidos essenciais nas proteínas de alguns grupos de peixes, nas da carne de vaca e do ovo (g/100g de proteína).	7
Quadro 6	Substâncias minerais essenciais para os organismos vivos.	11
Quadro 7	Tempo de duração do *rigor mortis* de algumas espécies de pescado.	13
Quadro 8	Factores limitantes do desenvolvimento de bactérias patogénicas no pescado.	26
Quadro 9	Misturas de gases recomendadas para diferentes alimentos em EAM.	29
Quadro 10	Composição gasosa do ar seco ao nível do mar.	30
Quadro 11	Qualidade/toxicidade de pescado a diferentes temperaturas.	38
Quadro 12	Tempo de conservação em atmosferas modificadas de pescado pré-tratado.	39
Quadro 13	Meios de cultura usados para a quantificação, isolamento e pesquisa de microrganismos.	52

Quadro 14	Galeria de identificação "API System" (bioMérieux).	52
Quadro 15	Análises efectuadas ao longo da conservação dos filetes de peixe-espada-preto embalados em atmosfera modificada e em ar.	53
Quadro 16	Composição química percentual da parte edível do peixe-espada-preto (sem pele preta).	63
Quadro 17	Composição mineral da parte edível do peixe-espada-preto (sem pele preta).	65
Quadro 18	Distribuição de aminoácidos totais no peixe-espada-preto e no ovo.	67
Quadro 19	Parâmetros de avaliação nutricional do peixe-espada-preto (sem pele).	68
Quadro 20	Distribuição percentual dos ácidos gordos do peixe-espada-preto (sem pele preta).	69
Quadro 21	Síntese dos teores determinados em diferentes componentes químicos do peixe-espada-preto (sem pele preta).	71
Quadro 22	Valores médios da composição química aproximada e do teor em cloretos nos filetes de peixe-espada-preto embalados em ar e em atmosfera modificada, armazenados a 2±1°C.	81
Quadro 23	Quantificação de CTV e de produtores de H_2S (ufc/g) em IA.	86

FIGURAS

		Pág.
Figura nº 1	Alteração da qualidade sensorial durante a deterioração do peixe armazenado em gelo	15
Figura nº 2	Degradação do ATP. Pi-fosfato orgânico, NH3-amoníaco; 1 a 7-enzimas	17
Figura nº 3	Produção de ácidos gordos livres no arenque armazenado a diferentes temperaturas.	20
Figura nº 4	Curva típica de crescimento microbiano.	22
Figura nº 5	Atmosfera modificada em embalagem flexível.	27
Figura nº 6	Evolução das contagens totais de microrganismos a 30°C de filetes de peixe-espada-preto em EAM a 2±0,8°C em ar.	32
Figura nº 7	Valores de pH à superfície de filetes de peixe-espada-preto conservados em EAM a 2±0,8°C e em ar.	35
Figura nº 8	Fluxograma da preparação dos ensaios de conservação.	51
Figura nº 9	Metodologia utilizada no estudo da evolução da qualidade do peixe-espada-preto.	61
Figura nº 10	Peixe-espada-preto.	62
Figura nº 11	Variação da composição da atmosfera nas embalagens dos filetes de peixe-espada-preto, armazenados a 2±1°C.	73
Figura nº 12	Evolução sensorial do cheiro dos filetes crus de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C.	74

Figura nº 13 Evolução sensorial da cor dos filetes de peixe-espada-preto, armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. 76

Figura nº 14 Evolução sensorial da textura dos filetes crus de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. 76

Figura nº 15 Evolução sensorial do cheiro dos filetes cozidos de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. 77

Figura nº 16 Evolução sensorial da cor dos filetes cozidos de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. 78

Figura nº 17 Evolução sensorial da textura dos filetes cozidos de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. 79

Figura nº 18 Evolução sensorial do sabor dos filetes cozidos de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. 80

Figura nº 19 Valores de ABVT, ATMA e AOTMA de filetes de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. 83

Figura nº 20 Valores de pH durante a armazenagem dos filetes de peixe-espada-preto em atmosfera modificada a 2±1°C. 84

Figura nº 21 Evolução das contagens dos totais em Iron Agar desenvolvidos a 5°C e 22°C, em aerobiose e anaerobiose, de filetes de peixe-espada-preto armazenados em EAM (A) e em ar (C), à temperatura de 2±1°C. 85

Figura nº 22 Evolução das contagens de viáveis em Pseudomonas CFC desenvolvidos a 5 e 22°C, em aerobiose, de filetes de peixe-espada-preto armazenados em EAM (A) e em ar (C), à temperatura de 2±1°C. 87

Figura nº 23 Evolução das contagens dos microrganismos viáveis em MRS Agar desenvolvidos a 5 e 22°C em aerobiose e anaerobiose, de filetes de peixe-espada-preto armazenados em EAM (A) e em ar (C), à temperatura de 2±1°C. 88

OBJECTIVOS DO TRABALHO

Sendo o peixe-espada-preto uma espécie muito apreciada pela população portuguesa, é de todo o interesse aprofundar o conhecimento no que respeita à sua composição química, sendo uma das finalidades desta tese inferir das características nutricionais desta espécie adquirida no mercado retalhista.

Por outro lado, é também objectivo deste trabalho contribuir para o conhecimento das alterações de qualidade registadas em filetes de peixe-espada-preto, conservados em embalagem de atmosfera modificada constituída por 70%CO_2/30%O_2, sob temperatura de refrigeração, no sentido da definição do "tempo de prateleira" deste produto de pescado.

CAPÍTULO I — INTRODUÇÃO

1. GENERALIDADES SOBRE A ACTIVIDADE DA PESCA E O CONSUMO DE PESCADO EM PORTUGAL

Desde 1970 que as capturas mundiais de espécies marinhas vêm continuamente aumentando cerca de 6% ao ano, segundo dados estatísticos da FAO (1995). Em Portugal, a produção total da pesca registou um crescimento regular de 1986 até 1992, ano a partir do qual apresentou uma tendência decrescente, cerca de 6%, embora se tenha registado uma tendência de aumento dos preços médios do pescado (DGPA, 1998). Os factores que contribuíram para esta evolução relacionam-se com a aplicação de medidas técnicas para protecção de algumas espécies, a redução da frota e alterações decorrentes da cessação e/ou diminuição de actividade em alguns pesqueiros externos.

1.1 A Actividade da Pesca

A actividade da pesca no Continente incide, principalmente, em pesqueiros situados a pouca distância da costa e explora, fundamentalmente, um pequeno grupo de espécies (sardinha, carapau, sarda, cavala, pescada, tamboril, peixe-espada, polvo e amêijoa). Nas águas das Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira, o número de bancos de pesca é reduzido, cujas espécies mais exploradas são principalmente as pelágicas entre as quais se destacam os atuns e similares, o carapau negrão e a cavala.

As embarcações polivalentes foram responsáveis por cerca de 30% das capturas. Tal facto resulta destas utilizarem diversas artes de pesca, em função da época do ano e da maior abundância das espécies que pretendem capturar, sendo o polvo, o peixe-espada-preto, o congro, a faneca, a pescada e o tamboril as mais abundantes. Na Região da Madeira e contrariando a tendência verificada para o País, observou-se, um aumento de cerca de 57%. Os atuns, o peixe-espada-preto e a cavala são as espécies mais representativas da região.Relativamente ao peixe-espada-preto as capturas a partir de 1993 apresentaram uma certa estabilidade (Quadro 1).

Quadro 1 — Desembarque total em Portugal, em quantidade (ton), de peixe-espada-preto.

Espécie	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Peixe-espada-preto	3 317	5 614	6 109	6 029	6 453	6 473	7 259	7 987	6 562	7 743	6 965

Fonte: DGPA (1998).

1.2 Consumo e abastecimento do pescado

A balança alimentar portuguesa, em termos de pescado, permite avaliar a quantidade e qualidade dos produtos da pesca que entram na dieta, conforme consta no Quadro 2 (DGPA,1998).

Quadro 2.— Balança alimentar portuguesa do pescado — Capitação edível diária.

Total do Pescado		Capitação edível diária	Capitações diárias			
	1986-1996		Proteínas	Gordura	H. de carbono	Calorias
		g		g		Kcal
•Peixe (fresco, refrigerado, congelado e em conserva).	1986	61,3	14,2	1,9	0,1	75
	1987	68,9	15,8	2,2	0,1	83
	1988	69,7	15,9	2,2	0,1	84
	1989	64,8	14,6	2,0	0,1	76
•Bacalhau e outros peixes secos, salgados, fumados e salmoura.	1990	66,8	15,1	2,0	0,1	79
	1991	68,8	15,5	2,1	0,1	82
	1992	69,0	15,6	2,0	0,1	81
•Crustáceos e moluscos (frescos, refrigerados, congelados e em conserva)	1993	69,0	15,6	2,0	0,1	81
	1994	69,3	15,7	2,0	0,1	81
	1995	68,5	15,6	2,0	0,1	81
	1996	68,8	15,6	2,0	0,1	81

Fonte: DGPA (1998).

A estrutura da dieta dos portugueses em pescado alterou-se de modo apreciável entre 1986 e

1996. O bacalhau salgado seco continuou a registar a mesma procura, o consumo de peixe diminuiu um pouco e a apetência por crustáceos e moluscos aumentou (DGPA,1998).

O pescado é um alimento essencialmente proteico, daí o interesse em conhecer o seu contributo para o consumo total de proteínas animais efectuado pelos portugueses. O consumo "per capita" de proteína de origem animal, o pescado, cresceu até 1994 (Quadro 2), tendo estabilizado a partir desse ano (DGPA,1998). O elevado valor biológico das proteínas do peixe, associado ao teor considerável em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa do tipo ω3 e à presença de diversos sais minerais, tornam o pescado um alimento de grande valor nutritivo. O reconhecimento deste facto tem levado, nos últimos anos a nível mundial, um aumento crescente no consumo dos produtos da pesca (Bandarra e Batista.,1993).

Na maioria dos países da União Europeia, a capitação de pescado (Quadro 3) é relativamente baixa comparada com a de Portugal.

Quadro 3 — Capitação de pescado na EU — média do triénio 1992-1994 (DGPA,1998).

Paises	População média (1 000 hab)	Capitação de pescado (Kg/hab/ano)	Importância relativa do pescado na dieta proteica de origem animal (%)
Portugal	9 838	**61,6**	**23,4**
Espanha	39 511	38,4	17,7
Finlândia	5 066	32,7	15,2
França	57 505	28,4	8,1
Suécia	8 703	26,9	12,8
Grécia	10 376	23,3	10,9
Itália	57 127	21,6	10,3
Dinamarca	5 183	20,1	18,1
Reino Unido	58 141	18,6	9,0
Bélgica/Luxemburgo	10 431	18,4	7,9
Irlanda	3 556	16,8	5,6
Alemanha	80 833	12,3	6,4
Holanda	15 293	11,2	5,9
Áustria	7 909	9,9	4,3
Média UE 15		**22,5**	**9,9**

No sentido de satisfazer os consumidores com clara preferência por peixe fresco relativamente ao congelado, enlatado, salgado ou mesmo fumado, têm sido levados a cabo estudos com o objectivo de aumentar o tempo de conservação do pescado fresco, utilizando gelo, ambiente refrigerado e mais recentemente a tecnologia de embalagem em atmosfera modificada conjuntamente com a refrigeração, muito vantajosa quer sob o ponto de vista do consumidor, quer do da indústria de pescado.

2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PESCADO

A composição química do pescado varia bastante de espécie para espécie, assim como entre indivíduos da mesma espécie. É função da idade, do sexo, do ambiente e da estação do ano (FAO, 1995), sendo notavelmente estreita a sua ligação com a alimentação, as migrações e as alterações sexuais associadas à desova.

A fracção edível do pescado corresponde, em regra, a cerca de 45 a 50% do peso total do seu corpo e os componentes fundamentais da parte edível são: água, lípidos e proteínas. Dos constituintes menores salientam-se as substâncias azotadas não proteicas, substâncias minerais, vitaminas e uma quantidade insignificante de hidratos de carbono (FAO, 1995).

No Quadro 4 exemplifica-se a composição química percentual dos componentes fundamentais citados anteriormente, de diferentes espécies de pescado, ou seja, peixes marinhos magros e gordos, crustáceos e moluscos.

Quadro 4 — Composição química aproximada de algumas espécies de pescado.

Espécie	Água (%)	Proteína (%)	Gordura (%)
Bacalhau – *Gadus morhua*	78-84	15-20	0,1-0,9
Enguia – *Anguilla anguilla*	60-71	14	8-31
Salmão Atlântico – *Salmo salar*	67-77	22	0,3-14,0
Truta marinha – *Salmo trutta*	70-79	19	1,2-10,8
Raia – *Raja* spp	77-82	18-24	0,1-1,6
Mexilhão – *Mytilus edulis*	80-84	9-12	0,8-2,3
Camarão do rio – *Crangon crangon*	68-70	9	15-19

Fonte: adaptado de Murray e Burt (1977).

As percentagens destes componentes do pescado têm a maior importância na definição do seu valor nutritivo, nas propriedades funcionais, nas características sensoriais, bem como na sua estabilidade durante a armazenagem em congelado. Dado o interesse dos componentes químicos para a qualidade global do pescado, analisam-se nos pontos seguintes, com mais detalhe, os componentes mais importantes.

2.1 Água

A água é o constituinte mais abundante no músculo dos produtos da pesca, cerca de 75 a 80%, valor ligeiramente superior ao existente na carne. O seu teor dentro da mesma espécie varia, regra geral, na razão inversa do teor lipídico (FAO, 1995). A água desempenha um papel relevante no processo de conservação dos produtos da pesca, pois é, em grande parte, responsável pela textura do músculo e, portanto, pela sua alteração durante a armazenagem em congelado (Sainclivier, 1983).

2.2 Proteínas

As proteínas são, como se referiu anteriormente, um dos principais constituintes dos organismos animais, pois desempenham um papel fundamental no funcionamento dos vários órgãos e no crescimento dos indivíduos. Para além de carbono, hidrogénio e oxigénio algumas contêm enxofre e fósforo. O teor em azoto nas proteínas animais é, em geral, da ordem dos 16 a 21%, de forma que, se pode calcular a sua percentagem aproximada por simples doseamento do azoto.
As proteínas do músculo do pescado são geralmente divididas em três grupos (FAO, 1995):

- Proteínas estruturais ou miofibrilares — englobam as proteínas que fazem parte da estrutura das miofibrilas (actina, miosina, tropomiosina e actomiosina), as quais perfazem no pescado 70 a 80% do total das proteínas, enquanto que nos mamíferos o valor é da ordem dos 40%;
- Proteínas sarcoplásmicas ou solúveis — abrangem mais de 100 proteínas denominadas miogénio (mioglobina, globulina e enzimas), solúveis em soluções salinas neutras de baixa força iónica (< 0,15M) e constituem 25 a 30% do total de proteínas do músculo;
- Proteínas do tecido conjuntivo — incluem as proteínas extracelulares (colagénio e elastina), funcionando como suporte das fibras. Este conjunto perfaz entre 3 a 10% do total de proteínas, respectivamente nos peixes ósseos e nos cartilagíneos;

A estrutura conformacional das proteínas do peixe é facilmente modificada pela alteração do ambiente físico. Assim, por exemplo, as características da solubilidade das proteínas miofibrilares são alteradas depois da congelação e o tratamento com concentrações elevadas de sal ou com calor poderá causar a sua desnaturação depois da estrutura primitiva da proteína ter sido irreversivelmente alterada. Quando as proteínas são desnaturadas sob condições controladas, as suas características podem ser utilizadas com fins tecnológicos. Um bom exemplo é a produção de "surimi", onde é usada a capacidade das proteínas miofibrilares formarem um gel.

A maior parte das proteínas sarcoplásmicas são enzimas que participam no metabolismo celular, tal como na conversão anaeróbia da energia do glicogénio em ATP. Se os organitos das células musculares forem rompidos, esta fracção proteica passará a incluir também as enzimas metabólicas localizadas dentro do retículo endoplasmático, das mitocôndrias e dos lisossomas, o que também acontece durante a armazenagem em gelo.

As propriedades físicas e químicas do colagénio são diferentes em diferentes tecidos, como a pele, a bexiga natatória e o miocomata no músculo. Geralmente, as fibras de colagénio apresentam nos diferentes tecidos conjuntivos, um padrão semelhante ao encontrado nos mamíferos. Contudo, o colagénio nos peixes é muito mais termolábil do que o dos vertebrados de sangue quente. As diferentes espécies de peixe contêm diferentes quantidades de colagénio nos tecidos, teorizando-se que a distribuição do colagénio reflecte o comportamento natatório das espécies. A variação da quantidade e tipo de colagénio poderá também ter influência nas propriedades texturais do músculo do peixe (FAO, 1995).

O teor proteico do pescado é geralmente expresso como proteína bruta, calculada com base no teor de azoto total multiplicado pelo factor 6,25. Este valor inclui não só as proteínas mas também outros compostos azotados não proteicos (ANP). Os teores proteicos de cada espécie são relativamente constantes muito embora possam ser influenciados por variações sazonais.

As proteínas dos peixes têm um elevado valor biológico na nutrição humana, na medida em que contêm todos os aminoácidos essenciais tal como o leite, os ovos e as proteínas da carne dos mamíferos (Sainclivier, 1983; FAO, 1995).

2.2.1 Aminoácidos

Os aminoácidos desempenham um papel importante no metabolismo dos organismos vivos, sendo essenciais na manutenção do equilíbrio azotado e na promoção do crescimento, encontrando-se no Anexo C os principais aminoácidos que fazem parte das diferentes proteínas alimentares.

A essencialidade dos aminoácidos prende-se com o facto de o organismo animal não ter capacidade para sintetizar alguns deles, sendo por isso necessário ingeri-los na alimentação. Este grupo comporta-se de maneira distinta daquele que o organismo pode sintetizar na presença dos seus precursores imediatos, designando-se por essenciais os aminoácidos que o integram. A necessidade em aminoácidos essenciais depende da espécie, da idade e da actividade do indivíduo, porém, em regra, consideram-se como essenciais para o homem os aminoácidos treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, histidina, lisina, arginina e triptofano. A lisina tem uma importância fundamental, pois entra na constituição de quase todas as proteínas dos tecidos, sendo indispensável para o crescimento. A histidina é também muito importante na síntese da hemoglobina, enquanto que os aminoácidos tirosina e fenilalalina intervêm na síntese de substâncias como as hormonas (Ferreira, 1983).

As proteínas do pescado são constituídas por aminoácidos essenciais em percentagens idênticas às de outras proteínas de origem animal, conforme se pode constatar no Quadro 5.

Quadro 5 — Aminoácidos essenciais nas proteínas de alguns grupos de peixes, nas da carne de vaca e do ovo (g/100g de proteína).

Aminoácidos essenciais	*Clupeidae*	*Salmonidae*	*Gadidae*	*Scombridae*	Ovo	Carne de vaca
Treonina	4,8	4,3	5,0	4,0	5,1	4,5
Valina	5,7	5,3	5,4	5,8	6,9	5,2
Metionina	2,9	2,6	3,2	2,6	3,4	2,7
Isoleucina	5,1	4,5	5,1	4,8	6,3	5,0
Leucina	8,2	7,0	8,4	6,9	8,8	7,8
Fenilalanina	4,0	3,7	4,4	3,4	5,6	3,8
Histidina	-	-	-	-	2,4	3,6
Lisina	9,0	8,9	9,6	8,3	7,0	8,7
Arginina	-	-	-	-	6,1	6,1
Triptofano	1,0	-	1,1	1,2	-	1,0

Fonte: Adaptado de Sainclivier (1983).

2.3 Substâncias azotadas não proteicas

Para além das proteínas, são de importância relevante as substâncias azotadas não proteicas (ANP), que, tal como o nome indica, são compostos contendo azoto, mas não de carácter proteico. A sua quantidade e composição, tanto nos peixes como nos crustáceos e moluscos, são muito específicas, contribuindo, em grande parte, para o sabor característico da carne destes produtos. São solúveis em água e com baixo peso molecular, constituindo de 9 a 18% do teor total de azoto (FAO, 1995).

Os componentes mais importantes desta fracção são bases voláteis, dos quais se salientam o óxido de trimetilamina (OTMA) e amónia, creatina, aminoácidos livres, nucleótidos, bases púricas e ainda ureia no caso dos peixes cartilagíneos. O teor e a distribuição destes compostos diferem entre peixes de água doce e salgada, sendo também função do tamanho, época do ano, tipo de músculo, etc.

O principal componente da fracção de compostos azotados não proteicos é, regra geral, a creatina que se encontra, em grande parte, fosforilada e fornece energia aquando da contracção muscular. O OTMA constitui um dos componentes característicos, mais importantes desta fracção nas espécies marinhas, sobretudo nos gadídeos, em quantidades que podem variar entre 1 e 5% (peso seco), mas está, com algumas excepções, virtualmente ausente nas espécies de água doce e organismos terrestres. É veiculado essencialmente através da alimentação (zooplâncton) (FAO, 1995). De acordo com diferentes autores citados por FAO (1995), os peixes pelágicos (sardinha, atum, carapau) possuem os teores mais elevados de OTMA no músculo escuro, enquanto que nos demersais (pescada, bacalhau) os valores mais altos encontram-se no músculo branco, todavia, com teores médios de OTMA superiores a 100mg/100g, enquanto que nos pelágicos são, em regra, inferiores a 50mg.

As substâncias ANP contêm também uma quantidade apreciável de aminoácidos livres. A importância relativa dos diferentes aminoácidos varia com as espécies, podendo destacar-se a histidina pelo facto de ser descarboxilada, microbiologicamente, a histamina, composto susceptível de provocar intoxicações. O carapau e o atum frescos têm um elevado conteúdo de histidina. A quantidade de nucleótidos e fragmentos nucleotídicos no peixe morto depende do seu estado, como se verá mais à frente.

2.4 Lípidos

O teor em matéria gorda no pescado varia ao longo do ano e de espécie para espécie, situando-se em média entre 0,5 e 25%. Com base neste teor é frequente classificar os peixes em magros, gordos e semi-gordos (Sainclivier, 1983).

Nos peixes magros o teor em matéria gorda é geralmente inferior a 5%, sendo a variação sazonal pouco expressiva. Nestas espécies a matéria gorda encontra-se essencialmente localizada no fígado e contêm poucos acilglicerídeos (35% do total de lípidos) e uma elevada percentagem de fosfoglicerídeos (65% do total de lípidos), os quais estão intimamente ligados às proteínas. Entre os peixes magros destacam-se a maruca, a dourada, a raia e a carpa.

Os peixes gordos, por seu lado, contêm em geral mais de 8% de matéria gorda. A gordura encontra-se na forma de glóbulos extracelulares no tecido muscular e na membrana serosa que envolve os intestinos e sob a forma de camadas sob a pele e na cavidade abdominal. Os teores de gordura são variáveis em função da época do ano. Estes lípidos são constituídos essencialmente por triacilgliceróis. A sardinha, o arenque, a enguia e a cavala são alguns dos principais peixes gordos.

Os peixes denominados por "semi-gordos" apresentam um teor de gordura intermédio, acumulada mais no fígado que no tecido muscular. Dentre estes, salientam-se os peixes chatos.

2.4.1 Principais lípidos do peixe

Como já se referiu, os lípidos dos peixes diferem substancialmente dos que se encontram nos mamíferos. A principal diferença é que os primeiros incluem mais de 40% de ácidos gordos de cadeia longa muito insaturada. Por outro lado, há uma maior percentagem de ácidos gordos polinsaturados com 4, 5 ou 6 ligações duplas nos peixes marinhos do que nos de água doce (cerca de 70%). Os principais ácidos gordos saturados presentes nos óleos de peixe são o mirístico C_{14} (20 a 30% do total de ácidos gordos insaturados), o palmítico C_{16} (60 a 70%) e o esteárico C_{18} (5 a 10%). Entre os ácidos gordos insaturados, a quantidade relativa dos ácidos gordos monoenóicos é por norma extremamente elevada (45 a 60% dos lípidos totais) e os mais insaturados encontram-se sobretudo na gordura dos peixes predadores, tais como dienóicos,

trienóicos, tetraenóicos, pentaenóicos e hexaenóicos. Em regra, estes últimos (Eicosapentanóico EPA20:6w3 e Docosahexaenóico DHA 20:6w3) têm elevado teor, totalizando cerca de 14 a 44% dos lípidos totais (Sainclivier, 1983).

Ao contrário das gorduras animais e dos óleos vegetais, os lípidos de peixe contêm quantidades menores dos ácidos linoleico (18:2w6) e linolénico (18:3w3). A componente lipídica do pescado engloba, essencialmente, triglicerídeos e fosfolípidos muito abundantes nos peixes gordos e magros, respectivamente. A principal característica física da matéria gorda dos animais marinhos é a sua fluidez, relativamente à dos animais terrestres. Emprega-se o termo *óleo* para designar os lípidos de peixe, que são líquidos à temperatura ambiente, enquanto que nos mamíferos se designa por gordura. Estes são constituídos principalmente por ácidos gordos, entre os quais se destacam os ácidos gordos insaturados.

A composição da gordura dos peixes marinhos é portanto complexa, mas, os principais constituintes são ácidos gordos C_{18}, C_{20} e C_{22}, encontrando-se os mais insaturados nos peixes gordos, com uma proporção de 75%. Em peixes de água doce existe uma grande quantidade de insaturados C_{16} e em C_{18}, onde os C_{16} representam 30% dos ácidos gordos totais.

Quanto à sua função, os fosfolípidos fazem parte da estrutura das membranas celulares e o colesterol contribui para a rigidez membranar em cerca de 6% (FAO, 1995). Os triglicerídeos, por seu lado, são depósitos de gordura, geralmente dentro de células especiais de gordura, circundadas por uma membrana fosfolipídica e um fraco teor de colagénio de ligação. O músculo branco de um peixe magro como o bacalhau, contém menos de 1% de lípidos mas, destes, os fosfolípidos perfazem cerca de 90%. O músculo escuro contém alguns triglicerídeos dentro das células musculares, mesmo nos peixes magros, pois este músculo é capaz de metabolizar os lípidos directamente como energia.

2.5 Minerais e vitaminas

A quantidade de substâncias minerais e vitaminas é específica das espécies e pode variar com a época do ano.

Nos peixes os minerais mais frequentes são o magnésio, o cálcio e o fósforo, para além do ferro

e cobre, sendo ainda considerados como uma importante fonte de selénio flúor e iodo, contudo o teor é muito variável, mas bastante elevado nos peixes marinhos. Muitos minerais não têm uma função biológica conhecida, enquanto que outros são considerados essenciais (Quadro 6).

Quadro 6 — Substâncias minerais essenciais para os organismos vivos, segundo Gordon (1987).

Substâncias minerais essenciais		
Na	Cu	As
K	F	Co
Mg	Fe	Cr
Ca	Ni	Si
I	Mn	Sn
P	Mo	V
Cl	Se	Zn

Os minerais essenciais são indispensáveis aos organismos vivos porque participam na formação e rigidez dos dentes e ossos, na síntese de vitaminas, enzimas e hormonas e ainda na formação de alguns tecidos cerebrais, como é o caso do fósforo. Todavia, mesmo os considerados essenciais por alguns autores (Gordon, 1986) podem ter um efeito tóxico se existirem em teores não balanceados. A maioria dos organismos aquáticos pode reter e acumular selectivamente minerais do meio ambiente. Dentre as substâncias minerais normalmente consideradas como tóxicas, destacam-se o mercúrio, chumbo e cádmio (FDA, 1993).

A concentração de minerais no peixe e produtos de pescado é, portanto, influenciada por um conjunto de factores tais como diferenças biológicas (espécie, tamanho, idade, sexo e maturidade sexual), fonte alimentar e ambiente (composição química da água, salinidade, temperatura e contaminantes), importando avaliar os minerais que o constituem com potencial toxicidade para a saúde pública, ou sejam, mercúrio, cádmio, chumbo e arsénio (Lall, 1995).

Geralmente o pescado é uma boa fonte de vitamina B e no caso de espécies gordas também de vitaminas A e D. Algumas espécies têm elevada actividade da tiaminase, sendo normalmente baixo o teor de tiamina (B_1). As vitaminas A e D, lipossolúveis, encontram-se essencialmente no fígado, enquanto que a vitamina B, hidrossolúvel, se encontra essencialmente nos olhos, intestinos e nos tecidos musculares.

2.6 Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são constituídos por carbono, hidrogénio e oxigénio, nos quais se incluem a celulose, o amido e o glicogénio, que têm como unidade constituinte a glicose. O teor em hidratos de carbono no pescado é baixo (0,01 a 0,6%). Localizam-se no músculo estriado e no fígado, onde ocorrem sob a forma de glicogénio, um polissacarídeo que se decompõe em glucose quando os peixes necessitam de fazer um esforço físico e como parte dos constituintes dos nucleótidos. Estes últimos são a fonte de ribose libertada como consequência da alteração autolítica *post-mortem*. A influência do glicogénio na qualidade do pescado assenta no facto de, ao transformar-se em ácido láctico, condicionar a extensão do *rigor mortis*, o pH do músculo, o desenvolvimento de microrganismos e a alteração da textura (FAO, 1995).

3. ALTERAÇÕES QUALITATIVAS DO PESCADO FRESCO

Após a sua morte, o peixe é alvo de várias e complexas alterações, as quais subsequentemente conduzem a diferentes estados de deterioração (Sainclivier, 1983).

Alterações do Pescado *Post-mortem*

Do mesmo modo que os mamíferos, o pescado deteriora-se em consequência de reacções químicas (continuando a actividade enzimática endógena) e do crescimento de microrganismos.

As alterações iniciam-se com a degradação dos hidratos de carbono (ATP e glicogénio), seguindo-se a degradação da gordura (auto-oxidação com formação de cetonas e a hidrólise), a degradação das proteínas (com intervenção de enzimas endógenas e bacterianas) resultando produtos como, trimetilamina, indol, sulfureto de hidrogénio, aminas biogénicas e numa fase mais avançada, a proliferação microbiana.

As alterações da estrutura proteica dos produtos de pescado podem classificar-se em sensoriais, (bio)químicas, físicas e microbiológicas.

3.1 Alterações Sensoriais

São as que dizem respeito aos atributos que impressionam os sentidos: sabor, cheiro, aparência e textura. Para a modificação destes atributos muito contribui a evolução *post-mortem* do músculo, pelo que se discute a seguir, com algum detalhe, tal evolução.

