

# PUBLICAÇÕES AVULSAS DO IPIMAR

N.º 9, 2002

## PRODUTOS DA PESCA Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica JORNADAS TÉCNICAS E CIENTÍFICAS DO IPIMAR

11 - 12 de Outubro de 2001

### ACTAS



INSTITUTO  
DE  
INVESTIGAÇÃO  
DAS PESCAS  
E DO MAR

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar



As **PUBLICAÇÕES AVULSAS DO IPIMAR** destinam-se à divulgação de trabalhos originais e de síntese que, pela sua natureza, se não enquadram nas outras séries do IPIMAR e ainda à reedição e tradução de obras de reconhecido interesse para as ciências aquáticas e as pescas.

Esta colecção substitui as anteriores "Publicações avulsas" do INIP.

### **Edição**

INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO DAS PESCAS E DO MAR - IPIMAR  
Avenida de Brasília  
1449-006 LISBOA  
Portugal

### **Corpo Editorial**

Francisco Ruano - Coordenador  
Fátima Cardador  
Irineu Batista  
Manuela Falcão  
Teresa Monteiro  
Vitor Henriques

As instruções para os autores estão disponíveis no "site" do IPIMAR  
[www.ipimar.pt](http://www.ipimar.pt)  
ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação.

### **Permuta e Vendas**

IPIMAR/ Divisão de Documentação e Apoio ao Utente

Todos os direitos reservados.  
Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida sem autorização  
escrita do editor

**INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO DAS PESCAS E DO MAR**

---

**PUBLICAÇÕES AVULSAS DO IPIMAR**

**N.º 9**

**PRODUTOS DA PESCA**

**Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica**

**JORNADAS TÉCNICAS E CIENTÍFICAS DO IPIMAR**

**11 - 12 de Outubro de 2001**

**ACTAS**

**Título:** Produtos da Pesca. Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica. Actas das Jornadas Técnicas e Científicas do IPIMAR

**Editor:** Instituto de Investigação das Pescas e do Mar - IPIMAR

**Composição e Impressão:** IPIMAR/DDCT

**Depósito Legal:** 204540 / 03

**Tiragem:** 250 exemplares

**Referência Bibliográfica:**

IPIMAR, 2002 - Produtos da Pesca. Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica, Actas das Jornadas Técnicas e Científicas do IPIMAR. **Publicações avulsas do IPIMAR**, 9, 314p.

Esta publicação reúne os trabalhos apresentados nas Jornadas Técnicas e Científicas do IPIMAR - Produtos da Pesca. Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica, sob a forma de comunicações orais e painéis, bem como as apresentações feitas nas mesas redondas.

A aceitação das comunicações foi feita com base nos resumos previamente apresentados; o texto integral que aqui se apresenta é da responsabilidade dos respectivos autores.

## NOTA DE ABERTURA

O consumo *per capita* de produtos da pesca em Portugal é o mais elevado na União Europeia, verificando-se, igualmente, que a cadeia de distribuição se tem tornado cada vez mais complexa. Tal facto implica que a qualidade e segurança destes produtos deve constituir uma preocupação tanto para produtores como para consumidores, passando pelas autoridades públicas. A inovação tecnológica constitui outra vertente fundamental para o desenvolvimento de novas metodologias de conservação e processamento e também para o lançamento de novos produtos que melhor satisfaçam as solicitações actuais do mercado.

Com esta reunião pretende-se dar a conhecer as mais recentes inovações introduzidas na fileira da pesca desde a conservação e manuseamento até à qualidade e segurança destes produtos junto do consumidor e divulgar as actividades e resultados obtidos no IPIMAR.

Apoio de:



GRUPO TIMAR





# Índice

## Comunicações

|  |     |
|--|-----|
| <b>I. Batista, M. L. Nunes, A. Martins, N. Delgado e A. Mendes</b><br>Qualidade do pescado fresco descarregado em lota.....  | 11  |
| <b>P. A. Gibbs</b><br>Evaluation of microbiological risks in fish products.....  | 23  |
| <b>A. Gonçalves, R. Mendes e M. L. Nunes</b><br>Aplicação de atmosferas modificadas e gelo líquido na conservação do pescado.....  | 33  |
| <b>S. Pedro, M. J. Rodrigues, M. L. Nunes, M. M. Albuquerque e I. Batista</b><br>Bacalhau: qualidade e inovação tecnológica.....   | 49  |
| <b>M. L. Nunes e I. Batista</b><br>Aproveitamento de desperdícios e aplicação de tecnologias limpas no sector da pesca.....  | 59  |
| <b>N. M. Bandarra, I. Batista, J. Tafula e M. L. Nunes</b><br>Valor nutricional de produtos da pesca.....  | 75  |
| <b>M. F. Martins, H. M. Lourenço, M. M. Albuquerque e M. L. Nunes</b><br>Qualidade e segurança dos produtos da pesca.....  | 89  |
| <b>R. Cachola</b><br>Salubridade de moluscos bivalves: aspectos microbiológicos.....   | 99  |
| <b>S. M. Rodrigues, M. J. Botelho, P. R. Costa, P. Vale e M. A. de M. Sampayo</b><br>Salubridade de moluscos bivalves: ocorrência de biotoxinas.....   | 105 |
| <b>R. Mendes</b><br>Autenticidade de produtos da pesca.....  | 119 |
| <b>P. Vaz-Pires</b><br>Rotulagem e rastreabilidade de produtos da pesca.....   | 129 |
| <b>M. Abreu Dias</b><br>Legislação e normalização no sector da pesca.....  | 137 |
| <b>Painéis</b>   |     |
| <b>P01 - M. E. López, H. Silva, S. Vicente, and M. L. Nunes</b><br>Effect of temperature on modified atmosphere packed sardine mince.....  | 147 |
| <b>P04 - R. A. Rosa e M. L. Nunes</b><br>Composição bioquímica e biologia do lagostim <i>Nephrops norvegicus</i> (crustacea: decapoda) da costa sul portuguesa.....  | 151 |
| <b>P05 - A. T. Ribeiro, N. M. Bandarra, R. Mendes e M. L. Nunes</b><br>Influência da adição de polpa de sardinha e de óleo de fígado de bacalhau no perfil de ácidos gordos de salsichas tipo <i>frankfurt</i> ..... | 159 |
| <b>P06 - R. Quinta, L. Gomes, R. Duarte, C. Rosa, M. Sebastião e A. T. Santos</b><br>Diferenciação de espécies de tamboril em produtos transformados da pesca, através da técnica de SSCP.....                       | 165 |
| <b>P07 - M. A. de M. Sampayo, S. Rodrigues, M. J. Botelho, and P. Vale</b><br>Two confirmed cases of human intoxication by marine biotoxins in Portugal.....   | 169 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>P08 - P. Vale, M. A. M. de Sampayo, S. Rodrigues, M. J. Botelho, and P. R. Costa</b><br>Better consumer protection from DSP toxins.....   | 175 |
| <b>P09 - M. J. Botelho, S. M. Rodrigues, P. R. Costa e M. A. M. de Sampayo</b><br>Introdução do ensaio de inibição da proteína fosfatase 2a na detecção de toxinas<br>diarreicas em moluscos bivalves.....   | 181 |
| <b>P10 - P. Vale e M. A. de M. Sampayo</b><br>Outro vector para a transferência de ácido domóico na cadeia alimentar marinha: a<br>sardinha.....   | 185 |
| <b>P11 - S. Santiago, H. M. Lourenço, M. L. Nunes, M. L. Carvalho e C. Sousa Reis</b><br>Caracterização mineral de alguns produtos da pesca consumidos em Portugal.....  | 191 |
| <b>P12 - A. S. Barreto, K. Massei, M. C. Ferreira, M. J. Fraqueza, M. J. Fernandes e<br/>J. Ouakinin</b><br>Determinação da composição química de algumas espécies de produtos da pesca para<br>estabelecimento de uma dieta apropriada para animais marinhos..... | 197 |
| <b>P13 - L. Pedroso, F. Telles, A. Louçã e M. Chagas</b><br>Avaliação do perfil microbiológico em várias fases do processamento de sardinha<br>ultracongelada.....   | 201 |
| <b>P14 - M. G. Dias, M.V Sánchez, H. Romba e L. Oliveira</b><br>Teor vitamínico de pescado consumido em Portugal.....  | 207 |
| <b>P15 - M. V. Sánchez, M. G. Dias, H. Romba e L. Oliveira</b><br>Validação dos métodos de doseamento das vitaminas B1, B2, B6 e folatos.....  | 213 |
| <b>P16 - M. F. Pereira, T. Semedo, R. Tenreiro e F. M. Bernardo</b><br>Diversidade e ocorrência natural de <i>Vibrio</i> spp. isolado de alimentos marinhos<br>portugueses.....  | 219 |
| <b>P17 - L. Gomes, R. Quinta, C. Rosa, A. T. Santos, G.L. Hold, S.E. Pryde, H.<br/>Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Mendez, C. G. Sotelo e R. I. Pérez-Martin</b><br>Identificação de várias espécies de peixe, utilizando a técnica de RFLP.....                     | 229 |
| <b>P18 - H. M. Lourenço, N. M. Bandarra, N. Delgado, M. F. Martins e M. L. Nunes</b><br>Caracterização nutricional de espécies de aquicultura.....   | 233 |
| <b>P19 - H. M. Lourenço, M. F. Martins, A. R. Lino e M. L. Nunes</b><br>Níveis de mercúrio total em espécies de aquicultura.....   | 239 |
| <b>P 20 - C. Cardoso, I. Batista, N. M. Bandarra e M. L. Nunes</b><br>Preparação de concentrados de ácidos gordos polinsaturados por via enzimática.....   | 243 |
| <b>P21 - M. J. Rodrigues, P. Ho, M. Albuquerque, P. Vaz Pires e M. L. Nunes</b><br>Bactérias produtoras de H <sub>2</sub> S e de amins biogénicas em bacalhau.....   | 249 |
| <b>P 22 - M. J. Rodrigues, P. Ho, M. Albuquerque, P. Vaz Pires e M. L. Nunes</b><br>Caracterização bacteriana dos produtos de bacalhau.....  | 253 |
| <b>P 23 - R. Mendes e A. Huidobro</b><br>Nucleotides degradation on crustaceans chilled with liquid ice.....   | 259 |
| <b>P 24 - C. Afonso, H. M. Lourenço, M. L. Nunes, Abreu Dias e M. Castro</b><br>Determinação dos níveis de mercúrio total, orgânico e inorgânico em peixe-espada-preto<br>( <i>Aphanopus carbo</i> ) capturado ao largo da ilha da Madeira.....                    | 263 |
| <b>P 25 - S. Pedro, C. Pestana, N. Magalhães, I. Batista, M. M. Albuquerque e M.<br/>L. Nunes</b><br>Conservação de bacalhau demolhado refrigerado embalado a vácuo.....   | 269 |
| <b>P 26 - H. A. Silva, M. L. Silva, A. M. Ferreira, N. Magalhães e M. M. Albuquerque</b><br>Avaliação de uma metodologia para a detecção de <i>Salmonella</i> em moluscos bivalves de<br>águas muito contaminadas.....   | 275 |