Evolução do músculo *post-mortem*

No peixe fresco, as primeiras modificações que se manifestam após a sua captura, correspondem à aparência, textura e rigidez cadavérica (*rigor mortis*). Após a morte, o metabolismo da respiração aeróbica deixa de ocorrer, por falta de oxigénio, conduzindo à formação de ácido láctico e com diminuição do nível de ATP, seguindo-se então o aparecimento do *rigor mortis*.

O início e a duração da rigidez cadavérica são função de vários factores, tais como a espécie, o estado nutricional, o tamanho, o grau de exaustão (tipo de pesca), a temperatura ambiental após a morte e o manuseamento do pescado. Relativamente à sua duração, é de notar que, por exemplo, no peixe enfraquecido pela pesca de arrasto e mantido a temperatura elevada, o período de rigidez é curto (Quadro 7). O mesmo se aplica aos peixes de pequeno tamanho e combativos e o contrário para os grandes e planos.

Quadro 7-Tempo de duração do *rigor mortis* de algumas espécies de pescado.

Espécie	Temperatura °C	Período *pré-rigor* (horas)	Tempo desde a captura até ao final de *rigor mortis* (horas)
Bacalhau do arrasto	Em gelo	2-8	20-65
	2,7	4,5-8,5	54-64
	4,5-5	5	45
	17	2-5,5	16
Bacalhau em repouso	2,7	14-15	72-96
"Red fish"	Em gelo	22	120
Badejo	Em gelo	1	20

Fonte: adaptado de FAO (1995).

Se o peixe estiver mal alimentado ou tenha estado em condição de desova, fica mais frágil e portanto o *rigor mortis* é neste caso mais profundo e rápido, sofrendo o tecido muscular ruptura imediata. Para peixes de águas temperadas o início e a duração do *rigor mortis* são muito rápidos a altas temperaturas e para peixes de águas tropicais aqueles são também muito rápidos mas a 0°C (FAO, 1995).

No que respeita ao seu início, o *rigor mortis* começa imediatamente ou pouco depois da morte, se o peixe estiver esfomeado e as reservas forem esgotadas ou ainda se o peixe estiver "stressado". O tipo de morte também influencia o início do *rigor*, ou seja, com hipotermia (morto em água gelada) o *rigor* inicia-se de imediato e é muito rápido, enquanto que uma pancada na cabeça origina um atraso de mais de 18 horas.

Tecnologicamente, o *rigor mortis* tem um papel muito importante, assim, se a filetagem ocorrer no *pré-rigor* o músculo pode, posteriormente, contrair livremente e os filetes encurtarem seguindo-se o início do *rigor*. Se os filetes forem congelados no *pré-rigor* é de esperar uma textura deficiente e uma maior perda de água aquando da descongelação. Durante o *rigor* o corpo do peixe completamente rígido provocará uma produção pobre de filetes ou, no caso de um tratamento pouco delicado, poderá acontecer "gaping", isto é, enfraquecimento do tecido conjuntivo e a ruptura do filete. Nesta fase o músculo escuro pode retrair acima de 52% e o músculo claro até 15% do comprimento primitivo. Em estado de forte rigidez, pelo contrário, os filetes podem ter uma boa qualidade, embora a filetagem à máquina seja mais difícil. Em princípio será mais prudente filetar o peixe após a rigidez cadavérica e congelá-los em seguida.

Se o peixe for cozinhado no estado de *pré-rigor* a textura será muito provavelmente macia e pastosa, mas, se for cozinhado em *rigor mortis* a textura será dura e seca. Em *post-rigor* a carne apresentar-se-á fina, suculenta e elástica após cozedura. Congelados em *pré-rigor,* tanto o peixe inteiro como os filetes poderão originar bons produtos se forem cuidadosamente descongelados a baixa temperatura, dando tempo a que se ultrapasse o *rigor mortis* do músculo (FAO, 1995).

Avaliação sensorial

Os produtos da pesca frescos apresentam cheiro agradável, aspecto brilhante, com cor bem definida, músculo firme e ao mesmo tempo elástico, pele húmida, olhos proeminentes e

brilhantes, com pupila preta e córnea convexa e transparente. Ao longo da deterioração, a superfície da pele perde o brilho, a cor e a humidade, os olhos encovam, as pupilas adquirem um aspecto leitoso e a córnea torna-se opaca e o cheiro passa gradualmente a neutro e depois a desagradável (Sainclivier, 1983).

Frequentemente as características padrão da deterioração do peixe armazenado em gelo (Fig. 1) podem ser determinadas e divididas em quatro fases:

Fase 1 — peixe muito fresco, possuindo um sabor doce e suave, a algas.

Fase 2 — perda do cheiro e sabor característicos, sem, contudo, se verificar o desenvolvimento de qualquer cheiro desagradável.

Fase 3 — sinais exteriores de deterioração e produção de um conjunto de substâncias voláteis de cheiro desagradável em função da espécie e do tipo de deterioração (aeróbia e anaeróbia). Um dos compostos voláteis mais evidente é a TMA, resultante da redução bacteriana do OTMA. A TMA confere cheiro característico a "peixum". No início desta fase, o sabor desagradável é ligeiramente azedo, afrutado e ligeiramente amargo, especialmente no peixe gordo. Nos estádios subsequentes são desenvolvidos cheiros amoniacais, a compostos de enxofre e a ranço. A textura torna-se tanto suave e hidratada como dura e seca.

Fase 4 — peixe com sinais evidentes de deterioração e pútrido.

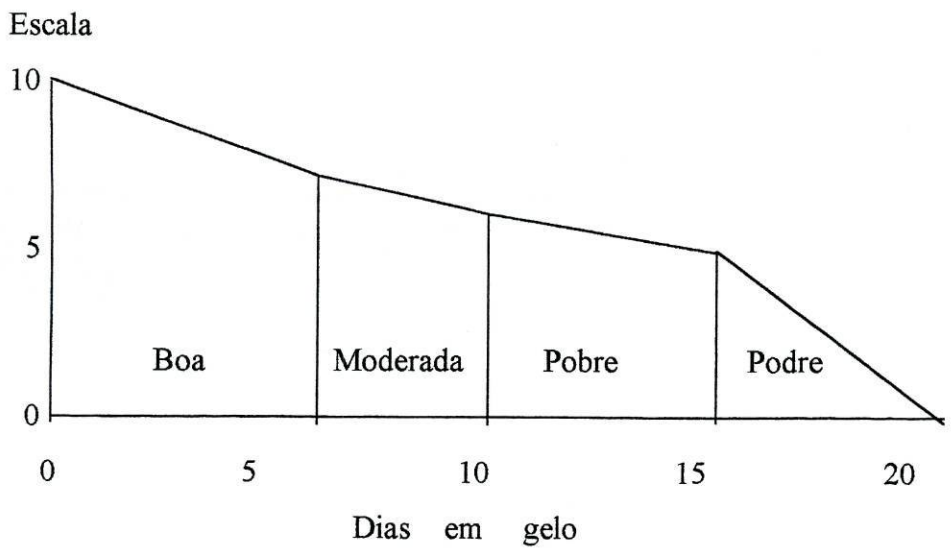


Figura 1-Alteração da qualidade sensorial durante a deterioração do peixe armazenado em gelo
Fonte: Gibson e Davis (1995).

Durante a armazenagem em refrigerado são necessários critérios de qualidade, pressupondo uma avaliação sensorial do peixe também em cozido. Pode ser então usada uma escala numérica para a avaliação sensorial do peixe cozinhado, de 0 a 10, onde 10 indica frescura absoluta, 8 boa qualidade e 6 peixe sabor neutro. O nível 4 é, em regra, de rejeição. Usando esta escala, o gráfico corresponde a uma curva sigmóide, indicando uma rápida degradação do peixe durante a primeira fase, uma variação mais suave nas fases 2 e 3 e finalmente uma alta variação quando o peixe está deteriorado. Podem porém ser usadas outras escalas.

3.2 Alterações (bio)químicas

A glicólise *post-mortem* resulta na acumulação muscular de ácido láctico, o qual provoca um abaixamento dos valores de pH do músculo. Por exemplo, no bacalhau o pH desce de 6,8 para 6,1-6,5 e nalgumas espécies de peixe o pH final poderá atingir ainda valores mais baixos.

A quantidade de ácido láctico produzido está relacionada com a quantidade de glicogénio armazenado nos tecidos vivos, que por sua vez é função do estado nutricional do peixe, do "stress" e do grau de exaustão antes da morte. Logicamente, um peixe bem descansado, bem alimentado, contém maior quantidade de glicogénio que um peixe exausto e num mesmo peixe, o teor em glicogénio é maior no músculo escuro do que no músculo claro. Em resumo, nos animais submetidos a um "stress" particular, tempos de arrasto prolongados e manuseamentos inadequados, o glicogénio esgota-se rapidamente, acelerando-se nos organismos os processos autolíticos.

Alterações autolíticas

- **enzimáticas**

Os primeiros processos de deterioração no tecido muscular dizem respeito aos hidratos de carbono e aos nucleótidos. Entre as alterações autolíticas a degradação da Adenosina trifosfato (ATP) é uma das primeiras reacções, ocorrendo do mesmo modo na maioria dos peixes, mas

variando bastante a velocidade de cada uma das reacções (de um catabolito para outro), entre indivíduos da mesma espécie.

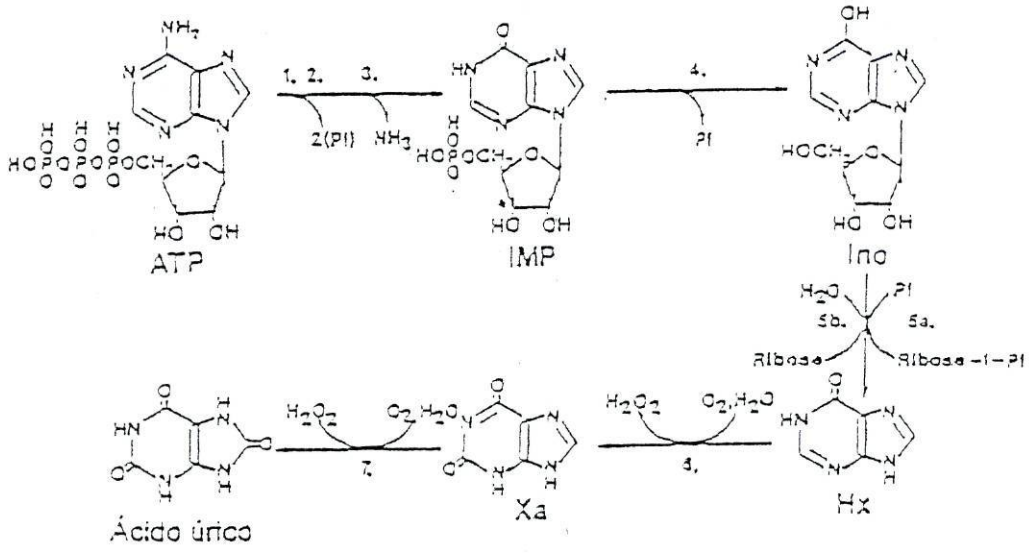


Figura 2 — Degradação do ATP. Pi – fosfato orgânico; NH_3 – amoníaco; 1 a 7 — enzimas. Fonte: (FAO, 1995).

Após uma série de reacções de desfosforilação e desaminação, o ATP degrada-se em Inosina monofosfato (IMP) e mais tarde em Inosina (HxR) que por sua vez se transforma em Hypoxantina (Hx) e Ribose (R), conforme está indicado na Figura 2, com intervenção das enzimas autolíticas — ATP-ase (1); mioquinase (2); AMP deaminase (3); IMP fosfohidrolase (4); nucleoside fosforilase (5a); inosina nucleosidase (5b); xantina oxidase (6 e 7) — e com produção de fosfato orgânico (Pi) e amoníaco (NH_3). O ácido úrico e a xantina são os compostos finais da sequência de reacções da degradação do ATP no músculo do peixe.

Não existem muitas dúvidas que o manuseamento físico acelera as alterações autolíticas no peixe refrigerado, pois as enzimas autolíticas, normalmente compartimentadas, ficam em íntima mistura com o substrato quando sujeitas a abusos físicos. O esmagamento do peixe por gelo, ou até por outro peixe, pode afectar seriamente a sua edibilidade, mesmo quando a carga bacteriana é reduzida, demonstrando-se assim a importância dos processos autolíticos.

O efeito dos produtos da degradação autolítica na qualidade sensorial é apenas parcialmente compreendido. A IMP é responsável pelo desejável sabor a peixe fresco, o qual está apenas

presente em pescado de elevada qualidade. Assim, a IMP, tal como outros nucleótidos, confere um sabor intenso ao pescado, mesmo quando presente em fracas concentrações, e em associação com o ácido glutâmico que tem um "gosto de carne", confere ao pescado um sabor frequentemente designado como "sabor umami". A inosina é praticamente desprovida de sabor, embora a hipoxantina tenha a propriedade de, no decurso da sua deterioração, dar um certo gosto amargo ao peixe. A perda de gosto do tecido do peixe pode então ser atribuída à degradação da IMP.

Ao nível das proteínas, as alterações bioquímicas são menos pronunciadas do que nos nucleótidos. A actividade de endoenzimas presentes no músculo do peixe (proteases, peptidases, catepsinas, etc.) vai desempenhar um importante papel na degradação de peptídeos e proteínas, favorecendo assim o meio ideal para o crescimento e proliferação dos microrganismos degradativos. Durante a armazenagem em refrigerado, as fibrilas de colagénio (que se ligam ao miocomata) deterioram-se devido provavelmente à acção das colagenases autolíticas e que poderão causar o "gaping" durante a armazenagem em gelo ou a ruptura do miotoma na curta armazenagem em altas temperaturas. As enzimas digestivas têm também um papel importante na autólise no peixe inteiro, sobretudo, quando este não é eviscerado. As enzimas exógenas são quantitativamente dependentes do número de bactérias presentes e poucas são susceptíveis de serem utilizadas na determinação do grau de frescura.

- **desidratação**

Todos os tipos de carne perdem água mesmo quando refrigerados. Este fenómeno tem lugar da superfície para o interior e é acompanhado pela desnaturação da proteína. A desidratação dá-se a partir da superfície para a atmosfera que envolve o produto, até se estabelecer um equilíbrio. Paralelamente, observam-se alterações de textura que a tornam normalmente desagradável ao consumidor.

- **produção de aminoácidos livres, aminas e outros produtos**

O conteúdo qualitativo e quantitativo em aminoácidos livres e aminas no pescado reflecte o seu grau de frescura. A cavala, por exemplo, apresenta nos músculos grandes quantidades de

aminoácidos essenciais, principalmente histidina e esta ao degradar-se produz principalmente histamina e derivados do imizadol. Outras aminas potencialmente tóxicas produzidas são a putrestina e a cadaverina (FAO, 1995). Nas fases mais adiantadas das alterações aparecem também indol, amoníaco e sulfureto de hidrogénio. Os aminoácidos livres produzidos pela autólise das proteínas não só diminuem a aceitabilidade comercial das espécies pelágicas, como parece proporcionarem um ambiente de crescimento óptimo para as bactérias de deterioração.

O OTMA existente nos peixes de água salgada é por vezes convertido pela OTMAase dimetilase em dimetilase (DMA) e formaldeído (FA). A determinação do azoto de trimetilamina (ATMA) e do azoto básico volátil total (ABVT) é frequentemente utilizada para avaliar a qualidade do pescado.

As alterações autolíticas afectam tanto a comestibilidade do peixe fresco como do congelado, sendo a ruptura celular muscular considerada o factor mais importante para a autólise.

Alterações lipídicas – **oxidação e hidrólise lipídicas**.

A fracção lipídica também é objecto de importantes modificações durante a conservação do pescado fresco, devido a reacções de oxidação e hidrólise. Estas dão origem a um conjunto de substâncias que do ponto de vista da qualidade, causam problemas sérios, tais como o aparecimento de um odor e de um sabor a ranço, principalmente nos peixes gordos e alterações na textura (FAO, 1995).

O processo de auto-oxidação envolve o oxigénio do ar e os lípidos insaturados. Assim, a elevada percentagem de ácidos gordos polinsaturados presentes na fracção lipídica do pescado torna-o altamente susceptível à oxidação através de um mecanismo autolítico. Num primeiro passo, após a formação de radicais, ocorre a produção de peróxidos que não conferindo nenhum sabor ao pescado, podem, contudo, fomentar o aparecimento de uma coloração castanha ou amarelada no músculo. Segue-se a rápida degradação dos peróxidos que origina então a formação de aldeídos e cetonas, compostos estes que conferem um forte sabor a ranço. A oxidação pode ser iniciada e acelerada pelo calor, luz e algumas substâncias orgânicas e inorgânicas como os iões cobre e ferro. Certos aminoácidos livres (triptofano, prolina) têm de certo modo uma acção inibidora sobre a rancificação (FAO, 1995).

Nas reacções de hidrólise a gordura é convertida em glicerol e ácidos gordos livres. Este processo pode ser catalisado por lipáses próprias ou de origem microbiana. No peixe magro, como por exemplo o bacalhau do Atlântico, a produção de ácidos gordos livres é minimizada a baixas temperaturas (Fig. 3).

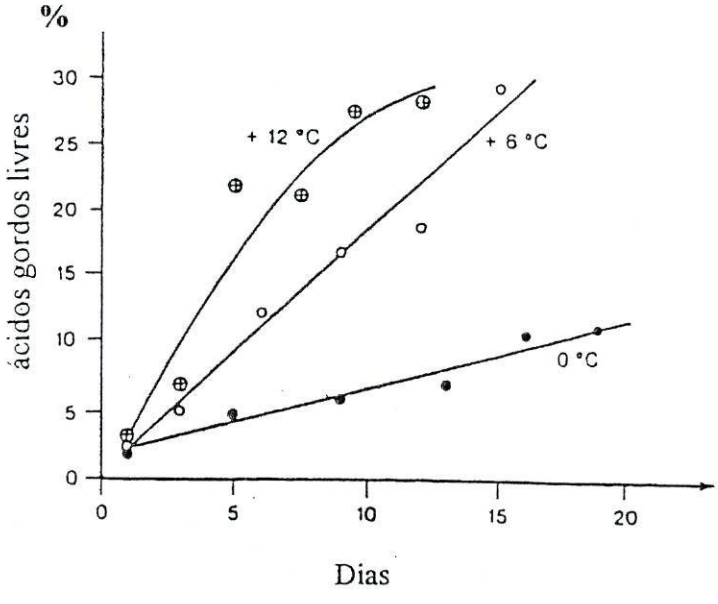


Figura 3 – Produção de ácidos gordos livres no arenque armazenado a diferentes temperaturas. Fonte: Huss (1988).

As enzimas responsáveis parecem ser fosfolipases. Os ácidos gordos ligados aos fosfolípidos são em grande parte polinsaturados e, consequentemente, a hidrólise muitas vezes leva também à potenciação da oxidação. Os ácidos gordos livres por si só podem causar um sabor desagradável (FAO, 1995).

3.3 Alterações físicas

O pH do tecido muscular do peixe vivo é praticamente neutro, registando-se, tal como se referiu atrás, uma redução na fase *post-mortem* inicial. Quando o pH diminui, as proteínas do músculo sofrem parcial desnaturação, perdendo alguma da sua capacidade de retenção de água.

A variação do pH depois da morte é o factor com maior incidência na textura da carne do peixe e no grau de ruptura do tecido conjuntivo. Em regra, a resistência mecânica é quatro vezes maior a pH 7,1 doque a pH 6,2 facto este de considerável interesse tecnológico. Certos autores (Huss,

1988, citando Jason e Lees, 1971) sugerem que a diminuição rápida da resistência mecânica que ocorre algumas horas após a morte é devida a uma desorganização da estrutura ordenada da água à superfície das proteínas. A diminuição gradual da resistência que se observa será devida à ruptura das membranas celulares. No tecido muscular as membranas são impermeáveis a certos iões, criando-se assim um potencial eléctrico em cada uma delas, de que resulta um aumento da resistência. Durante a armazenagem, a permeabilidade das membranas aos iões aumenta, com consequente diminuição da resistência dos tecidos.

3.4 Alterações microbiológicas

A carga microbiana no peixe fresco é muito variável e resultante do ambiente, sendo da ordem de 10^2 a 10^7 ufc/cm^2 de pele e de 10^2 a 10^9 ufc/g de brânquias e de intestinos (Huss, 1988). Quando capturado em águas temperadas a flora é dominada por bactérias psicrotróficas (crescimento óptimo a cerca de 25°C mas, capazes de crescer à temperatura de 0°C) Gram negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas pertencentes aos géneros *Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Flavobacterium, e Shewanella.* Muitas das *Vibrionacea* (*Vibrio* e *Photobacterium*) e *Aeromonadacea* (*Aeromonas* spp) são também bactérias aquáticas comuns e típicas da flora do pescado (FAO, 1995*)*. Também se encontram microrganismos Gram positivos pertencentes aos géneros *Micrococcus, Bacillus, Lactobacillus, Clostridium* e *Coryneformes.* Em águas poluídas, pode ser encontrado um elevado número de *Enterobactereacea* que, todavia, não são frequentes em águas temperadas.

Invasão bacteriana

Como já foi referido, o pescado fresco alberga uma microflora heterogénea considerável. A contaminação inicial ocorre logo que o pescado chega ao convés de um navio, onde pode ficar várias horas exposto ao sol e a evisceração pode ainda aumentar a carga microbiológica através de contaminação cruzada. Se o pescado for bem lavado, a maioria dos organismos na superfície pode ser eliminada. Quando é colocado em gelo ou em água do mar refrigerada podem ocorrer contaminação cruzada e algum crescimento psicrotrófico. Durante a armazenagem alguns deles desenvolver-se-ão mais acentuadamente que outros, dadas as condições de temperatura, potencial redox, atmosfera e interacções microbianas (Dalgaard *et al.*,1997).

Em regra, durante a conservação do pescado fresco, o crescimento microbiano apresenta uma curva típica (Fig. 4), onde a duração de cada uma das fases de crescimento depende de vários factores, principalmente da contaminação inicial.

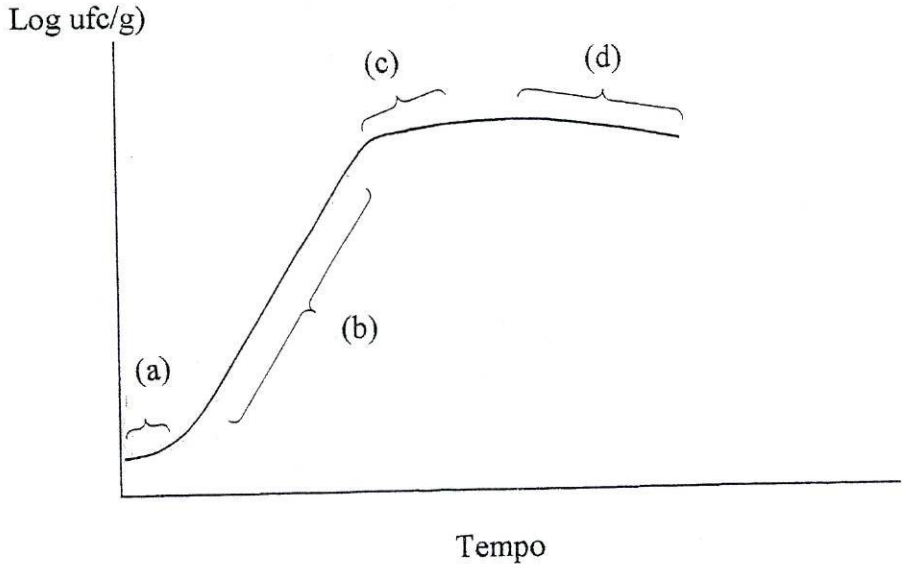


Figura 4-Curva típica de crescimento microbiano. (a) – fase de latência; (b) – fase exponencial; (c) – fase estacionária; (d) – fase de declínio. Fonte: Stanier *et al.* (1996).

Na fase inicial ou de latência, os microrganismos apenas aumentam de tamanho, evidenciando grande actividade metabólica. Durante a fase exponencial regista-se intensa actividade metabólica dos microrganismos mais competitivos e velocidade máxima de síntese e crescimento possíveis, atingindo, em condições aeróbias, níveis da ordem de 10^8 - 10^9 ufc/g de tecido. O decréscimo de velocidade de crescimento ocorre, então, até à estabilização do seu número, na fase estacionária. Na fase de declínio, os microrganismos são incapazes de proliferar, surgindo então a sua morte.

Mecanismo e flora de deterioração

Uma clara distinção deverá ser feita entre os conceitos flora de deterioração e bactérias de deterioração, uma vez que o primeiro descreve meramente os microrganismos presentes no peixe deteriorado, enquanto o último corresponde ao grupo específico que produz odores e sabores associados à deterioração. Uma parte dos microrganismos presentes no peixe deteriorado não tem nenhum papel na deterioração. Cada produto de pescado terá as suas próprias bactérias específicas de deterioração e é o número destas que estará, contrariamente ao número da

contagem total, relacionado com o "tempo de prateleira" (FAO, 1995). Apenas alguns grupos taxonómicos, que englobam os microrganismos Gram negativos psicrotróficos, parecem contribuir fortemente para a deterioração dos produtos (Gram *et al.*, 1987).

O termo deterioração relaciona-se especificamente com a impressão sensorial do produto. Os cheiros e sabores desagradáveis são os principais sintomas de deterioração e o seu desenvolvimento coincide frequentemente com a presença de elevado número de microrganismos. Geralmente é assumido que os dois factores estão relacionados mas, para induzir a produção daqueles cheiros e sabores são necessários valores das contagens bacterianas na ordem de 10^7 ufc/g ou superior (Huss *et al.*, 1986).

A microflora de deterioração pode ser testada pela capacidade de causar cheiros desagradáveis e produzir compostos associados à deterioração. Lone Gram (1987) considerou como características principais das bactérias de deterioração do pescado, a capacidade de reduzir o OTMA e de produzir sulfureto de hidrogénio (H_2S). A produção bacteriana de sulfureto de hidrogénio (H_2S) é a causa mais comum de deterioração no peixe refrigerado. Segundo Gorzcycker *et al.* (1985) a capacidade das bactérias produzirem cheiros desagradáveis, pode não coincidir com a capacidade de produzir H_2S. Quando armazenado aerobiamente são necessárias contagens de 10^8-10^9 ufc/g de bactérias específicas de deterioração no peixe para tal.

Segundo Liston (1980), a deterioração no pescado resulta de bactérias, pertencentes aos géneros *Pseudomonas* spp e *Alteromonas* spp de acordo com a sequência sintetizada do seguinte modo:

1. Bactérias de deterioração naturalmente presentes no pescado.
2. Aminoácidos e outros substratos azotados presentes.
3. Proliferação selectiva de microrganismos (principalmente *Pseudomonas*) os quais desaminam os aminoácidos.
4. Inibição da produção de proteínases devido à utilização selectiva de aminoácidos pelas bactérias *Pseudomonas*.
5. Passagem de aminoácidos para o substrato por acção de bactérias intervenientes na hidrólise das proteínas.
6. Intensa formação de amónia e ácidos gordos voláteis devidos a 5.
7. Produção de compostos responsáveis pelo odor, alguns dos quais contendo enxofre, por grupos específicos de bactérias.

Em condições anaeróbias ou com teores baixos de oxigénio (armazenagem em vácuo ou em água do mar refrigerada) a carga microbiana é mais fraca, não ultrapassando 10^6 ufc/g de peixe. O crescimento das bactérias que consomem O_2 resulta em nichos anaeróbios ou microaerófilos no peixe, mas não favorecendo necessariamente o crescimento de bactérias anaeróbias (Stammen *et al.*, 1990).

É porém típico de muitas bactérias específicas da deterioração no peixe a utilização do OTMA como receptor de electrões numa respiração anaeróbia. Assim, na ausência total ou parcial de oxigénio, é favorecido o crescimento de bactérias capazes de reduzir o OTMA a TMA (FAO, 1995). Contudo, muitos autores (Huss, 1988, citando Shaw e Shewan,1968) põem em dúvida a existência de uma correlação directa entre o teor de TMA e a qualidade sensorial do peixe. A TMA no peixe fresco, tem um cheiro típico a peixe, cujo teor, na altura da rejeição sensorial varia entre as espécies, com valores à volta de 10-15mg TMA-N/100g, em peixe armazenado aerobiamente e de 30mg TMA-N/100g em bacalhau embalado em atmosfera modificada (Dalgaard *et al.*, 1993). A bactéria *Shewanella putrefaciens* tem sido considerada o principal microrganismo de deterioração do peixe a 0°C, utilizando OTMA na respiração anaeróbia para produzir H_2S, com utilização da cisteína. A redução de OTMA é ainda associada aos géneros *Alteromonas*, *Photobacterium* e *Vibrio* e ainda *Aeromonas* e *Enterobacteriaceae* (FAO, 1995).

Alterações em diferentes condições de armazenagem

A temperatura influencia bastante tanto a actividade microbiológica como a actividade enzimática, independentemente da atmosfera envolvente. O tempo de prateleira dos produtos de pescado é, todavia, aumentado quando são armazenados a baixas temperaturas. No peixe capturado em águas temperadas, as bactérias poderão entrar na fase exponencial de crescimento quase imediatamente *post-mortem* e em refrigerado, provavelmente porque a microflora está já adaptada a temperaturas semelhantes. Na armazenagem à temperatura ambiente é atingido um nível ligeiramente mais baixo, 10^7-10^8 ufc/g, em apenas 24 horas.

A microflora responsável pela deterioração do peixe fresco modifica-se com as alterações na temperatura de armazenagem. A baixas temperaturas (0-5°C) *S. putrefaciens*, *P. phosphoreum*, *Aeromonas* spp *e Pseudomonas* spp causam deterioração. Contudo, às temperaturas de 15-30°C são responsáveis pela deterioração do pescado diferentes espécies de *Vibrionaceae*

(provavelmente devido ao seu tempo de geração, a esta temperatura, ser apenas de cerca de 30 minutos), *Enterobacteriaceae* e organismos Gram positivos, assim como *S. putrefaciens* a 20°C (Gram *et al.*, 1987; Gram., 1992). *P. phosphoreum* é uma bactéria específica de deterioração de peixe embalado em CO_2.

Alterações bioquímicas induzidas pelo crescimento bacteriano

Na deterioração do pescado a maioria dos compostos voláteis libertados é produzida por bactérias. Estes compreendem a TMA, compostos voláteis de enxofre, aldeídos, cetonas, ésteres, hipoxantina e outros compostos de baixo peso molecular.

Os substratos para a produção dos compostos voláteis são hidratos de carbono (lactato e ribose), nucleótidos (inosina monofosfato e inosina) e outras moléculas azotadas não proteicas. Os aminoácidos são substratos importantes para a formação de sulfitos e amónia. A degradação dos ácidos aminados sulfurados (cisteína e metionina) conduz à formação de compostos de enxofre como H_2S, CH_3SH_4 e $(CH_3)_2S$ por bactérias como *S. putrefaciens*, conferindo ao peixe um cheiro fétido, mesmo quando estão presentes em níveis muito baixos.

O peixe armazenado durante um período prolongado em condições anaeróbias, apresenta uma produção importante de amoníaco (NH_3) também em consequência da degradação dos aminoácidos pelas bactérias anaeróbias pouco proteolíticas (*Fusobacterium*). A acumulação de ácidos gordos de baixo peso molecular (ácido acético, butírico e propiónico) contribui ainda para a produção de compostos voláteis (FAO, 1995).

Bactérias patogénicas

O pescado é também portador de um conjunto de bactérias patogénicas para as quais é necessária uma grande atenção aquando da sua conservação.

Existem, no entanto, factores limitantes do desenvolvimento das bactérias patogénicas indígenas que ocorrem normalmente no pescado, estando destacados os mais importantes no Quadro 8.

Quadro 8-Factores limitantes do desenvolvimento de bactérias patogénicas no pescado.

Bactérias patogénicas	Temperatura (°C)		pH	NaCl (%)
	mínima	óptima	mínimo	máximo
Clostridium botulinum				
tipo proteolítico A, B, F	10	35	4,0 – 4,6	10
tipo não proteolítico B, E, F.	3,3	30	5,0	3 – 5
Aeromonas spp	0 – 4	20 – 35	4,0	4 – 5

Fonte: FAO (1995).

4. CONSERVAÇÃO DO PESCADO ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE ATMOSFERAS MODIFICADAS

4.1 Em que consiste

O aumento da procura de produtos da pesca frescos tem conduzido à aplicação de novos métodos de conservação, de modo a prolongar o seu "tempo de prateleira". Dentre eles a conservação por embalagem em atmosferas modificadas (EAM) tem demonstrado ser um método eficaz na conservação dos produtos alimentares frescos. incluindo os peixes. As EAM são utilizadas já há algum tempo e actualmente os vários estudos têm contribuído bastante para a sua utilização na comercialização do pescado.

Uma embalagem em atmosfera modificada resulta da substituição do ar existente dentro da embalagem por uma mistura de gases, onde a proporção de cada um deles é fixada no momento da introdução da mistura, sem qualquer controlo adicional, durante o período de armazenagem. Numa embalagem em atmosfera controlada (EAC) a composição dos gases é controlada de forma contínua ao longo do período de armazenagem.

O objectivo desta modificação do meio circundante do produto é prolongar o período de conservação. Nas atmosferas modificadas (Fig. 5) o ar é, em regra, substituído por azoto, dióxido de carbono, oxigénio bem como por misturas destes que actuam ao nível do produto e dos microorganismos contaminantes. A aplicação desta técnica permite controlar reacções químicas, enzimáticas e microbianas e consequentemente retardar ou minimizar as principais alterações.

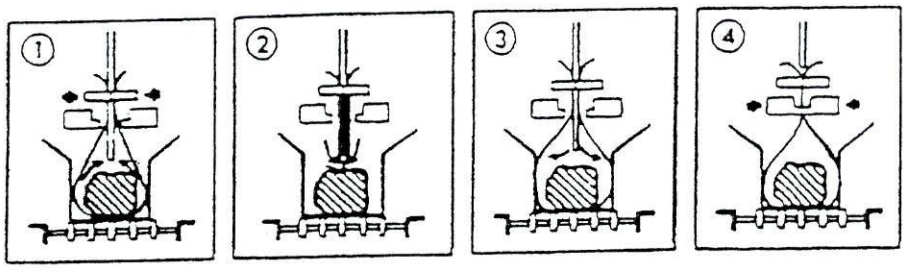


Figura 5-Atmosfera modificada em embalagem flexível. 1) início do vácuo; 2) aderência do saco à amostra; 3) injecção da mistura gasosa; 4) soldadura;
Fonte: adaptado de Floros (1990).

Os métodos de conservação tradicionais de filetes de peixe fresco podem ser assim preteridos por aqueles que conservam o pescado, em benefício das EAM, aumentando o seu "tempo de prateleira" e fornecendo, subsequentemente, ao consumidor um produto de qualidade (Reddy *et al.*, 1997). Porém, a extensão do tempo de conservação do peixe fresco é menor que noutros produtos alimentares armazenados em EAM com níveis elevados de CO_2 (25%-100%).

Este processo apresenta vantagens e desvantagens, em relação às tecnologias tradicionais. Os aspectos considerados mais relevantes e vantajosos são, para além do aumento do período de conservação do pescado em refrigerado, a apresentação com um aspecto atraente, permitindo uma fácil apreciação do produto sem cheiro numa embalagem robusta, estanque, fácil de rotular e de manusear. As desvantagens dizem respeito, principalmente, aos custos do equipamento em contínuo e das películas de plástico (cerca de duas vezes mais cara que a embalagem a vácuo), do transporte e da armazenagem dado o maior volume que estas embalagens ocupam durante a conservação em refrigerado. Outro problema diz respeito às paredes da embalagem que podem colapsar quando a atmosfera contém uma elevada percentagem de CO_2 por este se solubilizar na carne do peixe, com probabilidade de ocorrer a formação de exsudado quando se usarem misturas ricas em CO_2, o que se pode reduzir escolhendo-se a mistura mais adequada e usando materiais absorventes por baixo do produto ou ainda usando cloreto de cálcio ou sal.

4.2 Como se aplicam

As atmosferas modificadas são, por norma, ricas em CO_2 e podem ter ou não oxigénio, verificando-se durante a armazenagem, uma certa alteração nas percentagens dos gases. A relação entre a atmosfera e a massa do pescado mais frequentemente sugerida é de 2:1 (Gibson e Davis, 1995). No Quadro 9 indicam-se as misturas de gases recomendadas para a armazenagem em atmosfera modificada de diversos produtos alimentares.

As proporções recomendadas de gases são variadas, em função da espécie. Para peixes magros, crustáceos (lagostim, camarão) e moluscos bivalves, a atmosfera típica aconselhada é constituída por CO_2(40%)/N_2(30%)/O_2(30%). No caso das espécies gordas, salmão, truta e produtos fumados, a mistura que parece ser mais eficiente é constituída por CO_2(60%) e N_2(40%), não sendo aconselhável a adição de O_2.

Quadro 9 – Misturas de gases recomendadas para diferentes alimentos em EAM

Alimentos	O_2 (%)	CO_2 (%)	N_2 (%)
Carnes vermelhas	60-85	15-40	-
Carnes cozidas	-	20-25	65-80
Pescado magro	30	40	30
Pescado gordo	-	60	40
Queijo duro	-	100	-
Pão	-	60-70	30-40
Frutas e hortaliças	3-5	3-5	85-95
Alimentos secos/tostados			100

Fonte: Davis (1995).

A embalagem dos produtos pode ser manual ou mecânica e em qualquer dos casos pode usar-se um material flexível ou uma caixa/tabuleiro que posteriormente é envolvido por um filme plástico. Há, contudo, máquinas mais sofisticadas produzindo embalagens em contínuo, com bases rígidas a partir de rolos de películas de plástico.

O material que envolve o produto é de importância crucial no êxito da conservação em atmosferas modificadas. É importante que as películas utilizadas nestas embalagens tenham uma baixa permeabilidade aos gases a utilizar. Assim, pouco interessa seleccionar a atmosfera correcta, se as propriedades "barreira" do material plástico permitirem que a referida atmosfera seja rapidamente alterada. Nesta medida, a fim de manter a composição gasosa ou a ausência desta, é necessário utilizar um material complexo de camadas múltiplas que, para além de uma certa impermeabilidade, assegure a resistência mecânica, pois a embalagem deve estar igualmente preparada para não rasgar com facilidade. O policloreto de vinil (PVC), as polamidas (PA), o polipropileno (PP), o poliestireno (PS), os poliesters (PET), etc. são os materiais mais usados dada a resistência mecânica. Outro factor a ser considerado é a integridade do fecho da embalagem.

A taxa de permeabilidade da embalagem e o volume do espaço livre são factores que necessariamente têm que estar associados ao gás ou mistura necessários para a inibição microbiana. Assim, quanto menor for a taxa de permeabilidade e maior o volume do espaço livre

da embalagem, maior será o prolongamento da vida útil do produto. Não basta que o material de embalagem, apresente baixa permeabilidade ao O_2, deve ser também uma excelente barreira ao CO_2, pois este gás está presente normalmente em concentrações bastante superiores à atmosfera exterior (Quadro 10) e a sua taxa de permeabilidade é 2 a 4 vezes maior que a do O_2.

Quadro 10 – Composição gasosa do ar seco ao nível do mar.

Gas	Percentagem
Azoto (N_2)	78,03
Oxigénio (O_2)	20,99
Argon (Ar)	0,94
Dióxido de carbono (CO_2)	0,03
Hidrogénio (H_2)	0,01

Fonte: Davis (1995)

4.3 Tempo de conservação

Numerosos estudos têm demonstrado que o tempo de conservação do pescado em EAM é substancialmente aumentado, quando comparado com a conservação em atmosfera normal à mesma temperatura. Assim, o "tempo de prateleira" do pescado fresco acondicionado em atmosfera modificada, é função da espécie, da qualidade inicial do teor em gordura, da natureza do produto acabado, da temperatura de armazenagem e da composição da mistura gasosa (FAO, 1995).

A temperatura de armazenagem é de importância fundamental. Os produtos devem ser armazenados tanto quanto possível a temperaturas próximas de 0°C e nunca a temperaturas superiores a 5°C. Os filetes de peixe magro, como os de bacalhau, embalados em EAM e mantidos a 0°C conservam-se por períodos superiores a 50% aos dos produtos embalados em vácuo ou numa embalagem normal em ar. O tempo de conservação de lagostins ou camarões inteiros crus é prolongado por mais 30%. Nos peixes gordos (arenque, cavala, salmão, truta) e produtos fumados armazenados nestas embalagens e mantidos a 0°C, o tempo de conservação

não é, porém, prolongado. O melhor efeito da conservação em EAM no "tempo de prateleira" tem sido obtido com peixes de águas quentes e temperadas.

4.4 Evolução das alterações do pescado em EAM

A proporção de CO_2 dentro da embalagem decresce ao longo da conservação, devido à sua dissolução nos tecidos do pescado, com consequente aumento das proporções dos outros componentes gasosos. O O_2 no início supera os níveis da atmosfera, mas posteriormente como a velocidade de solubilização do CO_2 é superada pela velocidade da sua produção na respiração bacteriana, o O_2 decresce de nível (Davis, 1995).

Efeito do O_2 e do CO_2

- **nos microrganismos**

O O_2 é utilizado por muitos microrganismos que deterioram os alimentos. A utilização de altas ou baixas concentrações de O_2 vai depender das características do alimento a conservar. Assim, quando presente em altas concentrações, o O_2 evita o crescimento das bactérias anaeróbias que contaminam o alimento e contribui para a manutenção da cor vermelha de algumas carnes frescas e de algumas espécies de peixe. De acordo com Davis (1995), a inclusão entre 10 e 50% de oxigénio reduz ligeiramente a inibição geral, mas parece desempenhar um importante papel na especificação da microflora dominante. Em geral a proporção de O_2 usada é menor ou igual à presente na atmosfera.

Concentrações elevadas de CO_2 podem reduzir o crescimento microbiano e consequentemente contribuir para aumentar o "tempo de prateleira" dos produtos alimentares onde a deterioração é causada pela actividade microbiana (Coyne, 1932). O CO_2 vai aumentar o tempo de crescimento dos microrganismos, prolongando a sua fase de adaptação e diminuindo consequentemente a sua taxa de crescimento. Estas acções parecem estar linearmente relacionadas com a concentração de CO_2 mas de modo diferente conforme os microorganismos, pois, por exemplo, nesta situação as

bactérias aeróbias Gram negativas são muito mais inibidas que as bactérias lácticas. Contudo, concentrações altas deste gás podem inibir o crescimento microbiano, mas têm alguns efeitos negativos noutros aspectos da qualidade.

Relativamente ao efeito conjunto dos dois gases, em EAM com baixa percentagem de O_2, o efeito inibidor do CO_2 está potenciado devido à limitada disponibilidade em O_2, sendo então a concentração de CO_2 suficiente para retardar o crescimento das espécies tolerantes a condições anaeróbias (Davis, 1995). Em EAM com elevada percentagem de O_2 e moderada percentagem de CO_2, este inibe, mas não anula, o crescimento de organismos aeróbios. Assim, o CO_2 conjuntamente com o O_2 permite de algum modo seleccionar a inibição das espécies bacterianas que são responsáveis pela deterioração de um dado produto (Fig. 6).

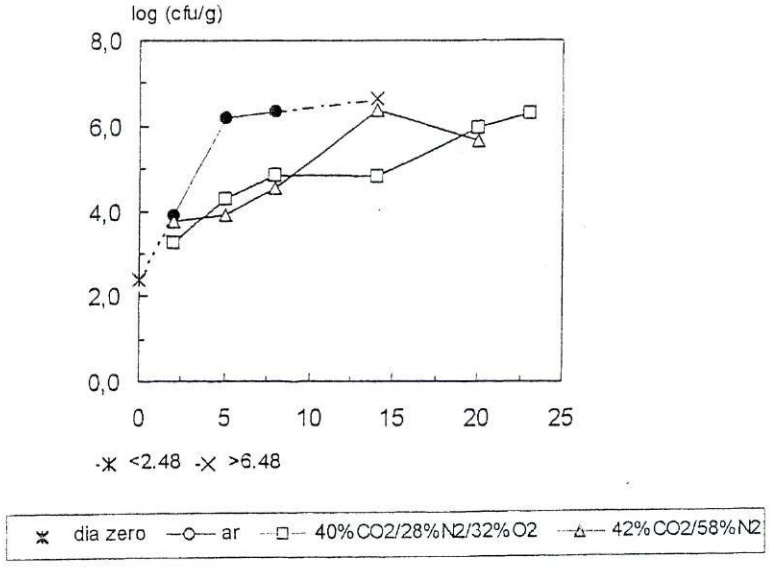


Figura 6 – Evolução das contagens totais de microrganismos a 30°C de filetes de peixe-espada-preto em EAM a 2± 0,8°C e em ar.
Fonte: Gonçalves *et al.* (1997)

No que respeita aos microrganismos, deterioração do peixe fresco de águas frias sob condições aeróbias é causada por organismos Gram negativos aeróbios estritos, principalmente *Pseudomonas* spp, *Shewanella putrefaciens* e *Photobacterium phosphoreum*, sendo por sua vez fortemente inibidos por condições anaeróbias como em EAM, com excepção do *P. phosphoreum* cujo crescimento é até aumentado nestas condições (Dalgaard *et al*, 1993). É que esta bactéria psicrotolerante, encontra-se largamente difundida no ambiente marinho e parece ser, assim como outros microrganismos, altamente resistente ao CO_2, responsável pela deterioração de produtos

da pesca embalados, reduzindo o OTMA a TMA, e produzindo pequenas quantidades de H_2S. Em EAM o número das bactérias psicrotróficas tais como *S. putrefaciens* e *Pseudomonas* é muitas vezes mais baixo (10^6-10^7 cfu/g) que no peixe embalado aerobiamente. Contudo, as bactérias psicrófilas, que crescem bem a 0°C, como *P. phosphoreum*, atingem valores de 10^7-10^8 ufc/g quando o peixe se deteriora (Dalgaard *et al.*, 1993 e Stanier *et al.*,1996).

No que respeita à deterioração do peixe fresco mediterrâneo, a flora dominante nessa situação é constituída por bactérias do ácido láctico e *Brochotrix thermosphacta*, no entanto, a flora inicial é, em regra, constituída por *Pseudomonas*, *Sh. putrefaciens*, *Enterobacteriaceae*, leveduras, *Clostridia* spp e também *Br. thermosphacta* e ainda bactérias do ácido láctico, apresentando estes dois últimos grupos sempre contagens totais superiores a log (2,5 ufc/g) (Koutsoumanis *et al.*, 1997; Kakouri *et al.*, 1997).

Concluindo, verifica-se que o CO_2 em EAM influencia a modificação da flora, com aumento do número de *Lactobacillus* que inibe a competição de *Pseudomonas* spp, normalmente dominante. Na realidade, a microflora inicial de produtos de pescado, altera-se em atmosferas modificadas, passando a flora a ser dominada por microrganismos Gram positivos, mais resistentes ao CO_2 e outros Gram negativos anaeróbios facultativos. Todavia, uma vez que têm sido encontrados níveis muito baixos (10^5-10^6 ufc/g) de contagens totais de microrganismos na altura da rejeição sensorial dos produtos de pescado embalados, devem ser as reacções não microbianas as responsáveis pela deterioração destes (FAO, 1995).

- **na produção de compostos voláteis**

O cheiro a podre do peixe estragado é normalmente atribuído a compostos de enxofre tais como H_2S, $(CH_3)_2S$) e CH_3SH) produzidos, respectivamente, a partir dos aminoácidos cistina, cisteína e metionina. Lindsay *et al.* (1986) encontraram H_2S e CH_3SH em EAM com níveis comparáveis aos das embalagens aeróbias, mas nestas o pescado estava completamente podre, enquanto que em EAM a alteração era menor.

Aqueles autores mostraram ainda que os *Lactobacillus* produzem também estes compostos de enxofre volátil, embora numa EAM o odor dos peixes em decomposição seja diferente do peixe

embalado aerobiamente. Posteriormente revelaram que o cheiro a podre era devido aos produtos de oxidação do sulfureto de hidrogénio e do metil mercaptano, reacção esta que não era suposta ocorrer em atmosfera com CO_2, concluindo, então, que a medição dos componentes de enxofre oxidado é uma análise de interesse para a avaliação da qualidade do peixe em EAM.

- **nos índices químicos**

Em regra, na avaliação da qualidade do pescado, incluem-se as determinações de azoto de trimetilamina (ATMA), azoto básico volátil total (ABVT), hipoxantina (Hx), rancificação e pH. Estas análises químicas são frequentemente realizadas em amostras de pescado conservado em EAM, embora não estejam correlacionadas com as avaliações sensoriais no sentido de determinar a sua qualidade.

As alterações na quantidade, quer de aminas voláteis quer de hipoxantina, têm sido interpretadas de modo diferente (Davis, 1995). Assim, durante prolongados períodos de armazenagem, numa atmosfera modificada com concentração reduzida de O_2, os valores de ATMA e de amónia e, portanto, de ABVT, mantêm-se sempre baixos. Para a maioria dos produtos de pescado em EAM a produção de ATMA a 0°C é retardada, o que reflecte uma fase de aclimatização dos organismos redutores do OTMA, como consequência directa da embalagem em CO_2 ou devido a uma diminuição na actividade daqueles organismos quando o pH desce para aproximadamente 6,0. Parece que a inclusão de O_2 também é importante, principalmente no início, quando o CO_2 se dissolve. Ele exerce um efeito inibitório sobre a actividade da OTMAredutase na redução do OTMA a TMA.

As EAM reduzem a velocidade de degradação dos nucleótidos. Assim, parece que existe influência do CO_2 e da temperatura sobre o pH e com efeito na inibição da degradação do IMP, principalmente no pescado com pH naturalmente baixo (onde ocorre maior persistência do IMP) (Davis, 1995). Statham (1984) referiu que o papel inibidor do CO_2 nas enzimas do peixe ou no crescimento de S. *putrefaciens* pode levar à restrição da produção de Hx. Em EAM é possível que a produção da quase totalidade de Hx possa ser por via enzimática, apesar de não se possuírem sobre tal dados muito conclusivos.

- **no pH**

Os principais responsáveis pelas diferenças observadas no tempo de conservação tanto do peixe como de produtos de carne são a microflora de deterioração e o pH. Um aumento no pH é considerado um indicador de crescimento das bactérias devido à sua acção de desaminação com produção de amónia. Contudo, nas EAM ocorre uma queda no pH da superfície do produto, devido à dissociação de CO_2 em ácido carbónico, diminuição esta proporcional à concentração de dióxido de carbono, porém insuficiente para inibir o crescimento da microflora (Lannelogue *et al.*, 1982).

O músculo do pescado com um pH *post-mortem* relativamente alto pode ser mais afectado pelo CO_2 do que o músculo com pH menor. Na presença de concentrações elevadas de CO_2 há diminuição da capacidade retenção de água das proteínas devido fundamentalmente ao abaixamento pH, ocorrendo um aumento de água libertada. Isto tem sido observado em filetes de peixe magro (Dalgaard *et al.*, 1993) e não em espécies gordas. Os filetes de pescado embalados em 40%(CO_2)/30%(O_2)/30%(N_2) mantêm o pH baixo (~6,3) durante um período de tempo mais longo que os filetes embalados em ar (Fig.7) (Pereira, 1997).

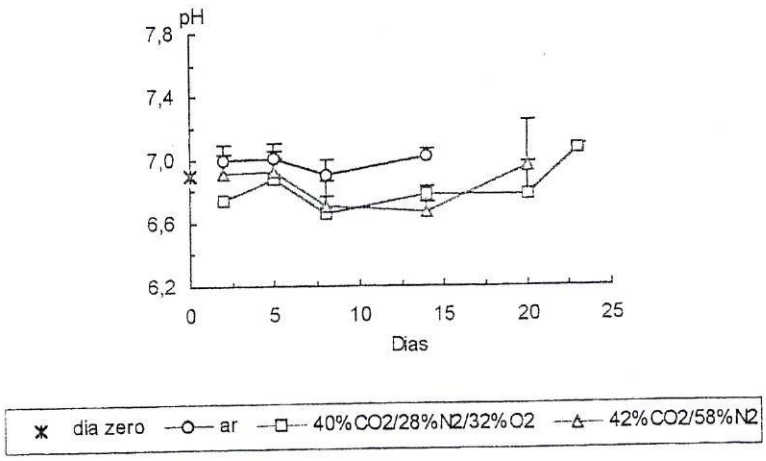


Figura 7-Valores de pH à superfície de filetes de peixe-espada-preto conservados em EAM a 2±0,8°C e em ar.

Fonte: Pereira (1997).

- **na evolução da rancificação**

A rancificação no pescado embalado em atmosferas modificadas sem oxigénio não apresenta valores diferentes dos verificados em aerobiose, não parecendo nestes existir, portanto, promoção da oxidação dos lípidos polinsaturados (FAO, 1995). Tiffney e Mills (1982), citados por Davis (1995) comprovaram, porém, que a eliminação do O_2 aumentava o tempo de conservação de produtos de cavala e truta (peixes gordos). Davis (1995) mostrou que em pescado picado, a oxidação era, sem dúvida, promovida pela adição de 30% de O_2.

- **nas propriedades sensoriais**

Os primeiros aspectos a ter em conta em EAM são o colapso da embalagem, a produção de exsudado e a descoloração, muito embora as propriedades organolépticas cheiro, sabor e textura sejam da maior importância.

Fisicamente, o colapso da embalagem, consequência da diminuição da pressão interna devido ao facto de parte do CO_2 ser absorvido pelo produto, pode inibir-se por redução da percentagem de CO_2, por pré-tratamento do produto com água saturada com CO_2 ou com uma solução de bicarbonato de sódio.

As características organolépticas do pescado na presença de altas concentrações de CO_2 não são totalmente favoráveis. Assim, por exemplo, a redução da retenção de água que provoca um exsudado excessivo, agrava-se com a armazenagem a temperaturas baixas, observando-se o aparecimento de um certo carácter áspero na textura do produto, sendo referido pelos avaliadores como um ligeiro aumento da dureza e da secura.

A descoloração é particularmente visível nas superfícies de corte devido, provavelmente, à precipitação das proteínas sarcoplásmicas em consequência do abaixamento do pH (Davis, 1995) e à descoloração dos pigmentos mioglobínicos. No pescado branco é menos importante porque existem muito poucos pigmentos relativamente ao músculo dos peixes gordos. Em regra, a inclusão de O_2 apenas permite manter a cor, quando presente em percentagens elevadas.

Efeito do Azoto e outros gases

O azoto não tem um efeito visível no crescimento bacteriano e no tempo de conservação dos alimentos. Este gás é quimicamente inerte sendo usado principalmente como gás de enchimento dada a sua menor solubilidade e menor difusibilidade através dos filmes mais comuns. Quando substitui o O_2 evita o crescimento de microorganismos aeróbios e as reacções de oxidação. Regra geral, considera-se que a concentração de azoto deve ser sempre superior à concentração na atmosfera (Huss, 1988).

Têm sido utilizados outros gases em pequenas concentrações, tais como o monóxido de carbono, óxido nitroso, ozono, óxido de etileno e dióxido de enxofre, contudo a utilização destes ou de outros gases pode apresentar problemas para a saúde do consumidor. O monóxido de carbono, em particular, tem sido utilizado experimentalmente em pequenas doses para prevenir a descoloração da carne. A carboximioglobina apresenta a vantagem de ser mais estável que oximioglobina. Elevados níveis de CO (10-30%) têm um efeito inibitório sobre o crescimento de algumas bactérias. O dióxido de enxofre, o óxido de etileno e o ozono têm também propriedades antimicrobianas (FAO, 1995).

Para cada produto existirá certamente uma mistura gasosa ideal, sugerindo-se que a realização de vários testes com o produto e com a embalagem onde vai ser comercializada antes de ser apresentada ao consumidor.

As EAM e as bactérias patogénicas

Um dos aspectos que mais condiciona este tipo de conservação é a possível ocorrência de *C. botulinum,* sobretudo em atmosferas com baixa percentagem de O_2. Os estudos da incidência de *C. botulinum* no pescado indicam que o nível de contaminação é bastante variável, em função da localização geográfica e da época do ano.

Como já foi referido, todos os tipos desta bactéria foram já identificados em ambientes aquáticos. Os tipos não proteolíticos B É e F, apresentam maior risco para as EAM, desenvolvendo-se a temperaturas tão baixas como 3,3°C. O peixe oferece uma quantidade de nutrientes e um nível de pH quase ideal para a sua proliferação (Lindsay, 1982). O crescimento

bacteriano é muito lento a baixas temperaturas mas, embora o tempo prolongado da EAM pode ser suficientemente longo para o desenvolvimento de toxinas.

Em condições de refrigeração ao ar, o *C. botulinum* concorre, embora com pouco sucesso, com organismos de deterioração, porém em EAM estes organismos são de certo modo inibidos, mas potencia-se o desenvolvimento de toxinas sem percepção sensorial. Os ácidos e óxidos produzidos por *Lactobacillus* (favorecidos em EAM) parecem ter um efeito inibidor no *C. botulinum*. O factor de risco aumenta com abusos de temperatura durante a armazenagem (Lindsay, 1981).

No Quadro 11 podemos observar situações de qualidade e toxicidade no pescado, em diferentes condições de armazenagem (atmosfera e temperatura).

Quadro 11 — Qualidade/toxicidade de pescado conservado a diferentes temperaturas.

Caranguejo cozido (*C. botulinum* + bactérias de deterioração)	5°C - 10°C 30-60 dias em vácuo	Tóxico. Pescado não visivelmente deteriorado
Filetes frescos (*C. botulinum* + bactérias de deterioração)	5°C - 10°C 14-20 dias em EAM	Não tóxico. Filetes visivelmente deteriorados
Filetes frescos (*C. botulinum* + bactérias de deterioração)	21°C – 30°C 24 horas ao ar	Tóxico. Filetes visivelmente deteriorados
Filetes frescos (*C. botulinum* + bactérias de deterioração)	21°C – 30°C 24 horas em EAM	Tóxico. Filetes não visivelmente deteriorados

Adaptado de Lindsay (1981).

Portanto, o peixe fresco durante uma armazenagem prolongada em ambientes modificados, pode constituir uma grave ameaça para a saúde pública. A presença de esporos de *C. botulinum* em peixe fresco com a possibilidade de desenvolvimento e produção de toxinas é razão importante

para que se possua o necessário cuidado na utilização das EAM em grande escala (Statham,1984).

A introdução de barreiras para impedir o desenvolvimento bacteriano, como seja o pré-tratamento do pescado antes do seu acondicionamento em EAM, é benéfico como se indica no Quadro 12.

Quadro 12 — Tempo de conservação em atmosferas modificadas de pescado pré-tratado.

Temperatura de Armazenagem (°c)	Espécie	Pré-tratamento	Atmosfera modificada (%)	Tempo de conservaçâo (dias)
3,0	Filete de charuteiro *Seriola aurevittata*	Imersão em NaCl a 5%	CO_2 (100)	7
1,7	Truta	Imersão em sorbato de potássio a 2,3%	CO_2 (80) N_2 (20)	14
1,0	Salmão	Gelo com 1% de sorbato de potássio	CO_2:O_2:N_2 (60:20:20)	28
4	Vieira	Imersão em sorbato de potássio a 0,1%	Embalagem a vácuo	28
4	Vieira	-	Embalagem a vácuo	6
3	Peixe magro	Imersão em sorbato de potássio a 5%	CO_2 (100)	14
2	Filetes de Cantarilho	Imersão em solução com 1% sorbato de potássio e 5ppm de clorotetraciclina	Embalagem a vácuo	14
0-2	Filetes de pata-roxa	Irradiação	com ou sem teor elevado de CO_2	20-30

Fonte: Comunicação oral de Batista (1997)

São exemplos de pré-tratamento do pescado, a imersão em soluções de cloreto de sódio (5,5%), sorbato de potássio (2-3%), sorbato de potássio e clorotetraciclina (respectivamente 1% e 5ppm) e a adição de gelo com sorbato de potássio (1%). A irradiação, a introdução de ozono, o tratamento térmico com vapor de água (durante alguns segundos) são também tratamentos "barreira". Um outro efeito destas barreiras é o aumento de retenção de água, diminuindo-se, portanto, os exsudados (Gibson e Davis, 1995).

Porém, o sucesso das EAM depende de muitos factores, os quais incluem boa qualidade inicial do produto, boa higiene no manuseamento, correcta selecção do material de embalagem, apropriada mistura gasosa, equipamento de embalagem seguro e manutenção das temperaturas de armazenagem. É importante compreender que a armazenagem sob atmosferas controladas ou modificadas não melhora a qualidade do produto, apenas atrasa o ritmo de deterioração (Farber, 1991).