## Mesas redondas

|   |     |
|---|-----|
| <b>Marcelo de Vasconcelos</b> (Presidente do IPIMAR)<br>Perspectivas futuras. 1º Encontro de Ciência e Tecnologia do IPIMAR.....  | 281 |
| <b>João Vieira</b> (Pascoal & Filhos)<br>Bacalhau salgado seco, evolução de um produto tradicional face às exigências do<br>consumidor do séc. XXI.....                       | 285 |
| <b>Humberto Carrapato</b> (Doca pesca, portos e lotas, S. A., Direcção de exploração)<br>Investir na qualidade.....   | 289 |
| <b>Manuel Tarré</b> (Associação da Indústria Alimentar pelo Frio, ALIF)<br>Preparação e transformação de pescado congelado: evolução recente e perspectivas de<br>futuro..... | 295 |
| <b>António Oliveira</b> (Grupo Miradouro)<br>Futuro da indústria da pesca.....  | 299 |
| <b>Castro e Melo</b> (Associação Nacional dos Industriais de Conservas de Peixe, ANICP)<br>Perspectivas futuras do sector das conservas de peixe.....                         | 303 |
| <b>Nuno Lima Dias</b> (DECO, PROTESTE)<br>Qualidade do pescado na venda ao consumidor.....  | 305 |
| <b>Carlos Henriques</b> (PESCANOVA)<br>A PESCANOVA: situação actual e perspectivas.....   | 313 |



## **COMUNICAÇÕES**



# QUALIDADE DO PESCADO FRESCO DESCARREGADO EM LOTA

Irineu Batista, Maria Leonor Nunes, Andreia Martins, Nilza Delgado e Angelina Mendes

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar  
Avenida de Brasília, 1449-006 LISBOA

---

## RESUMO

A rápida deterioração do pescado associada à sua fragilidade levam a que apresente uma qualidade variável aquando da descarga. Esta variabilidade depende de diversos factores, alguns dos quais ligados à própria espécie, como seja a condição fisiológica, e outros decorrentes da arte usada na captura e outras decorrentes da conservação a bordo. As dificuldades relacionadas com estes factores são difíceis de ultrapassar, mas as que resultam do manuseamento e conservação a bordo podem ser minoradas através de sistemas e práticas adequados que incluem a mecanização de algumas operações a bordo e o uso sistemático de gelo.