4.5 Segurança do pescado em EAM

A segurança do pescado em EAM tem sido largamente examinada e/ou revista por muitos autores (Garcia *et al.*, 1987 e outros). Realmente, o principal problema diz respeito ao crescimento e produção de toxinas pelo *C. botulinum* não proteolítico, o qual se desenvolve a baixas temperaturas. É controversa a opinião existente sobre o momento da produção da toxina, ou seja, se ocorre ou não antes da deterioração sensorial, à temperatura ambiente ou mais elevada. Indubitavelmente, sob condições de abusos de temperatura, ou mesmo a 4°C sob o efeito de atmosferas modificadas anaeróbias, a toxina de *C. botulinum* pode estar presente bem antes de qualquer evidência de deterioração sensorial.

Tendo em conta a necessária e adequada refrigeração dos alimentos frescos, a distribuição comercial na venda a retalho do pescado em EAM só será efectivamente segura se a sua armazenagem tiver em conta condições conjuntas de temperaturas inferiores a 3°C durante todo o tempo de armazenagem e pré-tratamento térmico (Farber, 1991; Hobbs, 1991). Esta última condição tem por objectivo a destruição dos esporos das espécies susceptíveis ou inactivação dos esporos das espécies não proteolíticas. Estas condições, sendo aceites sob ponto de vista teórico, apresentam, no entanto, no plano da sua exequibilidade imensas dificuldades, por ser difícil evitar a contaminação do produto no ambiente de processamento.

5. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO PESCADO

A maior parte das vezes "qualidade" refere-se à aparência e ao grau de frescura ou grau de deterioração que o peixe apresenta. Para a qualidade do peixe ou produtos de pesca a frescura

tem um grande contributo. Para todos os tipos de produtos, a frescura da matéria prima é essencial para a qualidade global do produto final, devendo, contudo, envolver aspectos de segurança tais como estar isento de bactérias, parasitas ou substâncias prejudiciais. É igualmente importante relembrar que "qualidade" é um termo que deve ser definido em função do tipo de produto final, pois a melhor qualidade nem sempre é encontrada no pescado consumível nas primeiras horas *post-mortem*. Como foi já referido, para uma boa filetagem, o peixe mais aconselhável é aquele que já passou pela fase de *rigor mortis* (FAO, 1995).

Os métodos para avaliação da qualidade do peixe fresco podem ser englobados em duas categorias: sensoriais e instrumentais. Sendo o consumidor o juiz final da qualidade, todos os métodos deverão, previamente, ser relacionados com avaliação sensorial.

5.1Qualidade sensorial

A avaliação sensorial é o instrumento mais seguro para a avaliação dos diferentes estádios de frescura do peixe fresco, apesar dos esforços para substituição dos métodos organolépticos por outros mais objectivos. Contudo, estão a ser feitos avanços no desenvolvimento de meios técnicos instrumentais que possam medir alterações na qualidade individual do pescado. Realmente é um objectivo prioritário actual e futuro a substituição dos testes sensoriais para a avaliação da frescura, por métodos instrumentais de modo a facilitar e melhorar a sua determinação pelo processador e pelo consumidor (Oehlenschläger e Sörensen, 1997). Usando resultados de um número diferente de metodologias, a frescura poderá ser descrita e definida satisfatoriamente.

O historial a que o peixe esteve sujeito antes de chegar a terra, ou seja, o espaço de tempo e os valores da temperatura, é fundamental. A avaliação sensorial do peixe nos mercados e locais de venda é dada pela avaliação da aparência, textura e cheiro.

As alterações das características sensoriais no peixe *post-mortem* variam consideravelmente, dependendo da espécie e do método de armazenagem. Não obstante, podem, listar-se os atributos sensoriais para o peixe. Uma descrição geral foi fornecida pela CE em directivas para avaliação da qualidade do peixe. A maioria dos sistemas/tabelas de avaliação sensorial é baseada em alterações que têm lugar durante a armazenagem em gelo. A fim de caracterizar a evolução da

frescura e mesmo a alteração da qualidade, têm sido propostas tabelas de análise sensorial que hoje são aceites pelos vários países da União Europeia (FAO, 1995).

5.2 Qualidade microbiológica

A avaliação da quantidade microbiológica dos alimentos é fundamental por várias razões. Assim, pode dar boa informação sobre a qualidade higiénica do peixe, incluindo abusos de temperatura e a higiene durante o seu manuseamento e processamento.

A contagem total dos microrganismos viáveis é o teste microbiológico mais vulgarmente usado, mas ainda hoje em dia é um dos mais difíceis de reproduzir e interpretar. É aplicado a produtos de pescado em cru e transformado, cujos meios de cultura devem reflectir as condições necessárias à vida dos organismos a contabilizar (Gibson e Ogden, 1997). Ultimamente têm sido estudados meios mais selectivos para permitir o crescimento de grupos de bactérias específicas de suposta importância na alteração e avaliação da qualidade, sendo a temperatura de incubação o parâmetro físico mais importante para o seu crescimento.

Não é fácil determinar num dado peixe deteriorado quais as bactérias que causam deterioração. Requerem estudos sensoriais, químicos e microbiológicos extensos. Primeiro, devem ser estudadas e quantificadas as alterações sensoriais, químicas e microbiológicas durante a armazenagem, incluindo a determinação da correlação de um dado composto químico com a deterioração (indicador químico de deterioração); segundo, deverão ser isoladas as bactérias na altura da rejeição sensorial. Seguir-se-ão análises para determinar o seu potencial de deterioração, isto é, a sua capacidade para produzir alterações sensoriais e químicas, tipicas do produto em deterioração. Finalmente e relativamente às estirpes seleccionadas testar-se-á a sua actividade de deterioração, ou seja, se o seu valor de crescimento e a sua produção de cheiros, qualitativa e quantitativamente, têm semelhanças com o que acontece no produto deteriorado. O último passo é particularmente importante pois algumas bactérias podem produzir compostos químicos relacionados com a deterioração, mas nem sempre em quantidades significativas, não sendo então consideradas bactérias específicas de deterioração.

As contagens dos microrganismos totais raras vezes são um bom indicador da qualidade sensorial ou do tempo de conservação esperado de dado produto. Placas de meio agarizado como

PCA (Plate Count Agar) e IA (Iron Agar, Lyngby, Oxoid) são ainda os substratos mais largamente utilizados para a determinação das contagens totais, com destaque para IA que dá contagens totais significantemente mais altas que o PCA (Gram, 1992). O meio IA contribui para a determinação do número de bactérias que produzem sulfureto de hidrogénio, as quais nalguns produtos de pescado são as bactérias específicas de deterioração.

Uma das principais reacções de deterioração é a redução bacteriológica do óxido de trimetilamina a trimetilamina. Na redução do OTMA a TMA ocorrem alterações físicas como o decréscimo do potencial redox e aumento do pH e da condutância, que ao serem medidas (num substrato contendo OTMA) podem ser usadas para avaliar o nível de microrganismos com potencial de deterioração (Huss *et al.*,1986) Também se tem investigado em procedimentos rápidos para a determinação do conteúdo bacteriano como por exemplo *redigel* e *petrifilm*^{TM} SM (Fung *et al.*, 1986).

CAPÍTULO II — MATERIAL E MÉTODOS

A. CARACTERIZAÇÃO DO PEIXE-ESPADA-PRETO

A.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O peixe-espada-preto foi a espécie seleccionada para objecto deste estudo. Foram adquiridos três peixes no mercado retalhista pela manhã, aos quais foram retiradas as vísceras e a pele preta no próprio local de venda.

A.2 METODOLOGIA

No laboratório foram preparadas amostras do músculo com pele branca e sem pele branca de cada um dos peixes e de diferentes partes do corpo. Cada uma delas foi convenientemente homogeneizada e de seguida analisada.

2.1 Composição química

A humidade, a gordura extraível, a proteína bruta e a cinza foram determinadas de acordo com os princípios descritos no AOAC (1990). O valor energético foi calculado com base na equação seguinte (FAO, 1989):

Valor energético (kcal/100g) = 4 × (teor proteico percentual) + 9 × (teor em gordura percentual) + + 4 × (teor em hidratos de carbono percentual)

2.1.1 Humidade

A percentagem de água foi determinada em amostras de 2 a 3 g num sistema MILESTONE – Microwave Laboratory Systems, que dispõe de um forno de microondas "High-Performance Microwave Digestion Unit – mls 1200 mega", equipado com um programa de cálculo "Software ver. 1.0" e acoplado a um sistema de vácuo "Vac-60/150". A potência e o tempo de secagem seleccionados foram, respectivamente, 800 W e 10 minutos, de acordo com o manual de instruções.

2.1.2 Gordura extraível

O teor em gordura foi determinado num aparelho tipo Soxleht automatizado, "Soxtec System HT 1043 Extraction Unit-Tecator". A amostra, de cerca de 5g contida numa cartucha de papel de filtro, foi seca durante 30 minutos, numa estufa a 100°C. A extracção do material seco efectuou-se com éter etílico por um período de 6 horas e a gordura foi recuperada num copo de alumínio, previamente tarado. Finda a extracção, evaporou-se o solvente residual por secagem, numa estufa a 100°C, durante 30 minutos.

2.1.3 Azoto total e proteína bruta

O teor em azoto total foi determinado pelo método de Kjeldahl. Assim, esta determinação baseou-se em três fases sucessivas: digestão, destilação e titulação. Na primeira fase a amostra de 1 a 2g foi digerida num digestor Digestion System 20 1015 em ácido sulfúrico concentrado, a cerca de 400°C, na presença de sulfato de potássio (para elevar o ponto de ebulição do ácido sulfúrico) e de selénio como catalizador da reacção. Após a mineralização, o azoto presente na amostra, entretanto convertido em amoníaco por adição de hidróxido de sódio, foi destilado por arrastamento de vapor no Kjeltec Auto 1030 Analyzer e recolhido numa solução de ácido bórico, contendo uma mistura de verde de bromocresol e vermelho de metilo. O amoníaco recolhido foi titulado com ácido clorídrico. O teor de azoto total foi convertido em proteína bruta recorrendo ao factor de conversão 6,25.

2.1.4 Cinza

O teor em cinza foi determinado após carbonização da amostra (cerca de 5g), numa mufla a 550°C durante 5 horas. As amostras foram previamente secas numa estufa a 100°C durante a noite.

2.2 Minerais

Na determinação do mercúrio seguiu-se a metodologia descrita na NP2928 (IPQ, 1988) e no doseamento do cobre, zinco, cádmio, crómio, níquel e chumbo os métodos descritos no AOAC (1990). Por seu lado, o teor de fósforo total foi determinado de acordo com a norma ISO/TC 34/SC 6 N371 (1991).

2.3 Aminoácidos totais

Na análise dos aminoácidos totais seguiu-se a metodologia descrita no AOAC (1996), com as modificações que se descrevem a seguir.

2.3.1 Hidrólise das proteínas

Aminoácidos Totais

Procedeu-se à hidrólise ácida em tubo fechado, com solução de HCl 6M, durante 24 horas, numa estufa a 110°C. Após a hidrólise filtrou-se por seringa acopolada a um filtro de 0,45μm de porosidade para um balão aferido, perfazendo-se um volume certo com água Ultra pura. De seguida pipetou-se um volume que foi diluído, congelado e liofilizado. O resíduo liofilizado foi dissolvido em tampão citrato de lítio e filtrou-se uma alíquota por um filtro de 0,2μm de porosidade.

Aminoácidos Sulfurados

As amostras foram previamente oxidadas com ácido perfórmico, durante 16 horas, a 0°C. Procedeu-se à hidrólise ácida, em frascos Schott rolhados, com solução de HCl 6M, durante 24 horas numa estufa a 110°C. de seguida, procedeu-se de modo idêntico ao descrito no ponto anterior.

Triptofano

Procedeu-se à hidrólise alcalina, em tubo fechado, com solução de NaOH 4M, durante 24 horas, numa estufa a 110°C. Após a hidrólise filtrou-se todo o hidrolisado por seringa acoplada a um filtro de 0,45 μm de porosidade. Ajustou-se o pH a 2,20 com solução de HCl 6M e transferiu-se o filtrado para um balão aferido, perfazendo um volume certo com tampão citrato de lítio. Filtrou-se uma alíquota por seringa acoplada a um filtro de 0,2μm de porosidade.

2.3.2 Doseamento e quantificação dos aminoácidos

Os perfis de aminoácidos foram determinados por cromatografia líquida de troca iónica num analisador automático de aminoácidos Biochrom 20, por aplicação sucessiva dos tampões de citrato de lítio, usando o software EZChrom Chromatography Data System. A taxa de recuperação dos aminoácidos foi corrigida pela utilização de norleucina, como padrão interno, que foi adicionada às amostras antes da hidrólise.

2.3.3 Cálculo dos parâmetros nutricionais

A avaliação nutricional foi estimada através do cálculo dos parâmetros a seguir indicados, cujos valores são expressos em g/100g de proteína.

- Razão C/A (Acton & Rudd, 1987) — com base na concentração do aminoácido presente na proteína do ovo referida pela FAO (1970).

$$\text{Razão C/A} = \frac{\text{Concentração do aminoácido essencial na proteína teste x 100}}{\text{Concentração do aminoácido essencial na referência (proteína do ovo)}}$$

- Razão C/B (Acton & Rudd, 1987) — com base no padrão de aminoácidos essenciais da FAO/WHO (1973).

$$\text{Razão C/B} = \frac{\text{Concentração do aminoácido essencial na proteína teste x 100}}{\text{Concentração do aminoácido essencial na referência FAO/WHO}}$$

O aminoácido essencial que apresentar o menor valor em cada uma das razões é considerado como limitante.

- Índice de aminoácidos essenciais (Acton & Rudd, 1987). Corresponde ao somatório dos logarítmos (base 10) de todas as razões calculadas com a proteína do ovo (FAO, 1970) constantes no Anexo D e posterior cálculo do anti-logarítmo daquele valor. O resultado obtido é considerado como o índice de aminoácidos essenciais.

Este parâmetro reflecte o facto de outros aminoácidos poderem apresentar-se em concentrações limitantes. Geralmente, os valores encontrados mostram uma melhor correlação com os teores determinados por métodos *in vitro* do que as razões anteriores (Acton & Rudd, 1987).

2.4 Ácidos gordos

A determinação do perfil de ácidos gordos foi efectuada após liofilização. De seguida, a cerca de 300 mg de amostra liofilizada foi adicionada uma solução metanólica de cloreto de acetilo a 5% (preparada extemporaneamente no momento da utilização) de acordo com o método desenvolvido por Lepage e Roy (1986) e após agitação vigorosa colocou-se em banho de água a 80°C durante 1 hora. Seguidamente a solução foi arrefecida e diluída com 1 ml de água, adicionando-se de seguida 2 ml de n-heptano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio

anidro e posteriormente analisada por cromatografia gás-líquido num cromatógrafo VARIAN 3400 equipado com analisador automático. A separação foi efectuada com hélio como gás de arraste, numa coluna capilar SP-1000 (0,32mm d x 30m Supelco Inc.) usando as condições de análise descritas por Bandarra *et al.* (1997).

B. EVOLUÇÃO DA QUALIDADE DE FILETES DE PEIXE-ESPADA-PRETO EMBALADOS EM ATMOSFERA MODIFICADA

B.1 MATERIAL

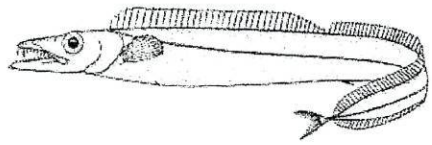
1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para o estudo da evolução da qualidade de filetes de peixe-espada-preto embalados em atmosfera modificada, utilizaram-se filetes de peixe capturado ao largo de Sesimbra no final do mês de Junho de 1998. O peixe-espada-preto, comercializado em fresco na lota de Sesimbra em 29-06-98, foi transportado para a ArtesanalPesca onde foi armazenado em gelo em ambiente refrigerado até ao processamento de filetagem na manhã seguinte.

A preparação da matéria prima englobou os processamentos: filetagem e acondicionamento do pescado na unidade industrial (ArtesanalPesca); embalagem dos filetes no IPIMAR.

Relativamente ao processamento na ArtesanalPesca, o peixe descabeçado, eviscerado foi cortado aos pedaços e conduzido à máquina de depelar onde se efectuou a remoção da pele preta e da pele branca. De seguida procedeu-se à preparação manual dos filetes com um tamanho que variou entre 12 e 15 cm. Os filetes foram seguidamente mergulhados em água do mar, tratada e controlada, proveniente da doca, de acordo com a metodologia em uso na empresa. Os filetes, aproximadamente 37kg, depois de escorridos foram acondicionados em sacos de plástico e estes em caixas com gelo e de seguida transportados até ao IPIMAR numa carrinha isotérmica.

No IPIMAR os filetes foram colocados em caixas de esferovite com absorvente, contendo cada uma 4 filetes aleatoriamente escolhidos, separados entre si e envolvida por saco devidamente fechado. Seguiu-se a injecção da mistura gasosa em cada embalagem a explicar seguidamente. A embalagem dos filetes iniciou-se por volta das 15 horas e decorreu durante 2 horas. Todas as embalagens foram armazenadas em refrigerado numa arca vertical à temperatura de 2±1°C, até ao final de cada ensaio. O fluxograma das várias operações encontra-se na Figura 8.



MAR

Descabeçamento e Evisceração

INDÚSTRIA

Armazenagem

Corte em pedaços

Remoção da pele preta e da pele branca

Filetagem

Lavagem com água do mar

Acondicionamento em embalagem plástica e em gelo

IPIMAR

Embalagem

Ar

70%CO_2/30%O_2

Conservação a 2 ± 1ºC

Amostragem

Dias 0 3 7 10 14 17

Figura 8 - Fluxograma da preparação dos ensaios de conservação.

1.2 MEIOS E REAGENTES

Os meios de cultura utilizados para o crescimento, isolamento e pesquisa dos microrganismos e ainda para caracterização bioquímica de estirpes, constam nos Quadros 13 e 14 respectivamente.

Quadro 13 — Meios de cultura usados para a quantificação, isolamento e pesquisa de microrganismos.

Meio de cultura	Fabricante/Código	Objectivo
Iron Agar (IA) (Lyngby)	*	Quantificação de microrganismos viáveis e de produtores de H_2S (Gram *et al.*, 1987)
MRS (Man, Rugosa, Sharpe)	Oxoid/CM361 *	Quantificação e isolamento de bactérias do ácido láctico
Pseudomonas Base Agar + suplemento CFC	Oxoid/559 Oxoid SR 103 E	Quantificação e isolamento de *Pseudomonas* spp
Iron Agar-OTMA	*	Pesquisa de bactérias deteriorantes (Gram *et al.*, 1987)

*Anexo L.

Quadro 14 — Galeria de identificação "API System" (bioMérieux).

Produto	Código	Objectivo
API 20 NE	20050	Identificação de bastonetes/coccobacilos Gram negativos não enterobactérias

B.2 METODOLOGIA

2.1 ACONDICIONAMENTO EM ATMOSFERA MODIFICADA

2.1.1 Embalagem

As amostras foram acondicionadas em caixas de esferovite com absorvente incorporado, com

dimensões internas de (c×l×h) 293×212×30 (mm). Os sacos utilizados para as embalagens, da marca Vascolan-PA/PE-Supre, com as dimensões 240×400 (mm) e 85 μm de espessura, são constituídos por uma camada de poliamina (PA) entre duas lâminas de polietileno (PE)., que conferem protecção mecânica. As taxas de transmissão dos sacos eram de 54,2 e 178,0 $cm^3/m^2/.24h$ respectivamente para o oxigénio e dióxido de carbono, a 75% HR (humidade relativa) e 23°C.

2.1.2 Preparação da atmosfera modificada

A mistura gasosa, preparada pela empresa Air Liquide, efectuou-se numa máquina de embalar Multivac A 300/52, com o prévio ensaio controlo com 100% de ar.

A atmosfera modificada definida neste trabalho era composta pela mistura de 70%CO_2 e 30%O_2.

2.2 ANÁLISES

As análises efectuadas ao longo do estudo de conservação dos filetes de peixe-espada-preto fresco armazenado à temperatura de 2±1°C, constam no Quadro 15.

Quadro 15 — Análises efectuadas ao longo da conservação dos filetes de peixe-espada-preto embalados em atmosfera modificada (EAM) e em ar (controlo).

Ensaios	Amostras	Análises
Dia 0	Matéria prima	Sensoriais, bio(químicas), físicas e microbiológicas
Dia 3	Filetes de EAM e de controlo	Sensoriais, bio(químicas), físicas e microbiológicas
Dia 7	Filetes de EAM e de controlo	Sensoriais, bio(químicas), físicas
Dia 10	Filetes de EAM e de controlo	Sensoriais, bio(químicas), físicas e microbiológicas
Dia 17	Filetes em EAM	Sensoriais, bio(químicas), físicas
Dia 20	Filetes em EAM	Microbiológicas

O dia zero deste estudo corresponde a 48 horas após a captura. O dia 10 nas embalagens controlo (em ar) e o dia 17 nas embalagens EAM correspondem à altura da rejeição sensorial. De salientar

que as análises microbiológicas não se efectuaram ao 17° dia mas sim ao 20° dia, por impedimentos técnicos.

2.2.1 Composição centesimal das misturas

Aquando da abertura de cada embalagem, mas previamente à mesma, analisou-se a sua composição centesimal, com um medidor de gases ABISSPRINT 10, com uma precisão de 0,2% e de 0,1% para o CO_2 e para o O_2, respectivamente. Este equipamento mede a percentagem de CO_2 e de O_2 através de um detector de gás carbónico, com sistema de infravermelho de feixe duplo e microprocessador.

2.2.2 Análise sensorial

Preparação das amostras

Em cada ensaio foram distribuídas aos provadores as amostras, envolvidas por película aderente, para evitar a sua desidratação. O tempo de cozedura dos filetes em sacos de plástico individuais, foi de 9 minutos a 100°C, tendo-se utilizado para tal um cozedor a vapor Rational.

Avaliação

O painel de prova era constituído por cinco pessoas com experiência em análise sensorial do peixe-espada-preto em cru e em cozido.

Na sala de análise sensorial dividida em cinco gabinetes individuais, cada provedor fez a sua apreciação. Cada gabinete estava munido de lâmpada fluorescente, pileta e água, de modo a proporcionar a lavagem da boca entre cada amostra.

Na apreciação organoléptica dos filetes de peixe-espada-preto, cada provador analisou um pedaço em cru e outro cozido de cada uma das caixas, cujas amostras eram fornecidas com códigos de modo a inviabilizar a sua identificação. Para a prova retiraram-se dez filetes de seis caixas, três de atmosfera modificada e três de embalagem em ar. Os filetes foram partidos ao meio, sendo uma parte analisada em cru e a outra em cozido. O provador analisava, portanto, o mesmo filete em condições diferentes. Dado o objectivo do estudo elaborou-se um perfil de atributos (Anexos G e H) adaptados à amostra, com a pontuação de 0 a 5.

2.2.3 Análises bio(químicas)

Preparação das amostras

Alguns dos filetes restantes da análise sensorial, em cada ensaio, foram cortados em pedaços e homogeneizados numa picadora Moulinex até se obter uma polpa. Seguidamente este produto foi dividido em várias fracções, tendo em vista o número de análises bioquímicas a realizar.

2.2.3.1 Composição química aproximada

A humidade, a gordura extraível, a proteína bruta e a cinza foram determinadas de acordo com as metodologias descritas em AOAC (1990), conforme o descrito no ponto.2.1 deste capítulo.

Neste estudo efectuou-se ainda a determinação do teor de cloretos, atendendo a que no processo de filetagem a que a matéria prima em estudo foi sujeita, fez mergulhar os filetes em água com cloreto de sódio durante algum tempo. O teor em cloretos é a quantidade total de iões de cloro expresso em percentagem de cloreto de sódio determinado nas condições a seguir descritas.

À amostra de 5 g adicionou-se um volume conhecido de solução de nitrato de prata 0,1N em excesso (para precipitar todos os cloretos) e 20 ml de ácido nítrico. Ferveu durante 15 minutos até à dissolução dos sólidos com excepção do cloreto de prata. Deixou-se arrefecer até atingir a

temperatura ambiente e juntou-se 50 ml de água e 5ml de solução saturada de sulfato de ferro e amónio. Titulou-se com uma solução de tiocianato de amónio 0,1N até aparecer uma coloração castanha clara. Paralelamente efectuou-se o ensaio em branco empregando as mesmas quantidades de todos os reagentes usados, com excepção do produto analisado.

2.2.3.2 Azoto básico volátil total (ABVT)

O teor em ABVT foi determinado utilizando o método de microdifusão de Conway modificado (Cobb *et al.*, 1973). Um extracto obtido após homogeneização de 15 g de amostra com 30 ml de ácido tricloroacético (TCA) (10%) num homogeneizador Polytron sofreu posteriormente filtração através de papel de filtro Whatman nº1, recolhido num frasco. De seguida, mediu-se para a coroa exterior das células de Conway, 1 ml de extracto, 1 ml de água destilada e 1 ml de uma solução saturada de carbonato de potássio e para a coroa central 1 ml de ácido bórico (1%), contendo verde de bromocresol e vermelho de metilo como indicador (respectivamente 0,033 e 0,066%). Posto isto, a célula foi tapada com um vidro untado com silicone afim de evitar a libertação de azoto. Após incubação em estufa a 37ºC durante 2 horas e seu arrefecimento, titulou-se o azoto fixado no círculo central da célula com ácido clorídrico (0,02 N), até ao aparecimento de uma cor rosa. Paralelamente, efectuou-se um ensaio em branco com 1 ml de água e um ensaio padrão com sulfato de amónia (0,1%), para a determinação do coeficiente de difusão.

2.2.3.3 Azoto de trimetilamina (ATMA)

Para a determinação do azoto de TMA o procedimento foi semelhante ao descrito para o ABVT, com excepção do conteúdo da coroa circular da célula de Conway, que levou mais 1 ml de uma solução de formaldeído (20% m/v), com o objectivo de inibir as aminas primárias e secundárias.

2.2.3.4 Azoto do óxido de trimetilamina (AOTMA)

Na determinação do azoto de OTMA utilizou-se também o método de Conway modificado (Cobb *et al.*,1973). Ao extracto inicial (preparado para a análise do ABVT) retirou-se 10 ml para um

copo e adicionaram-se 3 ml de cloreto de titânio (15%) (na proporção de 1 ml por cada 5 ml deextracto), deixando-se em repouso, no escuro, durante 10 minutos. O azoto de OTMA entretanto convertido em azoto de TMA, foi determinado conforme a metodologia seguida no método anterior. O valor exacto de OTMA obtém-se através de uma volumetria indirecta, ou seja, a diferença entre o valor final do ATMA e do OTMA.

2.2.4 Análise física

2.2.4.1 Medição do pH

A leitura do pH foi feita directamente na polpa das amostras, ou seja, em cada ensaio, de cada caixa foi retirado um filete, no qual e usando-se um eléctrodo de sólidos, com sonda de temperatura, se mediu o valor de pH. Efectuaram-se três medições por amostra.

2.2.5 Análises microbiológicas

2.2.5.1 Procedimento experimental

Preparação da amostra e das diluições

Nos diferentes ensaios ao longo deste estudo, com o auxílio de um bisturi e de uma pinça esterilizados, cortaram-se aleatoriamente pequenos pedaços dos filetes com o peso de 25g e colocaram-se directamente em sacos estéreis para "Stomacher", em cima de uma balança, onde foram pesados imediatamente (NP-3006/85). Seguidamente, adicionou-se o diluente (Maximum Recovery Diluent – Oxoid CM 733).

As amostras descritas anteriormente foram sujeitas a uma série de diluições com o objectivo de se

obterem inóculos com pequena carga microbiana. Assim, uma amostra de 25g de filete foi diluída em 225g (nove vezes a massa da amostra e pesado directamente para o saco específico) de solução salina (0.85% NaCl) com 0.1% de peptona (Maximum Recovery Diluent - Oxoid CM 733), obtida pela dissolução de 9,5g do produto desidratado, num litro de água destilada e seguida de esterilização em autoclave, a 121°C durante 15'. A mistura referida foi então homogeneizada durante 60' em STOMACHER 400, obtendo-se assim uma diluição decimal de 10^{-1} denominada suspensão-mãe (NP-3005/85).

Seguidamente procederam-se a diluições sucessivas, isto é, adicionou-se a um tubo de ensaio contendo 9 cm^3 do diluente referido 1 cm^3 da suspensão-mãe, homogeneizando-se de seguida, obtendo-se a diluição 10^{-2} e sucessivamente, retirando-se 1cm^3 da diluição anterior para um tubo com 9 cm^3 de diluente para se obterem diluições sucessivas, .utilizando-se uma pipeta para cada diluição. Estas diluições foram definidas de acordo com a evolução da conservação. Nas últimas aberturas (aquando da rejeição sensorial das amostras controlo e em atmosfera modificada) as diluições atingiram o valor 10^{-8}.

Preparação dos meios de cultura, inoculação das amostras e condições de incubação

Os meios de cultura utilizados neste estudo, constantes no Quadro 13, foram preparados de acordo com a indicação do fabricante ou de certos autores (Anexo L), com a antecedência de 1 a 5 dias da preparação da amostra. Todos os meios foram seguidamente distribuídos em placas de pétri ou tubos, em câmara de fluxo laminar, e após solidificação, ficavam armazenados em câmara frigorífica a 4°C até serem utilizados. As inoculações e repicagens também foram executadas em condições de assepsia de em câmara de fluxo laminar.

A inoculação consistiu em distribuir 1cm^3 de inoculo por quatro placas de pétri, correspondentes às diferentes condições de incubação e para cada uma das diluições definidas em cada ensaio.

O meio de cultura Iron Agar Lyngby (IA) (Oxoid CM 867) (Gram *et al.*, 1987) foi preparado segundo o descrito por Gram *et al.* (1987), com inoculação por superfície (Anexo M). As condições de incubação do IA contemplaram os ambientes em aerobiose e anaerobiose e as

temperaturas de 5 e de 22°C. A anaerobiose foi conseguida com utilização de sacos transparentes da marca Anaerocult A mini (Merck) para incubação de quatro placas de pétri em cada saco.

O meio "IA-OTMA" foi preparado de acordo com Gram *et al.* (1987) e seguidamente distribuído por tubos.

O meio "Pseudomonas Agar Base" (CM 559) foi suplementado com C.F.C. (Cetrimida, Fucidina e Cefaloridina) (Oxoid SR103 E), de acordo com manual de instruções. A inoculação foi por superfície e as condições de incubação às temperaturas de 5 e 22°C, em aerobiose.

O meio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) (Oxoid CM 361) foi utilizado com a sementeira por superfície e a restante metodologia semelhante ao meio Iron Agar, assim como as condições de incubação. A anaerobiose foi também conseguida com utilização de sacos transparentes da marca Anaerocult A mini (Merck) para a incubação de quatro placas de pétri em cada saco.

2.2.5.2 Quantificação dos microrganismos viáveis e pesquisa de microrganismos deteriorantes

A observação e contagem das colónias de cada placa em cada um dos meios foram efectuadas ao fim de três dias para as placas incubadas a 22°C e de dez dias para as placas incubadas a 5°C, em aerobiose (IA, MRS e Pseudomonas CFC) e em anaerobiose (IA e Pseudomonas CFC)

O teor de microrganismos determinado por contagem directa de colónias foi expresso em "unidades formadoras de colónias" (ufc) Assim, contaram-se as colónias existentes nas placas com um número inferior ou igual a trezentas. Dada a distribuição de 1ml por quatro placas, obteve-se a seguir o seu somatório e fez-se a redução a ufc (número compreendido entre 1.0 e 9.9 multiplicado por 10^n em que n é o expoente apropriado da potência de 10) por g de amostra (o número de microrganismos viáveis obtém-se multiplicando o valor obtido na contagem pelo valor da diluição utilizada). O resultado final foi expresso em log (ufc/g).

O meio de cultura Iron Agar Lyngby (IA) (Oxoid CM 867) concebido por Gram *et al.* (1987) foi

utilizado com dois objectivos: contagem dos microrganismos viáveis e contagem das bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio. Estas bactérias distinguem-se pela formação de colónias negras, devido à formação de um precipitado de sulfureto de ferro (FeS).

O meio de cultura IA-OTMA foi utilizado comprovar a capacidade deteriorativa dos microrganismos desenvolvidos em IA, correspondentes às amostras na altura da rejeição sensorial. Neste sentido, seleccionaram-se 10 colónias negras e 10 colónias brancas de placas com número de colónias inferior a 100 e foram inoculadas nos tubos com IA-OTMA por picada (uma por tubo). Cobriram-se os tubos com uma fina camada de óleo de parafina esterilizada e em seguida incubados a 30°C entre 24 a 72 horas. As bactérias redutoras do OTMA provocam alteração da cor do meio (rosa escuro) para cor amarelada e as que produzem H_2S libertam um precipitado negro (FeS).

O meio Pseudomonas CFC foi usado para quantificação e isolamento de *Pseudomonas* spp.

O meio MRS utilizou-se para quantificação e isolamento de bactérias do ácido láctico,

2.2.5.3 Caracterização microscópica e bioquímica dos microrganismos isolados

Em cada um dos meios IA, MRS e Pseudomonas CFC, retirou-se de cada placa uma colónia das colónias com aspecto macroscópico diferente, tendo sido repicadas para placas (uma colónia para uma placa), por riscado de exaustão, com meio igual àquele onde se tinha desenvolvido e seguidamente colocadas numa estufa a 30°C, em aerobiose ou anaerobiose, conforme o ambiente anterior da placa de origem, entre 24 e 72 h, as vezes necessárias até se obter uma cultura pura.

Na identificação das estirpes utilizou-se o microscópio óptico para observação da morfologia da célula, após coloração de Gram e efectuaram-se os testes bioquímicos (Anexo O) da catalase, oxidase, KOH e ainda os testes de identificação rápida "API System". As características taxonómicas tiveram como suporte o "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989) .

A síntese da metodologia utilizada neste estudo descreve-se na Figura 9.

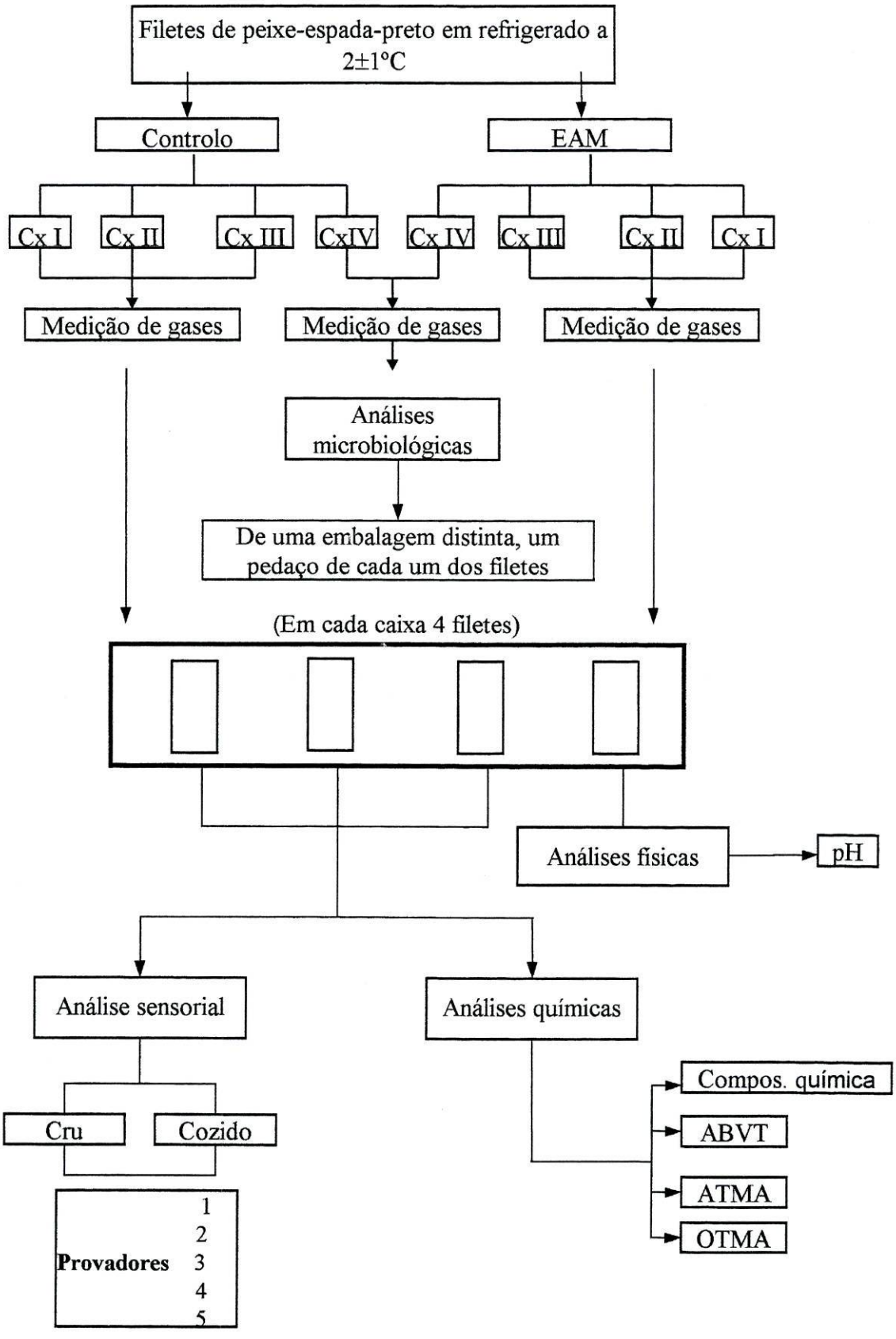


Figura 9 — Metodologia utilizada no estudo da evolução da qualidade do peixe-espada-preto.

CAPÍTULO III — RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. CARACTERIZAÇÃO DO PEIXE-ESPADA-PRETO

A.1. CARACTERÍSTICAS (BIO)ECOLÓGICAS

O peixe-espada-preto *Aphanopus carbo* pertence à família *Trichiuridae*.

Esta espécie tem uma vasta distribuição geográfica. Pode encontrar-se no Golfo de Aden, no Noroeste do Pacífico (ao longo do Japão) e no Atlântico Norte, desde a Noruega até Portugal. Localiza-se, preferencialmente, nas zonas de grande declive, entre 160 e 1800 m de profundidade. Captura-se com artes de anzol e arrasto de fundo. A zona de captura na ZEE do Continente e do arquipélago da Madeira estende-se em profundidade entre 800 e 1500 m, incluindo uma massa de água de origem mediterrânea, com significativa influência, variando a temperatura em média entre 9 e 12° C e a salinidade entre 35,9 e 39,2‰ (Martins e Cascalho, 1990).

Caracteriza-se por um corpo bastante alongado e comprimido (Fig.10). A sua pele é lisa, sem escamas e de cor acobreada com reflexos iridiscentes em vivo, tornando-se negra após a morte. Ao nível da cabeça, a sua boca grande possui uma dentição de dentes fortes na extremidade do maxilar superior e dentes laterais em série, pontiagudos e mais pequenos em ambos os maxilares. Possui ainda um espinho forte junto da abertura anal e as barbatanas ventrais estão ausentes. O comprimento pode atingir os 100 cm, mas é vulgarmente capturado com 70 cm. A alimentação carnívora abrange crustáceos, cefalópodes e peixes (Sanches, 1991).

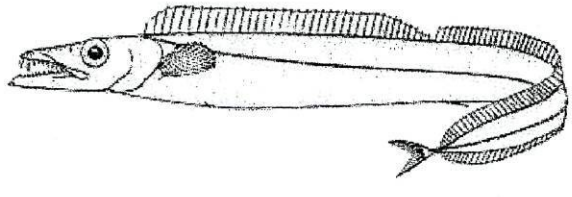


Figura 10 — Peixe-espada-preto. Fonte: Pereira (1997).

Esta espécie tem vindo a ser capturada na ZEE Portuguesa principalmente desde 1983, registando-se desde então um aumento do número de embarcações dedicadas a esta pescaria (Batista *et al.*,1989).

A.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os vários resultados relativos à composição química percentual desta espécie encontram-se no Anexo A e sumariados no Quadro 16.

Quadro 16 — Composição química percentual da parte edível do peixe-espada-preto (sem pele preta).

Amostras	n	Humidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinza (%)	Valor energético (Kcal/g)
Com pele[a]	3	82,1±1,0	0,5±0,3	16,1±0,4	1,0±0,1	68,9
Sem pele	3	82,5±0,7	0,1±0,1	16,2±0,9	1,0±0,1	65,7
Parte anterior[a] [b]	3	82,4±0,7	0,2±0,1	16,1±0,6	0,9±0,1	66,2
Parte posterior[a] [b]	2	82,6±1,4	0,5±0,1	15,7±1,4	0,9±0,0	67,3

[a] com pele branca; [b] em relação à região anal.
n = número de amostras analisadas.

A composição química aproximada das amostras deste trabalho não difere da composição determinada em estudos anteriores por Batista *et al.* (1989), Costa (1996) (não publicado) e Ferreira e Graça (1963).

Assim, no estudo realizado por Batista *et al.* (1989) a percentagem de gordura na parte edível, situava-se entre 0,5 e 5,1% e a composição química relativa das partes anterior e posterior e das amostras com e sem pele branca, era idêntica. Em Ferreira e Graça (1963) o valor percentual de gordura era de 0,3 em amostras com pele e em Costa (1996) os valores eram de 2,8 e 1,4 respectivamente, para as amostras com e sem pele. Neste trabalho os valores de gordura eram baixos o que tem a ver com a época de captura, e tal como foi referido por Costa (1996), também se verificaram valores mais baixos nas amostras sem pele branca. Os valores mais baixos referidos para as fracções sem pele branca resultam da supressão da camada de gordura subcutânea aquando da despelagem.

Os valores de humidade são mais elevados neste estudo que nos registados por Costa (1996) e por Ferreira e Graça (1963), mas idênticos aos determinados por Batista *et al.* (1989), observando-se a conhecida relação gordura-humidade, ou seja, o somatório dos respectivos valores é constante e situa-se, em regra, entre 80 e 83%.

Os teores em proteína oscilaram entre 15,7 e 16,2%, apresentando as amostras com pele branca valores mais baixos que as sem pele, contudo, ligeiramente mais baixos que os mencionados nos estudos atrás referidos.

Com base nos valores da gordura e da proteína obtidos, esta espécie pode ser classificada, segundo Stansby (1961), na categoria A, que agrupa espécies com: Gordura<5(%) e 10(%)<Proteína <20 (%), ou seja, com características de espécies magras e com teor de proteína relativamente elevado.

Os teores em cinza, tanto nas amostras com pele como sem pele branca, são idênticos aos geralmente encontrados na parte edível de grande parte dos peixes usados na alimentação.

A.3 COMPOSIÇÃO EM MINERAIS

Os teores dos diferentes minerais doseados (Anexo B) encontram-se resumidos no Quadro 17. Pela sua observação conclui-se que todos eles estão dentro dos valores considerados admissíveis para o consumo humano, por vários autores (Gordon, 1986; Lall, 1995; Decisão da Comissão, 1996).

Os valores médios obtidos para os minerais essenciais doseados nesta espécie, são idênticos aos determinados nos peixes em geral, tendo em conta os resultados publicados por Lall (1995), com excepção do níquel que, no peixe-espada-preto, apresenta um valor inferior.

Com base na análise destes resultados constata-se a inexistência de diferenças entre o teor dos vários minerais determinados nas amostras com e sem pele branca, com excepção do zinco. Este facto parece significar que uma parte deste mineral se localiza na pele.

Quadro 17 — Composição mineral da parte edível do peixe-espada-preto (sem pele preta).

Amostras n=3	Cobre *Cu* (mg/kg)	Níquel *Ni* (mg/kg)	Fósforo *P* (g/kg)	Zinco *Zn* (mg/kg)	Crómio *Cr* (mg/kg)	Mercúrio *Hg* (mg/kg)	Chumbo *Pb* (mg/kg)	Cádmio *Cd* (mg/kg)
Com pele[a]	0,1±0,0	0,03±0,02	1,2±0,1	3,8±1,2	0,5±0,0	0,8±0,2	<0,1	<0,01
Sem pele	0,1±0,0	<0,02	1,2±0,2	2,7±0,8	0,5±0,0	0,9±0,2	<0,1	<0,01
Teores Usuais	**(0,1-3,0)[b]**	**(0,1-0,3)[c]**	**(113-350)[d]**	**(1,0-32,0)[b]**	**(0,1-0,5)[b]**	**(1,0)[e]**	**(0,2-0,7)[b]**	**(<0,1)[c]**

[a] com pele branca; [b] valores usuais segundo Lall (1995), em mg/kg de parte edível de peixe; [c]valores usuais segundo Gordon (1986) em mg/100g; [d] valores usuais segundo Lall (1995), em mg/100g; [e] valor máximo admissível pela legislação em vigor (Decisão da Comissão, 1996).

A justificação destas observações relaciona-se, provavelmente, com o habitat geográfico da espécie em estudo e subsequentemente com a sua alimentação (Lall, 1995), pois a maior parte dos organismos aquáticos pode reter, e mesmo acumular, minerais do meio ambiente, cuja incorporação ou acumulação é selectiva, dispondo-se, todavia, de muito pouca informação sobre os mecanismos envolvidos nestes processos. É, contudo, bem conhecido que a acumulação é muito influenciada pela área geográfica e por factores biológicos (espécie, idade, sexo, etc.), não sendo de desprezar a importância de outros aspectos como a época do ano, disponibilidade de alimento e o meio ambiente.

Relativamente aos minerais contaminantes e com carácter cumulativo — mercúrio, chumbo e cádmio — é de referir que os dois últimos apresentaram valores médios bem mais baixos (respectivamente 0,1 e 0,01mg/kg da parte edível) que os constantes nas recomendações legais em vigor (Quadro 17), enquanto que os teores de mercúrio se situavam muito próximos do limite admissível para o consumo humano (1,0 mg/kg), adoptado pelos países da UE.

Estes três elementos, tanto quanto é conhecido, não apresentam qualquer papel sob o ponto de vista nutricional, sendo-lhes atribuída uma acção tóxica devido ao efeito cumulativo, isto é, a eliminação do organismo humano faz-se muito lentamente, pelo que ingestões regulares mínimas poderão provocar lesões ao nível do fígado, rins, sistema nervoso, etc. Assim, o chumbo pode provocar o saturnismo (perda de apetite, astenia, vómitos, emagrecimento, etc.). O cádmio

ingerido parece fixar-se essencialmente no córtex renal, daí resultando lesões importantes. Os sais orgânicos do mercúrio são considerados os mais tóxicos. Parecem ter afinidade particular com os grupos –SH das proteínas, formando complexos metilmercúrio-cisteína passíveis de circular no sangue e acumularem-se preferencialmente nas células lipídicas, reagindo com alguns fosfolípidos e libertando, posteriormente, aldeídos esteáricos e palmíticos, que por sua vez podem apresentar toxicidade. O etilmercúrio é ainda mais tóxico, na medida em que é muito mais estável. Existem muitos factores que parecem influenciar a bioacumulação do mercúrio nos produtos marinhos, porém, a posição do animal na cadeia alimentar, assim como o seu tamanho e idade, parecem ser aspectos relevantes, mas, na maior parte das situações, não é possível indicar com rigor as causas possíveis para os teores apresentados (Boudene, 1986).

As intoxicações provocadas por cobre são muito pouco referenciadas, no entanto a Organização Mundial de Saúde aconselha doses diárias inferiores a 0,5mg por kg de peso corporal e valores de zinco e de molibdénio dentro dos valores normais, uma vez que estes elementos podem influenciar o metabolismo do cobre.

Aos restantes minerais analisados não é atribuída nenhuma acção tóxica específica. Com base nos resultados obtidos neste estudo e considerando os valores limite ou indicativos, pode concluir-se então que a ingestão de peixe-espada-preto não constitui um risco na dieta da população portuguesa.

A.4 CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL

4.1 COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS

Os resultados da distribuição em aminoácidos totais (mg/100g de proteína ou de parte edível) do peixe-espada-preto encontram-se representados no Quadro 18, bem como o perfil de aminoácidos da proteína do ovo.

Em termos de maior abundância, destacam-se no grupo dos alifáticos a leucina (9,7/100g de proteína) seguida da valina (5,7) e no grupo básico a lisina (10,9) e a arginina (6,6). Do conjunto

dos aminoácidos sulfurados salienta-se a metionina (6,2) e dentro dos aromáticos ressaltam a fenilalanina (4,1) e o triptofano (0,6). No grupo dicarboxílico são os ácidos aspártico (11,3) e glutâmico (17,9) que apresentam os valores mais elevados, sendo estes também, dentre todos, os mais abundantes nas proteínas da espécie em estudo. A prolina, aminoácido do grupo heterocíclico, tem valores notórios (6,7) nas amostras de peixe-espada-preto. A treonina (4,7) e a serina (4,3), pertencentes ao grupo álcool e fenol possuem concentrações razoáveis. Em conclusão, os aminoácidos que apresentam maior abundância são o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a leucina, a lisina, a arginina, a prolina e até a metionina. No Anexo C inclui-se a classificação dos aminoácidos que entram na composição das proteínas, usada neste estudo.

Quadro 18 — Distribuição de aminoácidos totais no peixe-espada-preto e no ovo.

Aminoácidos totais	g/100g de parte edível	g/100g de proteína	Ovo [a] g/100g de proteína
Ácido aspártico	1,8±0,1	**11,3±0,2**	-
Treonina*	0,8±0,1	4,7±0,1	5,1
Serina	0,7±0,0	4,3±0,3	-
Ácido glutâmico	2,9±0,1	**17,9±0,7**	-
Prolina	1,1±0,2	**6,7±0,9**	-
Glicina	0,8±0,0	4,7±0,1	-
Alanina	1,1±0,0	**6,6±0,1**	-
Valina*	0,9±0,1	5,8±0,4	6,9
Cistina/cisteína	0,3±0,1	1,6±0,3	-
Metionina*	1,0±0,1	**6,1±0,3**	**3,4**
Isoleucina*	0,9±0,1	5,4±0,1	6,3
Leucina*	1,6±0,1	**9,7±0,2**	**8,8**
Tirosina	0,7±0,1	4,1±0,1	-
Fenilalanina*	0,7±0,1	4,1±0,1	5,6
Lisina*	1,8±0,1	**10,9±0,2**	**7,0**
Histidina*	0,4±0,1	2,3±0,2	2,4
Arginina*	1,1±0,1	**6,6±0,1**	**6,1**
Triptofano*	0,1±0,0	**0,6±0,0**	-
Total AAE	**9,3**	**56,2**	**51,6**

[a] Afolabi & Oke (1981).
* Aminoácidos essenciais (AAE).

De acordo com Sainclivier (1983), as proteínas do pescado, em comparação com as dos animais terrestres, possuem, normalmente, teores de lisina mais elevados, mas menor quantidade de metionina e de triptofano, facto este que se verifica também no peixe-espada-preto. Todos os aminoácidos essenciais importantes para o equilíbrio azotado do adulto são abundantes no

peixe-espada-preto (treonina, leucina, isoleucina e fenilalanina), sendo ainda de salientar a presença do triptofano e da lisina, compostos muito importantes pela sua imprescindibilidade no equilíbrio do ser humano adulto e cuja presença é indispensável sobretudo durante o período de crescimento (Ferreira, 1983).

Como se pode reparar, o teor de aminoácidos essenciais nesta espécie é de 56,2g/100g de proteína, valor este ligeiramente superior ao referido para a proteína do ovo (51,6g/100g) e substancialmente superior ao teor total de aminoácidos essenciais referido para outras espécies de peixe (Gonçalves, 1995) como a sarda (46,1g/100g de proteína), a sardinha (49,0g/100g de proteína) e idêntico ao do carapau (56,8g/100g de proteína), espécies estas tão consumidas pela população portuguesa (DGPA, 1998).

4.1.1 Valor nutricional das proteínas

No Quadro 19 encontram-se os resultados relativos aos parâmetros nutricionais para o peixe-espada-preto, calculados com base nos dados indicados no Anexo D.

Quadro 19 — Parâmetros de avaliação nutricional do peixe-espada-preto (sem pele).

Parâmetros Nutricionais	
Aminoácido Limitante[a]	60,0 (Triptofano)
Aminoácido Limitante[b]	40,0 (Triptofano)
Índice de Aminoácidos Essenciais[b]	**91,2**

[a] Calculado segundo Acton & Rudd (1987), com o padrão de referência FAO/WHO (1973).
[b] Calculado segundo Acton & Rudd (1987), utilizando a proteína do ovo FAO (1970).

O valor mais baixo foi registado para o aminoácido triptofano. Este resultado indica a possibilidade deste aminoácido estar presente numa concentração que poderá ser limitante, no que respeita aos requisitos para a alimentação humana. Segundo Sainclivier (1983), são os aminoácidos metionina e cisteína/cistina que constituem, em regra, o factor limitante nas espécies

marinhas (desconhece-se, no entanto, se houve determinação do triptofano), o que no peixe-espada-preto, porém, não aconteceu.

4.2 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS

Os lípidos do pescado são constituídos por uma grande variedade de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. A distribuição dos principais ácidos gordos nos lípidos do peixe-espada-preto, em amostras com e sem pele branca e das partes anterior e posterior em relação à região anal, encontra-se no Quadro 20.

Quadro 20 — Distribuição percentual dos ácidos gordos do peixe-espada-preto (sem pele preta).

Ácidos gordos [a]	Sem pele (%)	Com pele (%)	Parte anterior [b] (%)	Parte posterior [b] (%)
14:0	0,9±0,4	1,5±0,5	0,8±0,8	1,5±0,4
16:0 (ácido palmítico)	17,7±1,0	15,3±1,2	16,0±1,7	14,4±1,9
17:0	1,8±0,6	1,5±0,2	2,1±0,5	1,8±0,2
18:0	6,7±0,2	5,7±0,7	6,3±0,8	5,8±0,4
Outros	0,9±0,2	0,6±0,0	0,5±0,4	0,4±0,3
Total de saturados	**27,6±0,4**	**24,6±1,6**	**25,6±2,1**	**23,9±2,1**
16:1ω7	1,6±0,6	2,8±0,7	2,0±0,6	2,8±0,8
18:1ω9 (ácido oleico)	18,7±5,7	28,9±5,5	23,1±4,4	29,9±5,2
20:1ω9	4,0±1,0	7,5±1,8	6,9±2,8	8,4±2,8
22:1	1,5±1,0	3,8±2,1	4,3±2,9	4,6±2,8
24:1ω9	1,0±0,2	1,7±1,0	1,8±1,0	1,8±1,2
Total de monoinsaturados	**26,7±7,2**	**44,7±5,7**	**38,2±10,1**	**47,6±2,7**
18:2ω6	1,1±0,1	1,2±0,2	0,7±0,6	1,2±0,1
18:4ω3	-	0,2±0,3	-	-
20:4ω6	6,0±1,8	5,2±1,8	5,7±1,6	4,5±1,4
20:5ω3 (ácido eicosapentaenóico)	3,8±0,4	2,7±0,4	3,4±0,7	2,7±0,1
22:5ω3	1,7±0,3	1,4±0,3	1,8±0,3	1,3±0,4
22:5ω6	0,1±0,0	-	-	-
22:6ω3 (ácido docosahexaenóico)	30,0±3,3	17,9±3,3	23,1±5,6	16,8±2,2
Total de polinsaturados	**42,7±5,0**	**28,6±4,5**	**34,3±7,4**	**26,6±2,3**
Não identificados	3,0±2,7	2,0±0,7	1,8±1,2	2,0±0,5
Total ω3	35,6±3,6	22,3±3,4	28,3±6,6	20,9±2,3
Total ω6	7,1±1,7	6,4±1,8	6,5±1,0	5,7±1,4
Relação ω3/ω6	**5,1±0,9**	**3,7±1,0**	**4,4±0,7**	**3,9±1,1**

[a] n=3; [b] em relação à região anal, com pele branca.

Da análise do quadro anterior verifica-se alguma diferença na distribuição dos ácidos gordos entre as fracções com e sem pele branca, facto este que terá a ver com os lípidos situados na camada

subcutânea. Assim, é de salientar que o teor total de saturados era da mesma ordem de grandeza, enquanto que os monoinsaturados eram dominantes nos lípidos da amostra com pele branca e os polinsaturados na fracção muscular sem pele. Este perfil sugere a predominância de monoinsaturados na pele branca. Comparando as distribuições nas partes posterior e anterior, verificou-se uma predominância de monoinsaturados em ambas as amostras, aliás como era expectável, devido à presença da pele, sendo o teor superior registado na parte posterior.

Dentro do grupo dos ácidos gordos saturados, o ácido palmítico (16:0) é o mais abundante nos diferentes tipos de amostras de filetes do peixe em estudo, com valores percentuais compreendidos entre 14,4 e 17,7%, valores estes em consonância com o estudo de Costa (1996). Seguem-se por ordem decrescente o 18:0, o 17:0 e o 14:0.

O ácido oleico (18:1ω9) destacava-se do conjunto dos ácidos gordos monoinsaturados, pela percentagem considerável em todas as amostras, todavia, era nas amostras com pele branca que o valor percentual se apresentava mais elevado. Dos restantes destacou-se o 20:1ω9 com teores percentuais de 4,0 e 7,5%, respectivamente nas amostras sem e com pele branca.

No que respeita aos ácidos gordos polinsaturados há que realçar o valor mais elevado nas amostras sem pele (42,7) e em todas as amostras é o ácido docosahexaenóico (DHA) (22:6ω3) o mais abundante, apresentando nas amostras sem pele o maior teor, ou seja, valores ao redor de 30,0%. A notória diferença entre os teores do ácido gordo 22:6ω3 e do 20:5ω3 deve-se provavelmente ao facto de parte do primeiro ser biossintetizado pelos peixes, algas e plâncton a partir do 20:5ω3, ácido eicosapentaenóico (EPA), de acordo com estudos realizados por Weber *et al.* (1986), referidos em Bandarra *et al.* (1992).

No estudo efectuado por Costa (1996) nesta espécie, a distribuição percentual dos ácidos gordos não foi idêntica, ou seja, as amostras sem pele e com pele branca apresentavam ambas maior valor de ácidos monoinsaturados (51,3 e 62,3% respectivamente).

O total de ω3 nas amostras sem pele branca é superior, assim como a relação ω3/ω6, cujos valores são respectivamente 5,1 e 3,7% nas mostras sem pele e com pele.

4.2.1 Valor nutricional dos ácidos gordos

Embora o teor em gordura no peixe-espada-preto seja muito baixo, verificou-se que a percentagem de ácidos gordos polinsaturados era maioritária no músculo sem pele e, por outro lado, que a relação ω3/ω6 é apreciável. Todavia, este valor (5,1) é ligeiramente inferior aos observados para outras espécies de peixe muito usadas na alimentação dos portugueses, caso da sardinha, sarda e pescada, em que os valores médios da relação ω3/ω6 são respectivamente 17,3, 6,5 e 5,6.

O Quadro 21 sumariza os resultados correspondentes aos principais componentes da caracterização bioquímica/nutricional do peixe-espada-preto sem pele preta mas com pele branca, dado o interesse alimentar dos filetes desta espécie de pescado.

Quadro 21 — Síntese dos teores determinados em diferentes componentes químicos do peixe-espada-preto (sem pele preta).

Componentes químicos	Teores
Composição química aproximada (%)	
Humidade	82,1
Gordura	0,5
Proteína	16,1
Cinza	1,0
Valor energético (kcal/100g)	68,9
Substâncias minerais (mg/kg)	
Cobre	0,1
Níquel	0,03
Fósforo	1,2
Zinco	3,8
Crómio	0,5
Aminoácidos essenciais (g/100g de proteína)	
Lisina	10,9
Leucina	9,7
Meteonina	6,1
Arginina	6,6
Alanina	6,6
Acidos gordos (%)	
Saturados	24,6
Monoinsaturados	44,7
Polinsaturados	28,6
Relação ω3/ω6	3,7

B. EVOLUÇÃO DA QUALIDADE DE FILETES DE PEIXE-ESPADA-PRETO EMBALADOS EM ATMOSFERA MODIFICADA

O dióxido de carbono tem sido referido como o gás mais efectivo no prolongamento do período de conservação do pescado fresco. O oxigénio é, em regra, adicionado para manter a cor e no caso do peixe branco contribui também para reduzir a quantidade de exsudado (Stammen *et al.*, 1990).

Na conservação de filetes do peixe-espada-preto é importante considerar, por um lado o baixo teor em lípidos e por outro, a necessidade de se preservar a cor branca, assim como os outros atributos sensoriais. De acordo com experiências anteriores realizadas com esta mesma espécie, a mistura 40%CO_2/32%O_2/ 28%N_2 parece ser a que mais contribui para aumentar o seu "tempo de prateleira" (Gonçalves *et al.*, 1997). Porém, atendendo ao efeito neutro do N_2, seleccionou-se pra este estudo a atmosfera 70%CO_2/30%O_2.

A temperatura de refrigeração seleccionada para a armazenagem das embalagens dos filetes de peixe-espada-preto foi de cerca de 2°C. Nesta selecção teve-se em conta as temperaturas de refrigeração utilizadas nos circuitos normais de comercialização, assim como a necessidade de inibir o crescimento do *Clostridium botulinum*. O valor médio da temperatura registado durante o período de armazenagem dos filetes de peixe-espada-preto foi de 2±1°C (Anexo E).

Os ensaios realizados tiveram um tempo de duração máxima de dezassete dias para as amostras embaladas em atmosfera modificada, aqui designadas por EAM, e de dez dias para as amostras controlo (Ar). O último dia de cada ensaio correspondeu à altura da rejeição sensorial das amostras pelo painel de provadores, ou seja, quando os filetes de peixe-espada-preto deixaram de ser considerados edíveis. Assim, neste estudo os filetes embalados em ar atingiram o seu limite de tempo de prateleira ao décimo dia, o que está de acordo com Gram *et al.* (1987), enquanto que nas EAM o período de conservação foi prolongado por mais sete dias.

B.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS MISTURAS

Ao longo da armazenagem dos filetes de peixe-espada-preto, a composição da atmosfera sofreu algumas alterações como pode ser observado na Figura 11.

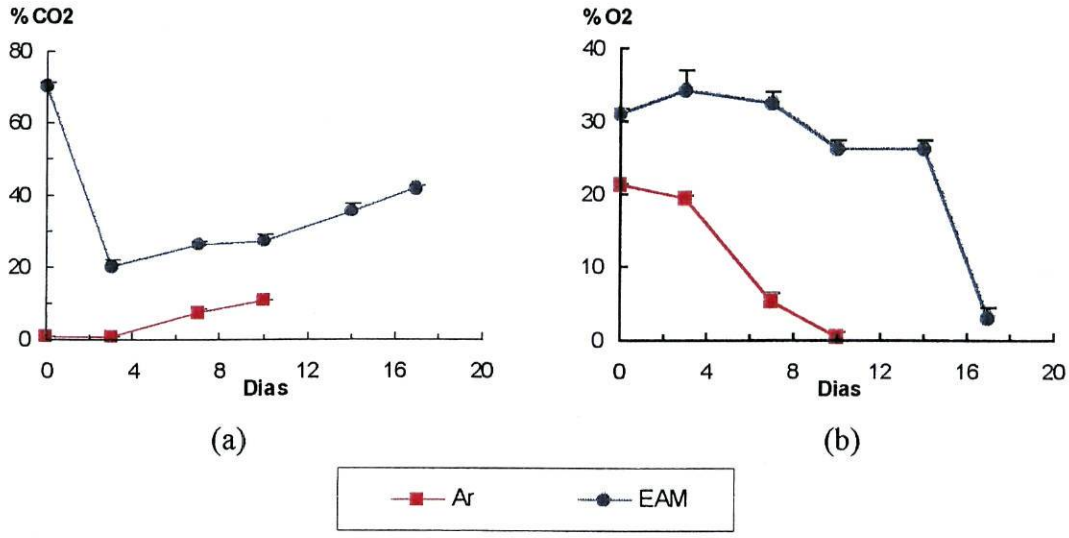


Figura 11 — Variação da composição da atmosfera nas embalagens dos filetes de peixe-espada-preto, armazenados a 2±1°C. (a) - variação do CO_2; (b) - variação do O_2. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

Estes resultados (Anexo F) mostram uma diminuição acentuada do teor de CO_2, cerca de 50% entre o início e o terceiro dia da conservação (Fig. 11a), a qual é devida à dissolução do CO_2 no músculo do peixe. Posteriormente registou-se um aumento progressivo da percentagem deste gás, consequência da actividade respiratória microbiana (Pastoriza, 1996b). Em Ar verificou-se um aumento gradual do CO_2 a partir do terceiro dia de conservação, devido também à actividade respiratória microbiana.

Relativamente ao O_2 (Fig. 11b) os seus níveis tiveram evoluções diferentes nas EAM e em Ar. Assim, em EAM o nível de O_2 mantém-se praticamente constante até ao sétimo dia, ocorrendo seguidamente um decréscimo, mais acentuado entre o décimo quinto e o décimo sétimo dia. Em Ar o O_2 apenas se mantém constante até ao terceiro dia, a partir do qual se verifica um pronunciado decréscimo até ao sétimo dia. Esta evolução na fase final está relacionada com o consumo de O_2 pela actividade da microflora.

B.2 ANÁLISE SENSORIAL

A aceitação por parte dos consumidores pressupõe que o aspecto do produto inspire confiança. Para tal é necessário apreciar, visualmente, se ocorreu ou não colapso da embalagem. Neste estudo não se verificou colapso em nenhuma das embalagens de filetes de peixe-espada-preto.

Quanto aos filetes de peixe-espada-preto em cru, a sequência de atributos a analisar (Anexos G e H) iniciou-se pelo cheiro, tendo os provadores sido previamente familiarizados com a terminologia e os melhores descritores relacionados com esta espécie, como sejam, o cheiro característico a peixe fresco, o cheiro amoniacal e o sulfídrico (Fig.12).

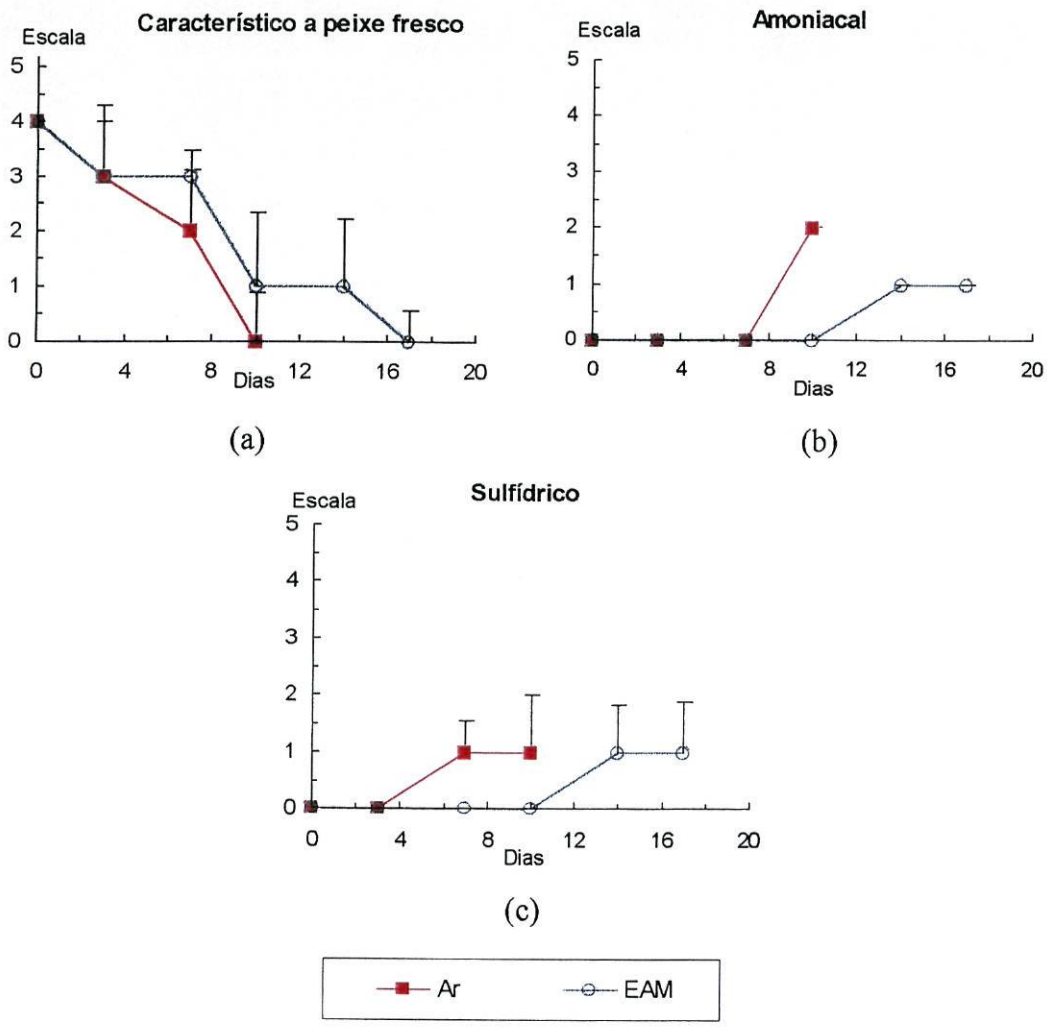


Figura 12 — Evolução sensorial do cheiro dos filetes crus de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

O cheiro característico a peixe fresco nos filetes embalados em atmosfera modificada (Fig. 12a) sofreu uma diminuição particularmente apreciável entre o sétimo e o décimo dia de armazenagem, tendo desaparecido, somente, no último dia (17°). Paralelamente, a partir do 10° dia, à medida que o cheiro característico diminuía, iam surgindo os cheiros amoniacal (Fig. 12b) e sulfídrico (Fig. 12c).

Nas embalagens em ar, a evolução do cheiro foi semelhante, só que o cheiro característico a peixe desapareceu ao décimo dia e os cheiros desagradáveis surgiram mais cedo, ou seja, o sulfídrico surgiu logo ao terceiro dia e o amoniacal foi detectado apenas no último dia (décimo). No dia da rejeição dos filetes embalados, tanto em ar como em atmosfera modificada, os níveis de cheiro amoniacal e de cheiro sulfídrico foram idênticos, porém, o primeiro é ligeiramente mais acentuado. Segundo alguns autores (Reddy *et al.*, 1994) o aparecimento destes cheiros está associado à deterioração resultante da produção de metabolitos pela actividade bacteriana.

Assim, os resultados obtidos na evolução do cheiro permite concluir que na altura da rejeição observaram-se diferenças relevantes entre os filetes conservados aerobiamente e os conservados em EAM. O intenso cheiro sulfídrico, segundo Stammen *et al.* (1990), atribui-se a produtos resultantes da oxidação de H_2S (a partir dos aminoácidos cistina e cisteína) e do CH_3SH (resultante da metionina), reacções estas com menor probabilidade de ocorrem na presença de CO_2, dado que este gás inibe o crescimento das bactérias Gram negativas, bactérias estas com maior responsabilidade na produção dos cheiros desagradáveis.

Relativamente à cor, os provadores apreciaram a alteração da cor branca e o aparecimento da tonalidade creme.

A manutenção da cor branca nos filetes de peixe-espada-preto é muito importante. Como se pode constatar na Figura 13a, a presença de O_2 parece ter algum efeito na manutenção da cor branca. Por outro lado, a tonalidade creme acentua-se mais rapidamente nas embalagens controlo que nas embalagens em atmosfera modificada, conforme pode ser observado na Figura 13b.

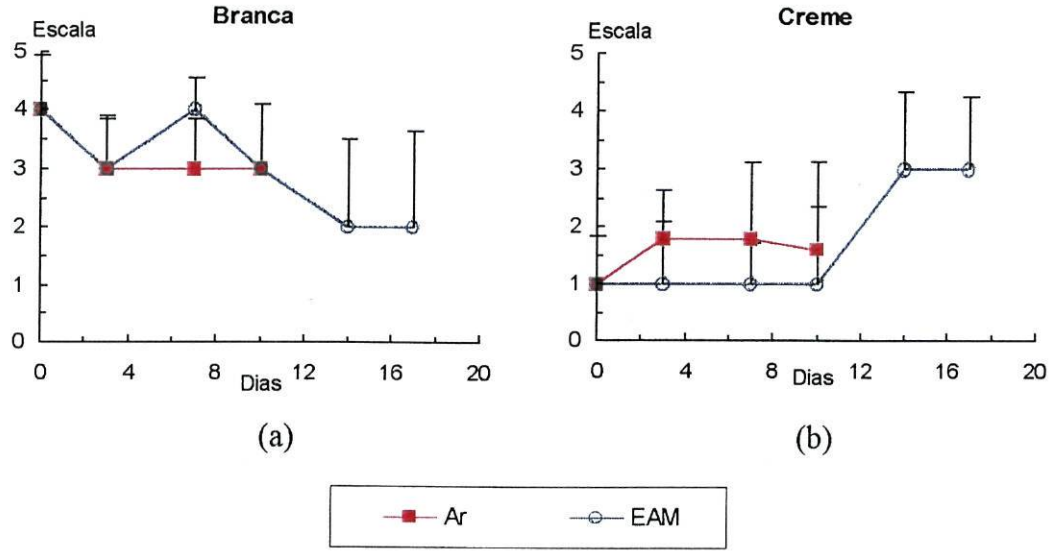


Figura 13 — Evolução sensorial da cor dos filetes de peixe-espada-preto, armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

Os resultados referidos permitem concluir que a atmosfera modificada estudada contribuiu para manter a cor branca por um período mais dilatado de tempo e ao mesmo tempo retardar o aparecimento da tonalidade creme. Em nenhuma embalagem se registou a presença de exsudado.

A evolução sensorial da textura dos filetes em cru, com base na apreciação da firmeza, é apresentada na Figura 14.

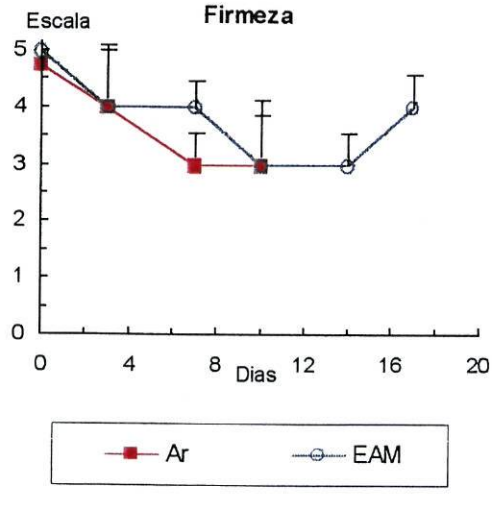


Figura 14 — Evolução sensorial da textura dos filetes crus de peixe-espada-preto, armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

De acordo com este perfil de evolução pode referir-se que o comportamento é idêntico até ao terceiro dia, registando-se uma diminuição mais acentuada deste parâmetro no produto embalado em ar ao fim do sétimo dia. Alguns autores (Stammen *et al.*,1990), com base em medições instrumentais em várias atmosferas, referem o amolecimento do músculo após o terceiro dia de armazenagem, porém neste estudo, ao terceiro dia, o amolecimento era ainda pouco notório.

A análise sensorial foi também efectuada em filetes cozidos, indicando-se nas Figuras 15, 16 e 17 a evolução das características entendidas como relevantes. Uma vez que os filetes teriam de ser provados, este ensaio nas embalagens controlo apenas se efectuou até ao sétimo dia.

Relativamente à evolução do cheiro amoniacal e sulfídrico nos filetes cozidos (Fig. 15a e b), constatou-se que nas embalagens em ar não foi detectado nenhum destes odores ao longo dos dias de conservação, enquanto que em EAM, muito antes do dia de rejeição detectaram-se ligeiros odores amoniacal e sulfídrico.

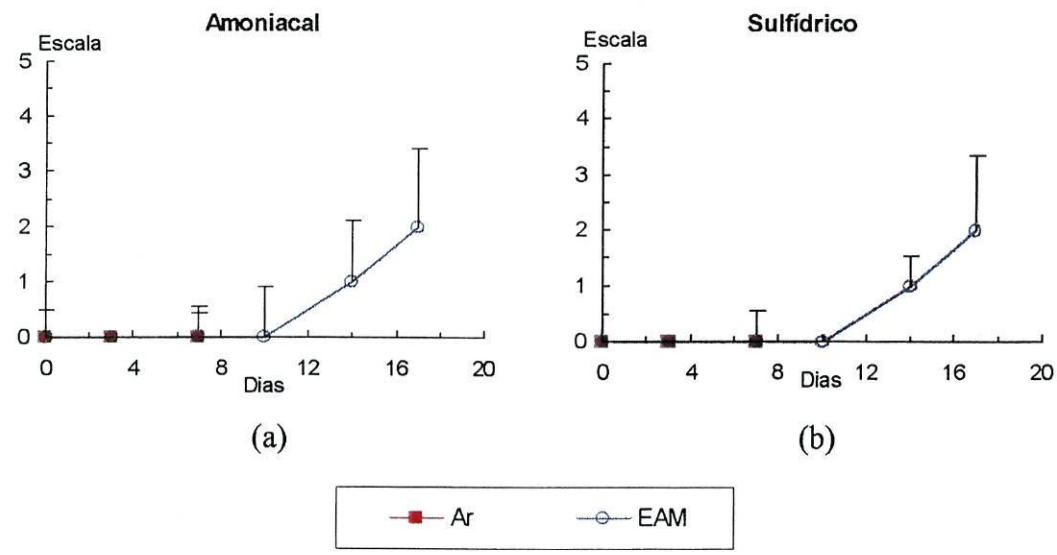


Figura 15 — Evolução sensorial do cheiro dos filetes cozidos de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

Estes resultados em EAM estão relacionados, provavelmente, com o aumento verificado nos níveis de ABVT e de ATMA, como se verá mais adiante (Fig. 17). É importante reter que a evolução do cheiro do pescado em fresco é geralmente mais acentuada em cru do que depois de cozinhado, uma vez que durante este processo alguns dos odores são arrastados na água libertada

. e outros são volatilizados durante o aquecimento.

A cor dos filetes de peixe-espada-preto em cozido (Fig. 16) tanto na superfície externa como na interna, foi diminuindo gradualmente, enquanto que a tonalidade creme aumentou. Ao mesmo tempo é de referir que os valores mais elevados da tonalidade creme foram detectados em EAM, na superfície externa.

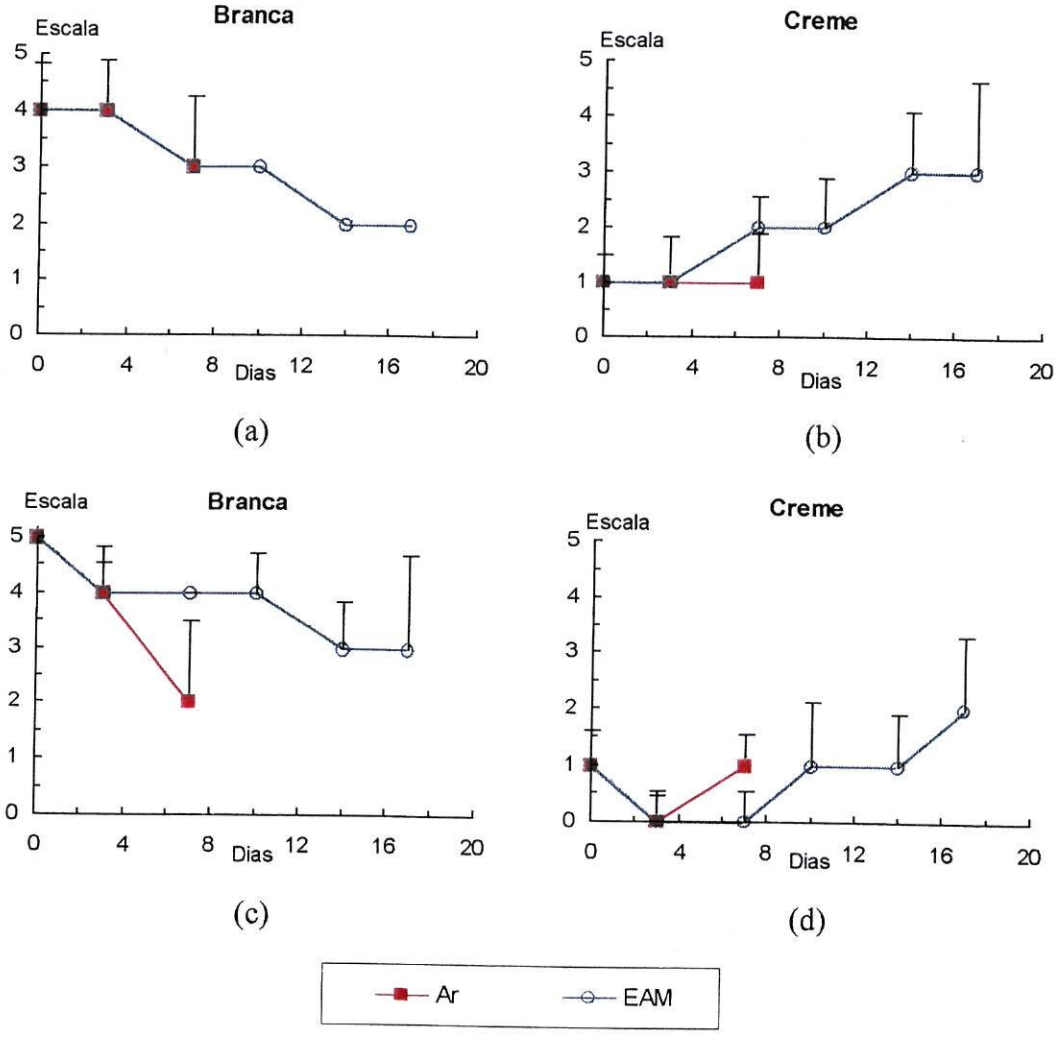


Figura 16 — Evolução sensorial da cor dos filetes cozidos de peixe-espada preto, armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. (a) e (b) - Superfície Externa; (c) e (d) - Superfície Interna. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

Na globalidade, é de referir que a presença da atmosfera modificada parece ter tido alguma eficácia na manutenção da cor da espécie em estudo.

A avaliação da textura em cozido passou pela apreciação da humidade e da firmeza (Fig.17).

Quanto à humidade (que dá uma ideia da suculência) observou-se uma diminuição ao longo do tempo de conservação (Fig. 17a) não havendo, todavia, diferença entre controlo e EAM e, portanto, não parecendo haver efeito do O_2 da atmosfera.

Relativamente à firmeza foram visíveis oscilações mais notáveis em atmosfera modificada (Fig. 17b). Comparando a firmeza em cozido e em cru, a alteração da textura é mais evidente em cozido.

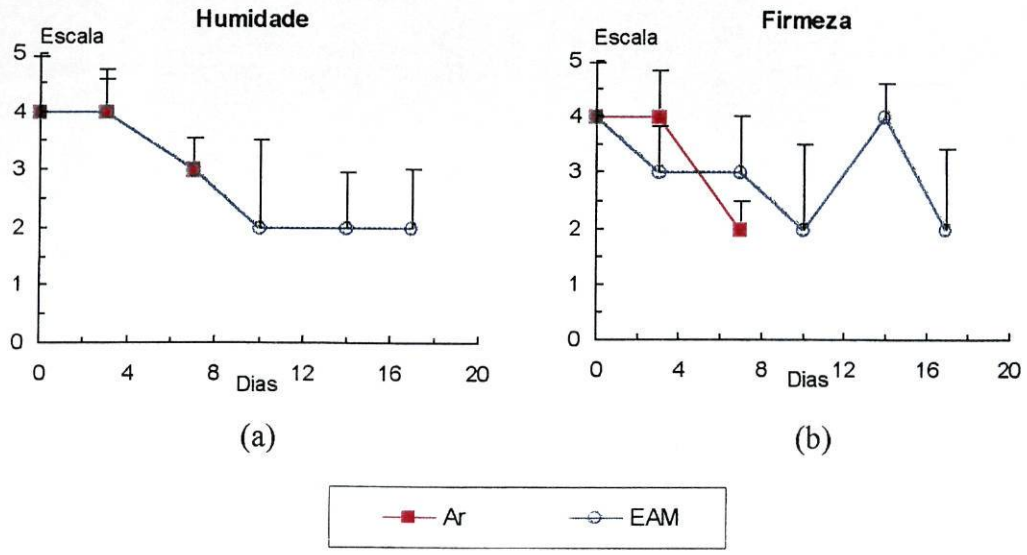


Figura 17 — Evolução sensorial da textura dos filetes cozidos de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

Os resultados referentes ao sabor — adocicado, salgado, amargo e ácido — encontram-se representados na Figura 18. Verifica-se que o sabor não sofreu grandes alterações. Assim, em relação ao sabor adocicado (Fig. 18a) verifica-se a sua ausência após o sétimo dia em EAM. Por seu lado, o sabor a sal (Fig. 18b) foi sempre detectado, o que provavelmente estará relacionado com o facto de após o processamento os filetes foram mergulhados em água do mar. O sabor amargo (Fig. 18c) surgiu apenas ao décimo sétimo dia em EAM, estando, portanto, associado à presença de CO_2. O sabor ácido nunca foi detectado, com excepção do sétimo dia da amostra controlo.

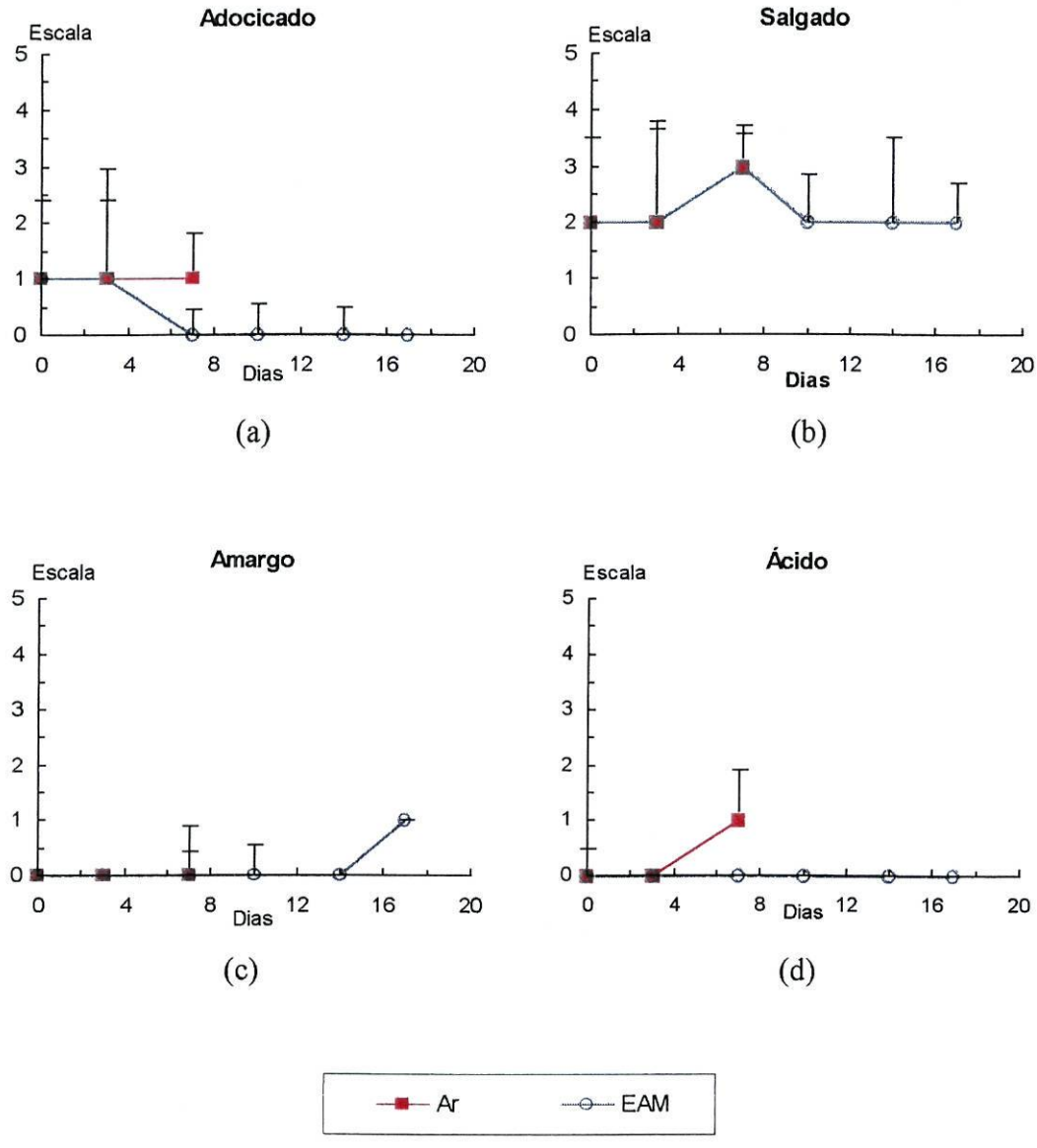


Figura 18 — Evolução sensorial do sabor dos filetes cozidos de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

B.3 ANÁLISES (BIO)QUÍMICAS

3.1 Composição química aproximada

Os valores médios obtidos na composição química aproximada e no teor em cloretos das amostras em ar e em atmosfera modificada estão apresentados no Quadro 22.

Quadro 22 — Valores médios da composição química aproximada e do teor em cloretos nos filetes de peixe-espada-preto embalados em ar e em atmosfera modificada, armazenados a 2±1°C.

Tempo de conservação (Dias)	Humidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinza (%)	Cloretos (NaCl%)
0	82,2	0,9	14,9	1,9	1,5
10 (controlo)	83,4	-	15,1	1,9	1,6
17 (EAM)	82,5	-	14,8	1,9	1,5

Com base nos resultados (Anexo I) conclui-se que a armazenagem dos filetes na atmosfera modificada não teve qualquer influência notória nos valores dos principais constituintes nem nos teores de sal.

Dado que o teor de gordura no peixe-espada-preto é bastante baixo, apenas se determinou o seu teor no ensaio do dia 0 e não se realizaram quaisquer análises referentes à oxidação dos lípidos.

3.2 Azoto básico volátil total (ABVT), Azoto de trimetilamina (ATMA) e Azoto do óxido de trimetilamina (AOTMA)

Como já se referiu, o ATMA e o ABVT são usados frequentemente como índices de qualidade do pescado fresco, sendo o ATMA resultante da redução bacteriana do óxido de trimetilamina, especialmente por bactérias Gram negativas psicrotróficas tais como *Pseudomonas* spp (Gram *et al.*,1987 e Pastoriza,1996b). Ao ATMA é atribuído o característico intenso cheiro a peixe que se pode constatar na maioria das espécies em avançado estado de deterioração.

De acordo com os valores representados na Figura 19 a evolução do ABVT (Fig.19a) e do ATMA (Fig.19b) durante o período de conservação da espécie em estudo é semelhante. Nos filetes em ar os valores destes compostos registaram uma acentuada subida a partir do terceiro dia, devido ao crescimento microbiano em ambiente aeróbio. No peixe armazenado em EAM os níveis do ABVT e do ATMA mantiveram-se mais baixos e praticamente constantes até cerca do décimo quarto dia, registando apenas no décimo sétimo dia um acentuado aumento, todavia, nunca atingindo os níveis obtidos nas embalagens em ar no dia da rejeição (Anexo J).

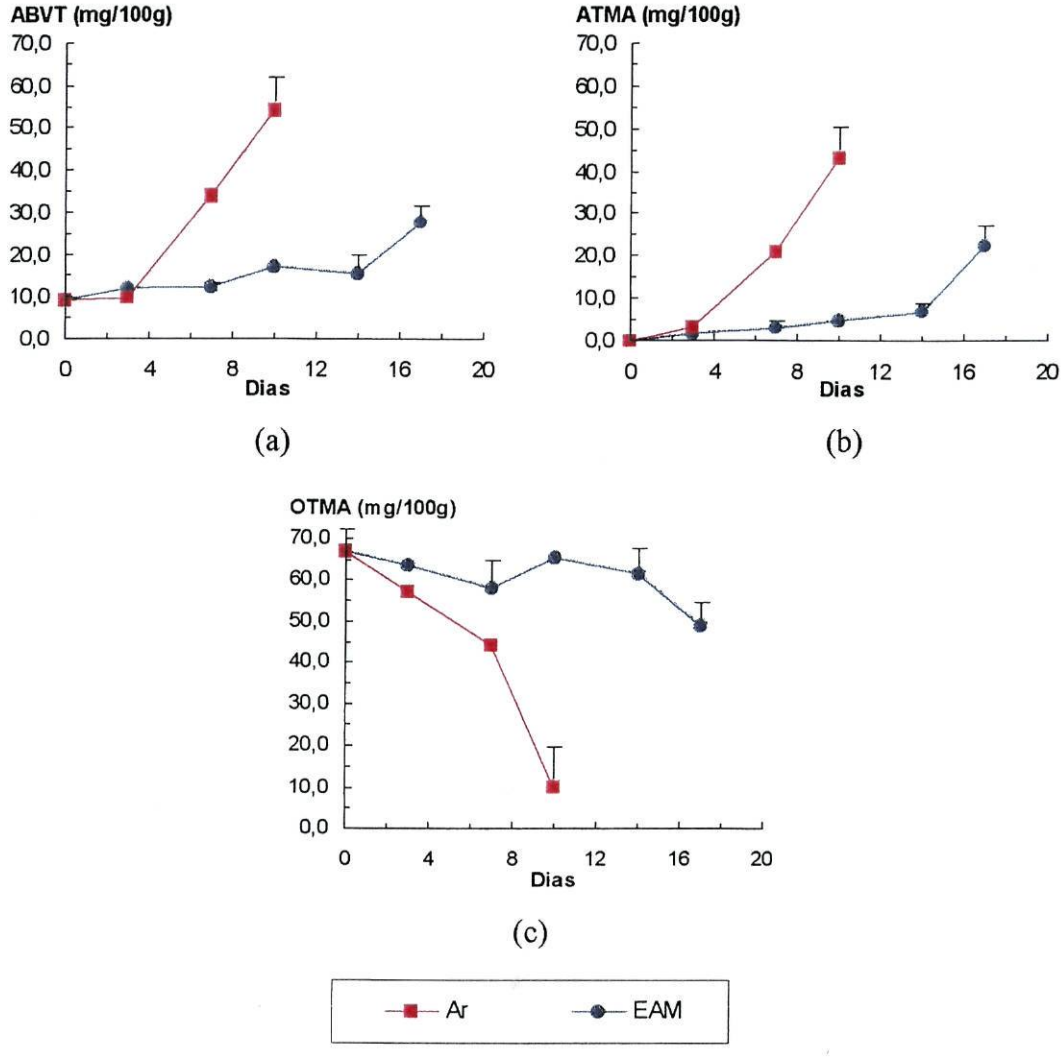


Figura 19 — Valores de ABVT, ATMA e AOTMA de filetes de peixe-espada-preto armazenados em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

Esta situação deve-se ao facto da atmosfera modificada contribuir, como era esperado, para a inibição do crescimento das bactérias produtoras de ATMA e ABVT. É contudo de realçar o facto da evolução do ABVT na atmosfera modificada em estudo ($70\%CO_2/30\%O_2$) ser semelhante à encontrada por Gonçalves *et al.* (1997) na atmosfera $40\%CO_2/32\%O_2/28\%N_2$, mas a evolução do ATMA já é diferente. Neste trabalho atingiu-se um valor de ATMA mais elevado ao décimo sétimo dia (22,6mgN/100g) do que o encontrado também na altura da rejeição (10,6mgN/100g) no trabalho atrás referido.

Relativamente aos valores do OTMA (Fig 19c) observa-se uma curva descendente, expectável, pois o óxido de trimetilamina foi reduzido a trimetilamina (Fig 19b). A quantidade de óxido de

trimetilamina (mg/100g) nas embalagens em ar e em atmosfera modificada rejeitadas sensorialmente (ao décimo e décimo sétimo dia, respectivamente) era diferente, ou seja, em ar a quantidade de OTMA era inferior à quantidade em EAM, pressupondo-se uma actividade bacteriana aeróbia maior favorecida pela relação das concentrações de O_2/CO_2 nas embalagens em ar, e o facto de a atmosfera modificada, mais rica em CO_2, retardar, inicialmente, o desenvolvimento bacteriano nas respectivas embalagens. Na ausência total ou parcial de oxigénio, é favorecido o crescimento de bactérias capazes de reduzir o OTMA e intensificada a produção de ATMA (FAO, 1995, citando Jensen, 1984). Subsequentemente, um teor mais elevado em TMA poderá ser considerado como um índice de alteração acelerada do peixe, em condições anaeróbias. No entanto, muitos autores (Huss, 1988, citando Shaw e Shewan,1968) põem em dúvida a correlação directa entre o teor de ATMA e a qualidade sensorial do peixe.

O nível de ATMA encontrado no peixe fresco rejeitado por painéis sensoriais varia entre as espécies, mas é tipicamente à volta de 10-15mg ATMA-N/100g em peixe armazenado aerobiamente. Em bacalhau embalado é de 30mg ATMA-N/100g (Dalgaard *et al.*, 1993). Neste estudo os valores respectivos eram bastante diferentes (43,1 e 22,6 mg N/100g em ar e em EAM, respectivamente) .O valor do OTMA no dia 0 era substancialmente superior (67,1 mgN/100g) ao encontrado por Batista *et al.* (1989) (42 mgN/100g) nesta mesma espécie.

Pode então concluir-se que a presença de CO_2 nas embalagens de conservação de pescado inibe o crescimento das bactérias Gram negativas, responsáveis pela produção de odores e sabores desagradáveis nestes produtos (Pastoriza *et al.*,1996b), impedindo a formação de ABVT e de ATMA com a inviabilização da capacidade das bactérias actuarem ao nível dos compostos azotados não proteicos.

B.4 ANÁLISE FÍSICA

4.1 Evolução do pH

A evolução dos valores de pH durante o período de armazenagem (Anexo K) encontra-se

representada na Figura 20. Nas amostras conservadas em ar, os valores de pH aumentaram gradualmente, facto este que está provavelmente associado a uma actividade bacteriana que tem como consequência a produção de aminas voláteis.

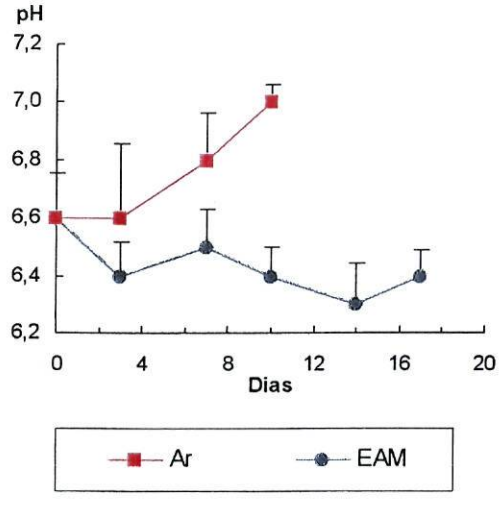


Figura 20 — Valores de pH durante a armazenagem dos filetes de peixe-espada-preto em atmosfera modificada a 2±1°C. Os resultados representam valores médios acrescidos do desvio padrão.

Contrariamente, nas amostras embaladas em EAM ocorre uma diminuição do pH entre o primeiro e terceiro dia de conservação, devida à absorção de CO_2 pela superfície do filete e subsequentemente convertido em ácido carbónico o que reduz o crescimento da maior parte das bactérias durante um certo tempo, após o qual se observa crescimento exponencial da microflora mais competitiva (Sainclivier, 1983). Em consequência da instabilidade da atmosfera (dissolução adicional do CO_2 e actividade bacteriana), nos dias seguintes ocorreram algumas flutuações do pH (Davis, 1995), registando-se no último dia de conservação um aumento do valor do pH, provavelmente correspondente ao início de uma degradação mais profunda, mas os valores são sempre inferiores ao valor inicial.

B.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O tempo de conservação dos filetes de peixe-espada-preto foi de 10 dias para as amostras embaladas em ar e de 17 dias em EAM, porém as análises microbiológicas não se efectuaram ao décimo sétimo dia mas ao vigésimo dia, por impedimentos técnicos.

5.1 Contagens dos microrganismos viáveis

Os resultados obtidos nas contagens dos microrganismos viáveis em diferentes meios de cultura constam em Anexo N.

5.1.1 Quantificação de microrganismos totais viáveis (CTV) e produtores de H_2S em IA

O crescimento observado em IA foi difícil de quantificar e isolar devido à formação de grandes aglomerados ou de colónias minúsculas. A evolução das contagens dos microrganismos viáveis em IA em diferentes condições de incubação, está representada na Figura 21.

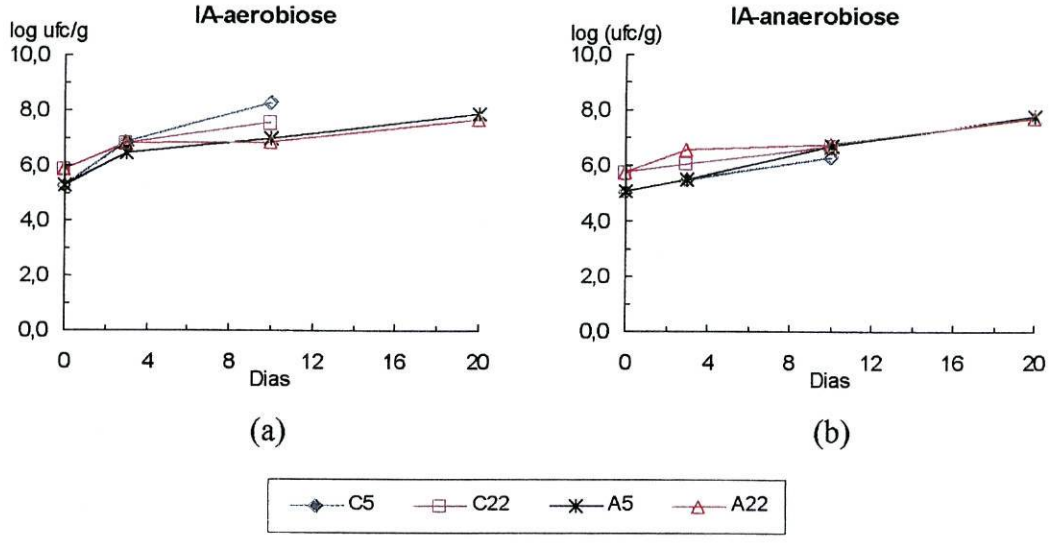


Figura 21 — Evolução das contagens dos totais viáveis em Iron Agar desenvolvidos a 5°C e 22°C, em aerobiose e anaerobiose, de filetes de peixe-espada-preto armazenados em EAM (A) e ar (C), à temperatura de 2±1°C.

Na globalidade, os valores iniciais aumentaram até ao limite de edibilidade dos filetes, com destaque para as amostras incubadas a 5°C em aerobiose, tanto em ar como em EAM, sendo os valores das contagens das amostras em ar superiores aos das amostras em EAM (Fig. 21a C5), evidenciado logo ao terceiro dia de armazenagem, atingindo no dia da rejeição sensorial (décimo dia) o valor bastante elevado de log (8,3 ufc/g). Estes dados corroboram a existência de bactérias aeróbias psicrotróficas na flora inicial do pescado (Gram *et al.*, 1987; Huss, 1988; Dalgaard, 1993; Davis, 1995)

Nas amostras de EAM também se registou um aumento das CTV no terceiro dia a ambas as temperaturas (mais elevado a 22°C), continuando a aumentar até ao final dos ensaios, porém mais notório nas placas incubadas em anaerobiose. Na altura da rejeição sensorial as amostras de EAM incubadas em aerobiose e anaerobiose não apresentaram valores nas contagens com diferenças notórias a ambas as temperaturas. É, portanto, provável a presença de microflora inicial aeróbia ou anaeróbia facultativa psicrotrófica, ocorrendo em atmosfera modificada crescimento mais uniforme da flora tolerante ao CO_2.

Em termos de CTV a carga microbiana foi bastante elevada relativamente a outras espécies (Koutsoumanis *et al.*, 1997 e Capell *et al.*, 1997).

No que respeita à comparação entre CTV e produtores de H_2S (ufc/g) em IA, no dia zero e no dia da rejeição sensorial das amostras embaladas em ar e em EAM, verificaram-se grandes diferenças, o que pode ser observado no Quadro 23.

Quadro 23 — Quantificação de CTV e de produtores de H_2S (ufc/g) em IA.

Temp. de incubação (°C)	Tempo de conservação (Dias)	Ar				Atmosfera modificada			
		Aerobiose		Anaerobiose		Aerobiose		Anaerobiose	
		CTV	**H_2S**	CTV	**H_2S**	CTV	**H_2S**	CTV	**H_2S**
5	0	$1{,}9.10^5$	**$3{,}0.10^3$**	$1{,}1.10^5$	**$5{,}0.10^2$**	$1{,}9.10^5$	**$3{,}0.10^3$**	$1{,}1.10^5$	**$5{,}0.10^2$**
	Rejeição sensorial	$2{,}1.10^8$	**$2{,}0.10^6$**	$1{,}8.10^6$	**$8{,}1.10^5$**	$7{,}4.10^7$	**$5{,}4.10^7$**	$6{,}3.10^7$	**$1{,}5.10^7$**
22	0	$7{,}1.10^5$	**$6{,}0.10^3$**	$6{,}9.10^5$	**$2{,}2.10^5$**	$7{,}1.10^5$	**$6{,}0.10^3$**	$6{,}9.10^5$	**$2{,}2.10^5$**
	Rejeição sensorial	$3{,}7.10^7$	**$2{,}3.10^6$**	$5{,}2.10^6$	**$2{,}0.10^6$**	$4{,}8.10^7$	**$4{,}5.10^7$**	$5{,}2.10^6$	**$6{,}2.10^7$**

Analisando-se comparativamente os valores totais dos microrganismos viáveis e dos produtores de H_2S, verificou-se que, tanto inicialmente como na rejeição sensorial, a flora era constituída maioritariamente por bactérias produtoras de H_2S. Comparando os valores dos produtores de H_2S e de CTV na altura da rejeição sensorial em embalagem controlo e em EAM, os respeitantes a

EAM são superiores. Estes resultados devem-se, provavelmente, ao facto de as análises microbiológicas se terem efectuado três dias após a rejeição sensorial.

Segundo Capell *et al.* (1997), em atmosfera rica em CO_2 o número de bactérias H_2S na altura da rejeição é menor que em embalagens em ar. Porém, neste estudo verificou-se o contrário, houve aumento dos valores daquelas bactérias em grandezas bastante elevadas, cujos valores são muito próximos dos relativos aos das CTV.

5.1.2 Quantificação e isolamento de microrganismos viáveis em outros meios

Meio Peudomonas CFC

A evolução das contagens dos microrganismos viáveis desenvolvidos em atmosfera aeróbia a 5° e 22° C, correspondentes a amostras embaladas em ar e em EAM, está representada na Figura.22

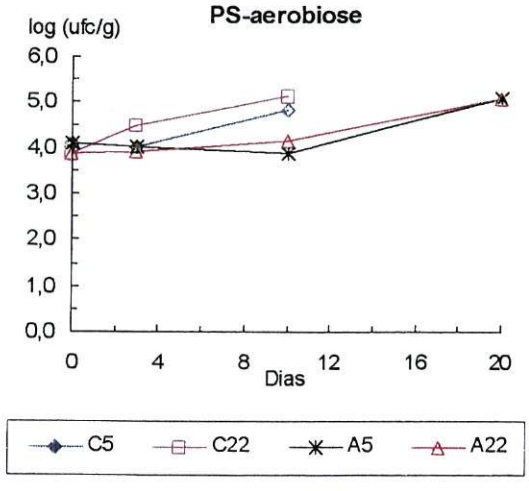


Figura 22 — Evolução das contagens de viáveis em Pseudomonas CFC desenvolvidos a 5 e 22°C, em aerobiose, de filetes de peixe-espada-preto armazenados em EAM (A) e ar (C), a 2±1°C.

Dos dados registados conclui-se que os valores iniciais são muito idênticos e globalmente não ocorreram aumentos acentuados. Nas amostras armazenadas em ar, desenvolveram-se mais microrganismos à temperatura de 22°C. Nas EAM o desenvolvimento microbiológico foi gradual

e numa ordem de grandeza inferior às outras amostras, a qualquer uma das temperaturas. A microflora existente nos filetes de peixe-espada-preto engloba organismos aeróbios psicrotróficos pertencentes ao género *Pseudomonas* spp, estando de acordo com certos autores (Gram, 1992; Liston, 1980) que afirmam que as *Pseudomonas* spp fazem parte da flora natural dos peixes de águas frias-temperadas quando armazenados a temperaturas de refrigeração. Esta microflora será inibida pela temperatura de refrigeração, mas não anulada, pois alguma cresce a 5°C.

Neste meio de cultura identificaram-se as espécies *P. Fluorescens* e *P. Cepacea*, sendo a primeira a mais identificada. Foram ainda identificadas algumas bactérias de outros géneros tais como *Aeromonas* spp e bacilos Gram positivos, na altura da rejeição, desenvolvidos a 22°C

Meio MRS

A evolução das contagens de viáveis desenvolvidos em MRS está representada na Figura 23.

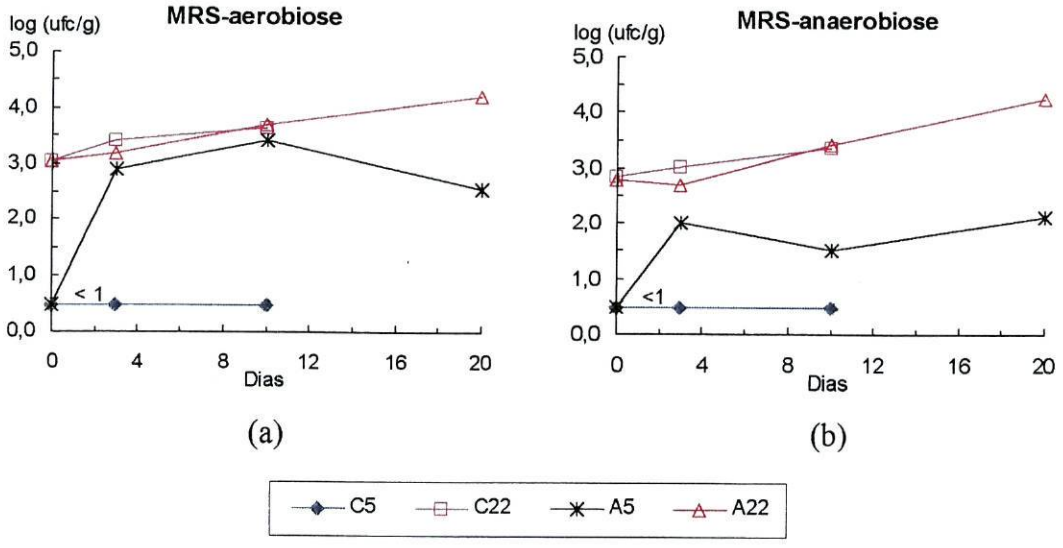


Figura 23 — Evolução das contagens dos microrganismos viáveis em MRS Agar desenvolvidos às temperaturas de incubação de 5° e 22°C em aerobiose e em anaerobiose, de filetes de peixe-espada-preto embalados em EAM (A) e em ar (C), armazenados à temperatura de 2±1°C.

Os valores iniciais nas contagens de amostras de ar e de EAM são muito idênticos a 22°C, independentemente do ambiente aeróbio e anaeróbio em que se desenvolveram.

À temperatura de 5°C as amostras em ar, não registaram desenvolvimento quantificável de microrganismos. Nas amostras em EAM a microflora desenvolveu-se mais em ambiente aeróbio, sendo de referir também algum desenvolvimento em anaerobiose. Portanto, à temperatura de 22°C os microrganismos desenvolveram-se gradualmente, independentemente do tipo de armazenagem, manifestando contudo, um ligeiro aumento a partir do 3° dia (EAM). Em EAM os microrganismos mantiveram-se em fase latente durante algum tempo, altura a partir da qual a evolução foi gradual, principalmente em aerobiose.

Pelos resultados obtidos, conclui-se que a microflora desenvolvida no meio selectivo MRS, corresponderá provavelmente a microrganismos que crescem à temperatura ambiente e com capacidade de adaptação a ambientes com pequena quantidade de O_2.e ricas em CO_2 (Fig.21). Segundo Davis (1995) as contagens de viáveis em EAM e em ar não apresentam diferenças significativas, mas as bactérias do ácido láctico possuem um maior aumento em EAM que em ar.

Identificaram-se bastantes microrganismos Gram positivos e algumas leveduras (rosas e brancas) tanto na flora inicial como na altura da rejeição, predominando bacilos Gram positivos.

Estes factos evidenciam a existência, nos filetes, de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos Gram positivos que crescem a temperaturas ambiente (mesófilos) e que na altura da rejeição sensorial coabitam com outros potencialmente deteriorantes. A serem bactérias ácido lácticas admite-se que elas se mantenham até à deterioração do pescado armazenado em ar, mas sem participação activa. Note-se que as bactérias dos géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus/Streptococcus* que crescem neste meio selectivo, têm um carácter microaerofílico ou facultativamente anaeróbio (Bergey, 1989). Estas colónias foram todas identificadas como Gram positivas e catalase negativa.

De acordo com Huss *et al.* (1997), as bactérias ácido lácticas ocorrem naturalmente no peixe mas, em armazenamento em gelo e em aerobiose podem ser facilmente dominadas pelas bactérias Gram negativas. O papel atribuído a estas bactérias pode ser um papel deteriorante ou anti-microbiano mas, segundo Koutsoumanis *et al.* (1997), estas bactérias podem constituir a flora predominante de algumas espécies, em associação com outras durante a armazenagem a baixas temperaturas em EAM, o que, porém, não acontece com espécies marinhas de águas frias ricas

em OTMA.

O ecossistema da atmosfera modificada favorece o crescimento *Br. thermosphacta* e o das bactérias ácido lácticas relativamente aos outros microrganismos tais como P*seudomonas* spp e *Sh. putrefaciens* (menos de 10% da população total) (Koutsoumanis *et al.*,1997). Assim, o peixe-espada-preto parece conter inicialmente certa flora láctica, a qual, em EAM, se vai mantendo, contribuindo para a inibição de outros microrganismos e o aumento do "tempo de prateleira" desta espécie.

5.2. Pesquisa de bactérias de deterioração

Na altura da rejeição sensorial pôde constatar-se a existência de bactérias de deterioração nas colónias desenvolvidas em IA.

Assim, todas as colónias negras produziram precipitado negro (produção de H_2S) e alteraram a cor do meio (redução do OTMA). Das colónias brancas nenhuma produziu precipitado, como era esperado, mas algumas reduziram o OTMA. Estes resultados confirmam o referido por Gram *et al.* (1987) e Capell *et al.* (1997) que as contagens de bactérias produtoras de H_2S, presumivelmente *Sh. putrefaciens*, independentemente da temperatura e da atmosfera, estão mais estreitamente associadas com a rejeição sensorial do peixe do que a contagem dos microrganismos viáveis em IA. Neste estudo não se conseguiu, porém, identificar esta espécie.

A formação de colónias negras no meio de cultura IA confirma então a presença de bactérias deteriorantes (produtoras de H_2S e redutoras de OTMA) nos filetes de peixe-espada-preto e segundo Gram *et al.* (1987) a quantidade de colónias negras em IA dá-nos uma indicação do número de organismos deteriorantes presentes no pescado.

Nas amostras embaladas em ar desenvolveu-se, na altura da rejeição, flora constituída principalmente por bactérias produtoras de H_2S e outras deteriorantes, aeróbias e/ou aneróbias facultativas.

Provavelmente também fungos, leveduras e outros grupos taxonómicos poderão ter sido inibidas pelo CO_2 da atmosfera empregue neste ensaio.

Resumindo, a flora dos filetes de peixe-espada-preto possui características psicrotróficas, sendo constituída fundamentalmente por bactérias Gram negativas aeróbias e anaeróbias facultativas e alguns bacilos Gram positivos, tendo as *Pseudomonas* spp um papel importante na deterioração dos filetes frescos em condições de embalagem em ar. Em atmosfera modificada o CO_2 teve um efeito inibidor na actividade microbiana, retardando o seu tempo de geração (aumentando a fase latente), prolongando assim, o período de conservação dos filetes de pescado tal como é referido por Dalgaard *et al.* (1993).

C. CONCLUSÕES

C.1 Caracterização nutricional do peixe-espada-preto

O peixe-espada-preto possui características de uma espécie magra com teor proteico relativamente elevado. Apresenta uma boa percentagem de aminoácidos essenciais e um perfil de ácidos gordos com maior percentagem de ácidos monoinsaturados nos filetes sem pele branca, entre os quais o ácido docosahexaenóico (DHA) se destaca com um valor relativamente elevado. É ainda uma espécie rica em minerais e com valores de mercúrio abaixo do teor máximo admissível ao consumo humano.

C.2 Evolução da qualidade de filetes de peixe-espada-preto embalados em atmosfera modificada

O "tempo de prateleira" de filetes frescos de peixe-espada-preto, conservados a 2±1°C e embalados em atmosfera modificada constituída por 70%CO_2 e 30%O_2 foi prolongado em sete dias relativamente a filetes armazenados em embalagens em ar. As espécies microbianas

produtoras de cheiro e sabor desagradáveis competiram com as que os não produzem nestas diferentes condições de armazenamento e o seu efeito parece ter sido mais notório nas características sensoriais.

Assim, a concentração do CO_2 parece ter tido um efeito inibidor na deterioração dos filetes de peixe-espada-preto por reduzir o crescimento bacteriano em geral, com efeito redutor na produção de TMA e outros compostos azotados voláteis, evitando o aparecimento de características sensoriais desagradáveis durante o período de armazenagem.

Provavelmente, *Pseudomonas* spp devido à produção de sideróforos inibiu a actividade da *Shewanella* o que parece justificar a predominância das primeiras na armazenagem em refrigerado de algumas espécies de peixes, dada a elevada densidade celular inicial de *Pseudomonas* spp. A existência de bactérias ácido lácticas leva a pressupor a sua influência no aumento do "tempo de prateleira", pois produzem grandes quantidades de ácido láctico, cujo decréscimo do pH resultante, inibe o crescimento de outros microrganismos.

Outra consideração pertinente é acerca dos valores das contagens totais microbianas e a sua correlação com a análise sensorial. Tal como referido por vários autores, nem sempre os resultados das análises microbiológicas, químicas e sensoriais coincidem na definição do "tempo máximo de prateleira" nem na aceitação do produto. Assim, nestes ensaios a análise sensorial levou a uma rejeição após sete dias, muito embora as contagens totais fossem de $4{,}8.10^7$ e $5{,}2.10^6$ em atmosfera modificada.

D. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A definição de adequados "períodos de prateleira" exige a disponibilidade de muitos dados. Assim, é de toda a conveniência recorrer à caracterização das alterações através de métodos mais rápidos e conhecer igualmente o efeito do grau de frescura da matéria prima na evolução de tais modificações. Quando se dispuser de tais resultados, poderão ser, então, aplicados tratamentos matemáticos e usados como modelos predictivos.

A análise sensorial parece ser um dos aspectos fundamentais pelo que se sugere a elaboração de tabelas mais completas quer para avaliação das alterações em cru, quer depois de cozinhado.

Por último, é de referir que ensaios com outras atmosferas e com outros materiais de embalagem são igualmente do maior interesse.

Referências Bibliográficas

ACTON, J.C.; RUDD, C.L., 1987. Protein quality methods for seafoods. *In:* Seafood Quality Determination. Eds. Donald E. Kramer, John Liston, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 453-472.

AFOLABI, O.A.; OKE, O.L., 1981. Seasonal variability of nutritive value of the fish blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Nutrition Reports International*, 24:1251-1261.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed., Association of Official Analitical Chemistry, Washington, Vol. I, 684 p.

AOAC, 1996. Official Methods of Analysis, 16th ed., Association of Official Analitical Chemistry, Washington, Dc, Vol. I, 684 p.

BANDARRA, N M.; NUNES, M.L.; CAMPOS, R M.; BATISTA, I., 1992. Variação sazonal dos lípidos de sardinha *Sardina pilchardus. Relatórios Técnicos e Científicos INIP*, Lisboa 59, 19p.

BANDARRA, N.M.; BARATA, J. D.; BATISTA, I.; NUNES, M.L.; BRUGES, M.; DICKSON, J.; EMPIS, J.M., 1997. Influence of sardine oil supplements on fatty acid profile and cholesterol levels in the rat. *In*: Seafood from Producer to Consumer. An Integrated Approach to Quality. Eds. J. B. Luten, T. Borrense, T., Oehlenschlager, J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 609-619.

BATISTA, I.; BANDARRA, N.M., 1993. Influência de quatro métodos culinários na composição química de várias espécies de peixe. *Revista Portuguesa de Nutrição*, Vol.V, 3: 5-14.

BATISTA, I.; NUNES, M.L.; CAMPOS, R M., 1989. Peixe-espada-preto (Aphanopus carbo). Composição química e preparação de filetes. *Relatórios Técnicos e Científicos INIP*, 14, 14 p.

BERGEY, D.H., 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds. Holt, J.C., Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 786 p.

BOUDENE, U., 1986. Toxicité des métaux. *In*: Toxicologie & Securité des Aliments. Ed. Coordennateur, R. Derache. Technique et Documentation, Lavoisier – APRI, Paris, 159-198.

CAPELL, C.; VAZ-PIRES, P.; KIRBY, R., 1997. Use of counts of hydrogen sulphide producing bacteria to estimate remaining shelf-life of fresh fish. *In*: Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry. International Institute of Refrigeration, Paris, 175-182.

COBB, B.F.; ALANIZ, I.; THOMPSON, Jr. C.A., 1973. Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. *J. Food Sci.*, 38: 431-436.

COSTA., J., 1996. Caracterização dos lípidos de diversas espécies de pescado. Relatório de estágio de Licenciatura em Química Tecnológica, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, 118 p.

COYNE, F.P., 1932. The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. I. *J. Soc. Chem. Ind.*, 51: 4-19.

COYNE, F.P., 1933. The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. II. *J. Soc. Chem. Ind.*, 52: 1-15.

D.G.P.A., 1998. Pescas em Portugal 1986-1996. Direcção Geral das Pescas e Aquicultura, Lisboa, 279 p.

DALGAARD, P., 1993. Evaluation and prediction of microbial fish spoilage. PhD Thesis. The Tecnological Laboratory of the Danish Ministry of Fisheries and the Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, 143 p.

DALGAARD, P., 1997. Microbial methods and predictive modelling – an introduction, *In*: Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry. International Institute of Refrigeration, Paris, 137-139.

DALGAARD, P.; GRAM, L.; HUSS, H.H., 1993. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International journal of Food Microbiology*, 19: 283-294.

DAVIS, H.K., 1995. Pescados. *In:* Envasado de los alimentos en atmósfera modificada. Ed. Parry, R.T., A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid, 214 -256.

DROSINOS, E.H.; NYCHAS G.J.E., 1996. *Brochothrix thermosphacta*, a dominant microrganism in mediterranean fresh fish (*Sparus aurata*) stored under modified atmosphere. *Italian Journal of Food Science*, 4: 323-329.

EUROPEAN COMMISSION, 1996. Regulation Draft III/5125/95 Rev.1, Setting maximum limits for certain contaminants in food stuffs, 10 p.

FAO, 1970. Amino acid content of foods and biological data on proteins. *FAO Nutricional Studies*, 24 Rome, 178 p.

FAO, 1989. Yield and nutrititional value of the commercially more important fish species. *FAO Fish Tech. Pap.*, 309, Rome, 187 p.

FAO, 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 348, Rome, 195 p.

FAO/WHO, 1973. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. *Tech.Rept. Series*, 52: *61-66.*

FARBER, J.M., 1991. Microbiological aspects of modified - atmosphere packaging technology - a review. *J. Food Prot.*, 54: 58-70.

FDA, 1993. Guidance Document for Cadmium in Shellfish. U.S. FDA Washington, D.C., 24 p.

FERREIRA, F.A., 1983. Nutrição humana. *Fundação Calouste Gulbenkian*, Lisboa, 1277 p.

FERREIRA. F.A. G.; GRAÇA, M.E.S., 1963. Tabela da composição dos alimentos portugueses. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2ª ed., Lisboa, 186 p.

FLOROS, J.D., 1990. Controlled and modified atmospheres in food packaging and storage. *In*: Chemical Engineering. Progress, Purdue Univ.,West Lafayette, 25-32.

FUNG, D.Y.C.; HART, R.A.; CHAIN, V., 1986. Rapid methods and automated procedures for microbiological evaluation of seafood. *In:* Seafood Quality Determination. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 247-253

GARCIA, G.W.; GENIGEORGIS, C.; LINDROTH, S., 1987. Risk of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* nonproteolytic types B, E and F in salman stored under modified atmospheres at low and abused temperatures. *J. Food Prot.*, 50: 330-383.

GIBSON, D.M.; DAVIS, H.K., 1995. Fish and sellfish products in sous vide and modified atmosphere packs. *In:* Principles of Modified-atmosphere and Sous Vide Product Packaging. Eds. Farber, J.M. e Dodds, K.L., Canadá, 7: 153-174.

GIBSON, D.M.; OGDEN, I.D., 1997. Total viable counts. *In*: Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry. International Institute of Refrigeration, Paris, 147-150.

GONÇALVES, A., 1995. Caracterização química e avaliação nutricional de três espécies da costa portuguesa. Relatório de Estágio da Licenciatura em Recursos Faunísticos e Ambiente, Instituto Português de Investigação Marítima, Lisboa, 40 p.

GONÇALVES, A.; PEREIRA, T.; NUNES, M.L., 1997. Effects of modified atmospheres on the shelf life of black scabbardfish (*Aphanopus carbo*). 27th Annual WEFTA Meeting, Madrid, October 20-22.

GORDON, D.T., 1986. Minerals in seafood: availability and interactions. *In:* Seafood Quality Determination. Eds. D. E. Kramer and J. Listen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 517-542.

GRAM, L., 1992. Evaluation of the bacteriological Quality of seafood. *International Journal of Food Microbiology,* 59: 2197-2203.

GRAM, L.; TROLLE, G.; HUSS, H.H., 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology,* 4: 65-72.

HOBBS, G., 1991. Fish: microbiological spoilage and safety. *Food Science and Technology Today,* 3: 166-173.

HUSS, H.H., 1988. Le poisson frais: qualité et altérations de la qualité. *FAO: Peches*, Rome, 29, 132 p.

HUSS, H.H.; DALGAARD, P.; GRAM, L., 1997. Microbiology of fish and fish products. *In*: Seafood from Producer to Consumer. An Integrated Approach to Quality. Eds. Luten, J.B., Borrense, T., Oehlenschlager, J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 609-619.

HUSS, H.H.; TROLLE, G.; GRAM, L., 1986. New rapid methods in microbiological evaluation of fish quality. *In:* Seafood Quality Determination. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 299-308.

INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE, 1985. NORMA PORTUGUESA NP – 3005, Microbiologia Alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. Lisboa, Direcção Geral da Qualidade, 8 p.

INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE, 1985. NORMA PORTUGUESA NP – 3006, Microbiologia Alimentar. Pescado. Preparação da amostra para análise microbiológica. Direcção Geral da Qualidade, Lisboa, 6 p.

INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE, 1988. Norma Portuguesa NP-2928, Pescado. Determinação do teor de mercúrio. Método espectrofotométrico de absorção atómica sem chama. Direcção Geral da Qualidade, 5p.

ISO/TC, 34/SC 6 N371, 1991. Meat and Meat Products – Determination of Total Phosphours Content (reference method).

KAKOURI, A.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.E., 1997. Storage of mediterranean fresh fish (*Boops boops*, and *Sparus aurata*) under modified atmospheres or vaccum at 3 and 10°C. *In*: Seafood from Producer to Consumer. An Integrated Approach to Quality. Eds. Luten, J. B. Borrense, T., Oehlenschlager, J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 609-619.

KOUTSOUMANIS, K.; TAOUKIS, P.; DROSINOS, E.S.; NYCHAS, G.J.E., 1997. Lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* – The dominant spoilage microflora of mediterranean fresh sea fish stored under modified atmosphere packaging conditions. *In*: Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry. International Institute of Refrigeration, Paris, 158-165.

LALL, S.P., 1995. Macro and trace elements in fish and shellfish. *In*: Fish and Fishery Products – Composition, Nutritive Properties and Stability. Ed. Ruitter, A., 6: 187-213.

LANNELOGUE, M.; FINNE G.; HANNA, M.O.; NICKELSON R.; VANDERZANT, G., 1982. Microbiological and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO_2 – enriched atmospheres. *J. Food Prot.*, 45: 1197-1207.

LEPAGE, G.; ROY, C.C., 1996. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27: 114-119.

LINDSAY, R.C., 1981. Controlled atmospheric packaging of refrigerated fresh fish. *In*: Fourth Annual International Seafood Conference. Int. Seafood Conf., Washington, D.C., 80 p.

LINDSAY, R.C., 1981. Modified atmosphere packaging systems for refrigerated fresh fish providing shelf life extension and safety from *Clostridium botulinum* toxigenesis. *In*: Proc. First Natl. Conf. Modified and Controlled Atmosphere Packaging of Seafood products. Ed Martin, R.E., National Fisheries Institute, Washington, D.C., 30 p.

LINDSAY, R.C., 1982. Sorbate and botulism safety aspects for modified atmosphere packaging. *In*: Proc. First Natl. Conf. Seafood Packaging shipping. Ed. Martin, R.E., National Fisheries Institute, Washington, D.C., 332 p.

LINDSAY, R.C.; JOSEPHSON, D.B.; OLAFSDOTTIR G., 1986. Chemical and biochemical indices for assessing the quality of fish packaged in controlled atmosphere. *In*: Proc. Int. Symp. Seafood Quality Determination. Eds Kramer, D.E. e Liston, J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 221 p.

LISTON, J., 1980. Microbiology in fishery science. *In*: Advances in Fish Science and Technology. Ed. Connell, J.J., Fishing News Books, Ltd., Surrey, England, 138 p.

MARTINS, R.; CASCALHO, A., 1990. Pescarias de Profundidade. 10ª semana das Pescas dos Açores, Relatório INIP:199-206.

MURRAY, J.; BURT, J.R., 1977. Composition of fish. *Torry Research Station Advisory Note*, HMSO, London.

OEHLENSCHLAGER, J.; SORENSEN, N.K., 1997. Criteria of seafish freshness and quality aspects. *In:* Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry. International Institute of Refrigeration, Paris, 137-139.

PASTORIZA, L; SAMPEDRO, G.; HERRERA, J.J.; CABO, M.L., 1996b. Effect of modified atmosphere packaging on shelf-life of iced fresh hake slices. *J. Sci. Food Agri.*, 71: 541-547

PEREIRA, T., 1997. Conservação do pescado através de atmosferas modificadas. Relatório de Estágio de Licenciatura em Química Tecnológica, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, 84 p.

REDDY, N.R.; SCHREIBER, C.L.; BUZARD, K.S.; SKINNER, G.E.; ARMSTRONG, D.J., 1994. Shelf life of fresh tilapia fillets packaged in high barrier film with modified atmospheres. *Journal of Food Science*, 59: 260-264

REDDY, N.R.; ROMAN, M.G.; VILLANUEVA, M.; SOLOMON, H.M.; KAUTTER, D.A.; RHODEHAMEL, E.J., 1997. Shelf life and *Clostridium botulinum* toxin development during storage of modified atmosphere-packaged fresh cafish fillets. *Journal of Food Science*, 62: 878-884.

SAINCLIVIER, M., 1983. Le poisson matière première. *In*: L'Industrie Alimentaire Halieutique. Bulletin Scientifique et Technique. Ecole Nationale Supèrieure Agronimique et Centre de Recherche de Rennes, Vol. I, 300 p.

SANCHES, J.G., 1991. Catálogo dos principais peixes marinhos da República da Guiné-Bissau. Publicações avulsas do Instituto de Investigação das Pescas, Lisboa, 16, 429 p

STAMMEN, K.; GERDES, D.; CAPORASO, F., 1990. Modified atmosphere packaging of seafood. *CRC Crit. Ver. Food Sci. and Nutr.*, 29: 301.

STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L; PAINTER, P.R., 1996. Microbiología. Editorial. Reverté SA, Barcelona, 750 p.

STANSBY, M. E., 1961. Proximate composition of fish. *In:* Fish in Nutrition. Eds. Eirik Heen and Rudolf Kreuser, Fishing News (Books) Ltd., 55-60.

STATHAM, J.A., 1984. Modified atmosphere storage of fisheries products: the state of the art. *Food Technol.*, 35: 233.

UNIÃO EUROPEIA,1993. Decisão da Comissão Nº 93/351/CEE de 19 de Maio que fixa os métodos de análise, os planos de colheita de amostras e os teores máximos de mercúrio para os produtos da pesca. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L144: 23-24.

ANEXOS

Anexo A — Composição química percentual de amostras de peixe-espada-preto sem pele preta.

Amostras	Humidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinza (%)
SP1	82,0	0,1	16,9	1,0
CP1	82,2	0,3	16,5	1,0
A1	81,6	0,3	16,8	1,0
P1	81,6	0,5	16,7	0,9
SP2	82,3	0,2	16,5	0,9
CP2	81,1	0,8	16,2	1,0
A2	82,6	0,2	16,0	0,9
SP3	83,3	0,1	15,2	1,0
CP3	83,3	0,1	15,2	1,0
A3	83,0	0,2	15,6	0,9
P3	83,6	0,6	14,7	0,9

SP - sem pele branca
CP - com pele branca
A - parte anterior à região anal
P - parte posterior à região anal
Número de peixes = 3 (1,2 e 3)

Anexo B — Composição mineral de várias amostras de peixe-espada-preto (mg/kg) com pele branca (CP) e sem pele branca (SP).

MINERAIS	SP1	CP1	SP2	CP2	SP3	CP3
Cu (n=3)	0,13±0,00	0,13±0,00	0,13±0,00	0,20±0,00	0,13±0,00	0,13±0,00
P* (n=2)	1,4±0,1	1,3±0,1	1,1±0,4	1,3±0,0	1,1±0,1	1,1±0,0
Zn (n=3)	3,5±0,0	5,2±0,3	2,5±0,0	3,3±0,3	2,0±0,0	3,0±0,0
Cd (n=4)	0,02±0,00	0,02±0,00	<0,01	0,01±0,00	<0,01	0,02±0,00
Cr (n=4)	0,5±0,1	0,4±0,0	0,5±0,0	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,0
Hg (n=2)	0,7±0,1	0,6±0,0	0,9±0,1	0,9±0,0	1,0±0,0	0,9±0,0
Ni (n=4)	0,02±0,01	0,02±0,00	<0,01	0,02±0,00	0,03±0,01	0,05±0,02
Pb (n=4)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

n=número de peixes analisados
*g/kg

Anexo C — Classificação dos principais aminoácidos que entram na composição das proteínas, segundo a composição da cadeia lateral (grupo R) e respectivas abreviaturas de acordo com a terminologia inglesa.

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA	AMINOÁCIDO	ABREVIATURA
Grupo	Alifático	Grupo	aromático
Glicina	GLY	Fenilalanina	PHE
Alanina	ALA	Triptofano	TRY
Valina	VAL	Grupo	heterocíclico
Isoleucina	ILE	Prolina (no colagéneo sob a forma de	PRO
Leucina	LEU	hidroxiprolina)	HYP
Grupo	Básico	Grupo dicarboxílico ou	com funções amidas
Histidina	HIS	Ácido aspártico	ASP
Lisina	LYS	Asparagina	ASN
Arginina	ARG	Ácido glutâmico	GLU
		Glutamina	GLN
Grupo	Sulfurado	Grupo álcool	ou fenol
Metionina	MET	Serina	SER
Cisteína	CYS	Treonina	THR
Cistina	CYS/SCY	Tirosina	TYR

Fonte: adaptado de Sainclivier (1983).

Anexo D — Razões comparativas dos teores em aminoácidos essenciais do peixe-espada-preto, *Aphanopus carbo* com a proteína do ovo (FAO,1970) e com o padrão de referência da FAO/WHO (1973).

Aminoácidos	Proteína do ovo (FAO,1970)[a] A	Padrão FAO/WHO (1973)[a] B	Peixe-espada -preto[a] C	Razão C/B x 100[b]	Razão C/A x 100[b]	$\log_{10}$ (C/A x 100)[b]
Treonina	5,1	4,0	4,7	117,5	92,1	1,96
Valina	6,8	5,0	5,8	116,0	85,2	1,93
Metionina + Cistina	5,8	3,5	7,8	222,8	134,5	2,13
Isoleucina	6,3	4,0	5,4	135,0	85,7	1,93
Leucina	8,8	7,0	9,7	138,6	110,2	2,04
Fenilalanina + Tirosina	9,9	6,1	8,1	132,8	81,8	1,91
Lisina	7,0	5,4	10,9	201,8	155,7	2,19
Triptofano	1,5	1,0	0,6	**60,0**	**40,0**	1,60
						$\Sigma / 8 = 1,96$
Parâmetros nutricionais				60,0 **Aminoácido Limitante**	40,0 **Aminoácido Limitante**	**91,2 Índice de[c] Aminoácidos Essenciais**

[a] g/100g de proteína
[b] calculado segundo Acton & Rudd (1987)
[c] anti-log $\Sigma/8$

Anexo E — Registo da temperatura da arca de refrigeração durante a armazenagem dos filetes de peixe-espada-preto em atmosfera modificada.

Dias	**Temperatura (°C)**			
	I	**II**	**III**	**IV**
0	3	2	2	1
1	2	2	2	2
2	2	2	2	1
3	2	2	2	2
4	1	1	1	1
5	2	3	3	2
7	2	2	2	2
8	3	2	2	2
9	2	2	2	2
10	2	2	2	2
11	2	1	1	2
13	3	2	2	4
14	3	2	2	3
15	2	1	0	2
16	2	1	1	2
17	3	0	1	3
M	**2**			
DP	**1**			

M - valor médio
DP - desvio padrão

Anexo F — Resultados da análise da composição centesimal da mistura gasosa nas embalagens dos filetes de peixe-espada-preto.

Dias	Embalagem	Medição de CO_2 (%)		Medição de O_2 (%)	
		ar	70/30	ar	70/30
0		1	70	21,4	30,5
		1	71	21,4	31,2
		1	70,5	21,3	30,5
			70,5		31,8
			71,5		31,2
			70,8		31,8
	M	**1**	**70,7**	**21,4**	**31,2**
	DP	**0**	**0,51**	**0,06**	**0,58**
3	I	1	18,5	19,6	31,3
	II	1	21	19,7	36,1
	III	1	22	19,2	35,8
	M	**1**	**20,5**	**19,5**	**34,4**
	DP	**0**	**1,8**	**0,3**	**2,7**
7	I	8,5	25	4,6	31,5
	II	7,5	26	5,2	34,3
	III	7,5	27	6,5	31,8
	M	**7,8**	**26,0**	**5,4**	**32,5**
	DP	**0,6**	**1,0**	**1,0**	**1,5**
10	I	11	25,5	1,1	25,7
	II	11	26,5	0,1	27,5
	III	11	29	0,8	25,8
	M	**11**	**27**	**0,7**	**26,3**
	DP	**0**	**1,8**	**0,5**	**1,0**
14	I		35,5		17
	II		37,5		13,4
	III		32,5		13,5
	M		**35,2**		**14,6**
	DP		**2,5**		**2,1**
17	I		42		4,5
	II		42		3,1
	III		42,5		1,7
	M		**42,2**		**3,1**
	DP		**0,3**		**1,4**

M-valor médio
DP-desvio padrão

Anexo G — Questionário para a apreciação do peixe-espada-preto cru

Código da amostra:

Data: Nome:

Nota: As apreciações devem ser feitas pela ordem indicada.

1. CHEIRO	0	1	2	3	4	5
• Característico a peixe fresco 0 - Ausente ⇒ 5 –Intenso						
• Amoniacal 0 - Ausente ⇒ 5 – Intenso						
• Sulfídrico 0 - Ausente ⇒ 5 – Intenso						
2. APARÊNCIA — COR	0	1	2	3	4	5
2.1						
• Branca 0 - Ausente ⇒ 5 – Intensa						
• Creme 0 - Ausente ⇒ 5 – Intensa						
3. TEXTURA	0	1	2	3	4	5
• Firmeza 0 - Mole ⇒ 5 – Firme						

Rejeita o produto ? SIM ☐ NÃO ☐

Anexo H — Questionário para a apreciação do peixe-espada-preto cozido

Código da amostra:

Data: Nome:

Nota: As apreciações devem ser feitas pela ordem indicada.

1. CHEIRO	0	1	2	3	4	5
• Amoniacal 0 - Ausente ⇒ 5 - Intenso						
• Sulfídrico 0 - Ausente ⇒ 5 - Intenso						
2. APARÊNCIA - COR	0	1	2	3	4	5
2.1.- SUPERFÍCIE EXTERNA DO FILETE						
• Branca 0 - Ausente ⇒ 5 - Intensa						
• Creme 0 - Ausente ⇒ 5 - Intensa						
2.2. PARTE INTERNA DO FILETE						
• Branca 0 - Ausente ⇒ 5 - Intensa						
• Creme 0 - Ausente ⇒ 5 - Intensa						

Anexo H (cont.)

3. TEXTURA	0	1	2	3	4	5
• Humidade 0 - Seco ⇒ 3 - Húmido ⇒ 5 – Suculento						
• Firmeza 0 - Mole ⇒ 5 – Firme						
4. SABOR	0	1	2	3	4	5
• Adocicado 0 - Ausente ⇒ 5 – Intenso						
• Salgado 0 - Ausente ⇒ 5 – Intenso						
• Amargo 0 - Ausente ⇒ 5 – Intenso						
• Ácido 0 - Ausente ⇒ 5 – Intenso						

Rejeita o produto? SIM ☐ NÃO ☐

Anexo I — Resultados da composição química aproximada dos filetes de peixe-espada-preto armazenados em ar e atmosfera modificada (70%CO_2/30%O_2).

Dias	Embalagem	Humidade (%)		Gordura (%)		Proteína (%)		Cinza (%)		Cloretos (NaCl%)	
		ar	70/30	ar	70/30	ar	70/30	ar	70/30	ar	70/30
0	I	82,8	—	0,8	—	14,6	—	1,8	—	1,50	—
	II	82,2		0,5		15,2		1,8		1,43	
	III	81,7		1,3		14,8		1,9		1,53	
	M	**82,2**		**0,9**		**14,9**		**1,8**		**1,5**	
	DP	**0,6**		**0,4**		**0,3**		**0,1**		**0,1**	
10	I	83,4	—	—	—	15,6	—	1,9	—	1,52	—
	II	82,8				15,6		1,9		1,72	
	III	84,1				14,2		1,9		1,48	
	M	**83,4**				**15,1**		**1,9**		**1,6**	
	DP	**0,7**				**0,8**		**0,0**		**0,1**	
17	I	—	82,8	—	—	—	14,8	—	1,9	—	1,57
	II		82,8				14,5		2,0		1,54
	III		82,0				15,1		1,9		1,50
	M		**82,5**				**14,8**		**1,9**		**1,5**
	DP		**0,5**				**0,3**		**0,1**		**0,04**

M - valor médio
DP - desvio padrão

Anexo J — Resultados do ABVT, do ATMA e do OTMA dos filetes de peixe-espada-preto em embalagens em ar e atmosfera modificada (70%CO_2/30%O_2).

Dias	Embalagem	ABVT (mgN/100g)		TMA (mgN/100g)		OTMA (mgN/100g)	
		ar	70/30	ar	70/30	ar	70/30
0	I	9,7	—	0	—	59,2	—
	II	8,8		0		64,3	
	III	9,6		0		69,9	
	M	**9,2**		**0,0**		**67,1**	
	DP	**0,5**		**0,0**		**5,3**	
3	I	—	—	—	—	—	—
	II	9,7	12,2	3,4	1,9	57,5	63,8
	III	—	—	—	—	—	—
	M						
	DP						
7	I	—	13,2	—	2,0	—	51,8
	II	34,1	12,1	21,4	4,9	44,3	65,5
	III	—	12,1	—	1,9	—	57,1
	M		**12,5**		**2,9**		**58,1**
	DP		**0,6**		**1,7**		**6,9**
10	I	46,4	—	39,1	—	10,8	—
	II	56,0	—	39,0	—	19,5	—
	III	61,1	17,0	51,3	4,9	0,0	65,5
	M	**54,5**		**43,1**		**10,08**	
	DP	**7,4**		**7,1**		**9,76**	
14	I	—	12,2	—	8,8	—	55,7
	II		20,4		4,9		68,0
	III		14,6		6,8		61,4
	M		**15,7**		**6,8**		**61,7**
	DP		**4,2**		**2,0**		**6,1**
17	I	—	26,8	—	27,8	—	42,9
	II		31,7		19,5		51,1
	III		24,4		20,5		53,6
	M		**27,6**		**22,6**		**49,2**
	DP		**3,7**		**4,5**		**5,6**

M-valor médio; DP-desvio padrão

Anexo K — Resultados da medição do pH nos filetes de peixe-espada-preto armazenados em embalagens em ar e em atmosfera modificada (70%CO_2/30%O_2).

Dias	Embalagem	pH	
		ar	70/30
0	I	6,43	—
	II	6,57	
	II	6,74	
	M	**6,58**	
	DP	**0,16**	
3	I	6,75	6,29
	II	6,35	6,52
	III	6,83	6,45
	M	**6,64**	**6,42**
	DP	**0,26**	**0,12**
7	I	6,6	6,46
	II	6,8	6,6
	III	6,92	6,34
	M	**6,77**	**6,47**
	DP	**0,16**	**0,13**
10	I	7,05	6,46
	II	6,93	6,29
	III	6,99	6,46
	M	**6,99**	**6,40**
	DP	**0,06**	**0,10**
14	I	—	6,31
	II		6,38
	III		6,1
	M		**6,26**
	DP		**0,15**
17	I	—	6,49
	II		6,32
	III		6,38
	M		**6,40**
	DP		**0,09**

M - valor médio
DP - desvio padrão

Anexo L — Descrição de alguns meios de cultura utilizados.

Iron Agar-Lyngby (Gram *et al.*, 1987):

Peptona bacteriológica (Oxoid) (20,0g); pó de labLemco (Difco) (3,0g); extracto de leveduras (Difco) (3,0g); citrato férrico (Sigma) (0,3g); tiossulfato de sódio (0,3g); cloreto de sódio (5,0g); agar (12,0g); L-cysteína (Sigma) (0,6g); água destilada (1litro).

A mistura dos componentes ferveu-se até completa dissolução, seguida de esterilização a 121°C durante 15 minutos em autoclave. A L-cysteína foi adicionada ao meio arrefecido a 50°C, após esterilização por filtração.

O pH = 7.4 ± 2 foi ajustado com NaOH esterilizado por filtração.

Iron Agar - OTMA (Gram *et al.*, 1987):

Peptona bacteriológica (Oxoid) (20.0g); pó de LabLemco (Difco) (3g); extracto de leveduras (Difco) (3g); Citrato férrico (Sigma) (0.3g); tiossulfato de sódio (0.3g); cloreto de sódio (4g); $KH_2 PO_4$ (4g); K_2HPO_4 (5.75g); $MgSO_4$ (0.5g); resazurin (BDH Chemicals) (2 comprimidos). O pH ajustou-se a 6.8 e esterilizou - se o meio a 121° C durante 15 minutos. Adicionou-se ainda L-cysteína (Sigma) (0.4g) esterilizada por filtração, ao meio previamente arrefecido a 5°°C imediatamente antes de ser usado, fervendo-se de seguida para expelir qualquer oxigénio. Adicionou-se OTMA, $2H_2O$ (Sigma). Seguiu-se a distribuição do meio por tubos.

Anexo M — Sementeira dos inóculos para desenvolvimento dos microrganismos das amostras de filetes de peixe-espada-preto.

Sementeira por superfície

Procedeu-se de igual modo em relação às transferências das diluições. No entanto, há diferenças em relação à adição do meio, o qual foi previamente distribuído pelas caixas de petri, de modo a solidificar e secar antes da distribuição do inóculo. Este foi então espalhado pela superfície do meio de cultura das respectivas caixas de petri, ou seja, $1cm^3$ de inóculo foi distribuído por quatro caixas utilizando-se um espalhador esterilizado.

Anexo N — Resultados das contagens totais de microrganismos viáveis (log ufc/g) em diferentes meios de cultura

Iron Agar

Dias	Aerobiose				Anaerobiose			
	Controlo		Atmosfera Modificada		Controlo		Atmosfera modificada	
	5°C	**22°C**	**5°C**	**22°C**	**5°C**	**22°C**	**5°C**	**22°C**
0	5,3	5,9	5,3	5,9	5,1	5,8	5,1	5,8
3	6,9	6,8	6,5	6,8	5,5	6,1	5,5	6,6
10	8,3	7,6	7,0	6,9	6,3	6,7	6,7	6,8
20	-		7,9	7,7	-		7,8	7,7

MRS

Dias	Aerobiose				Anaerobiose			
	Controlo		Atmosfera Modificada		Controlo		Atmosfera modificada	
	5°C	**22°C**	**5°C**	**22°C**	**5°C**	**22°C**	**5°C**	**22°C**
0	5,3	5,9	5,3	5,9	5,1	5,8	5,1	5,8
3	6,9	6,8	6,5.	6,8	5,5	6,1	5,5	6,6
10	8,3	7,6	7,0.	6,9	6,3	6,7	6,7	6,8
20	-		7,9	7,7	-		7,8	7,7

Pseudomonas CFC

Dias	Aerobiose			
	Controlo		Atmosfera modificada	
	5°C	22°C	5°C	22°C
0	5,3	5,9	5,3	5,9
3	6,9	6,8	6,5	6,8
10	8,3	7,6	7,0	6,9
20	-	-	7,9	7,7

Anexo O — Descrição de alguns testes bioquímicos de identificação microbiológica

Catalase

Adicionar uma gota de água oxigenada a 10% a tubos pequenos de vidro contendo algumas ansas retiradas de colónias frescas (com 18 horas de incubação) das estirpes a identificar. Verificar se há libertação imediata de oxigénio, o que indica a actividade da catalase.

A catalase actua sobre a água oxigenada, libertando oxigénio e água:

$$2H_2O \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Citocromo oxidase

Semear as estirpes em tubos com meio de cultura adequado e incubar a 35°C durante 18-24 horas. Adicionar 5 gotas de uma solução de tetrametil-p-fenilenodiamina a 1%.Deixar repousar e ler o resultado da actividade da citocromo oxidase após 2 minutos. A reacção positiva é o aparecimento de cor violeta.A reacção negativa é sem alteração de cor. Convém efectuar um controlo negativo adicionando o reagente a um meio de cultura não inoculado.

Mini galerias-Sistema API

Inocular as culturas das estirpes em estudo de acordo com as instruções indicadas na embalagem. Incubar a 35°C durante 24 horas. Observar as mini-galerias e registar os resultados. Identificar as estirpes utilizadas. Com o sistema API os resultados são obtidos, geralmente, em 24 horas e são representados por um número de perfil com 7 dígitos.