Neste sentido, foi objectivo deste trabalho caracterizar a qualidade do pescado descarregado em lota em termos de grau de frescura e da presença de alguns contaminantes. Os resultados obtidos permitem concluir que a maior parte do pescado descarregado apresenta grau de frescura E ou A, com rejeições diminutas. Os resultados dos índices químicos sugerem que são menos interessantes como índices de frescura, mas podem constituir indicadores de rejeição, propondo-se mesmo alguns valores limite para o azoto básico total para algumas espécies não incluídas na Decisão Europeia 95/149/CE (1995). No que respeita aos contaminantes, é de salientar que os níveis de cádmio e chumbo encontrados foram sempre inferiores aos limites máximos estabelecidos para estes contaminantes e, por seu lado, o teor em mercúrio foi em algumas espécies superior ao previsto legalmente.

## INTRODUÇÃO

A especificidade da constituição química do pescado e o seu habitat natural levam a que se deteriore mais rapidamente do que outros alimentos. Esta rápida deterioração, aliada ao efeito dos diferentes tipos de artes utilizadas na captura, exigem o recurso a um conjunto de práticas de manuseamento e conservação apropriadas quer a bordo quer após o desembarque.

As alterações do pescado que ocorrem após a morte podem, com facilidade, ser apreciadas sensorialmente uma vez que vão evoluindo, mais ou menos rapidamente, durante a conservação em refrigerado, seguindo um determinado padrão de deterioração que, por sua vez, é característico de cada espécie. Estas alterações do pescado podem ser também avaliadas por métodos físicos químicos e microbiológicos. De entre os métodos químicos destacam-se o doseamento do Azoto Básico Volátil Total (ABVT) e do Azoto de Trimetilamina (ATMA) e a determinação do índice K. Destes, apenas para o ABVT foram fixados limites para três conjuntos de espécies (*Sebastes* sp.; Família PLEURONECTIDAE com excepção do *Hippoglossus* sp.; *Salmo salar* e espécies das famílias MERLUCCIIDAE e GADIDAE) (Decisão 95/149/CE, 1995).

As contagens microbianas totais têm sido utilizadas como indicadores de qualidade do pescado fresco. Porém, não tem sido possível estabelecer boas correlações com o grau de frescura uma vez que apenas uma fracção da flora microbiana está relacionada com as alterações que ocorrem no pescado.

Para a qualidade do pescado concorrem também outros aspectos para além do grau de frescura que estão relacionados com a presença de contaminantes provenientes do ambiente, em particular, mercúrio, cádmio e chumbo.

Assim, no sentido de contribuir para a caracterização da qualidade do pescado comercializado em lota, procedeu-se a um estudo pormenorizado do grau de frescura de muitas espécies por avaliação sensorial e determinação do ABVT, ATMA e índice K. Em paralelo, efectuaram-se análises microbiológicas e o doseamento de mercúrio, cádmio e chumbo em algumas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

As espécies analisadas foram recolhidas nas várias lotas do País e encontram-se referidas no Quadro 1.

### Métodos

Na análise sensorial seguiu-se o Regulamento CE 2406/96 (1996).

O teor em Azoto Básico Volátil Total (ABVT) foi determinado de acordo com o método de referência indicado na Decisão 95/149/CEE (1995). O teor em Azoto de Trimetilamina (ATMA) foi determinado pelo método descrito por Cobb *et al.* (1973). Na determinação do índice K seguiu-se o método descrito por Ryder (1985).

As contagens totais de mesófilos foram determinadas de acordo com a NP 3278 (1986).

O teor de mercúrio foi determinado de acordo com a NP-2928 (IPQ, 1988) e os teores de chumbo e cádmio por espectrofotometria de absorção atómica de chama, segundo os métodos descritos no AOAC (1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A larga maioria do pescado comercializado em lota (primeira venda) é classificada, com base na tabela da UE, como tendo um grau de frescura E ou A e algum peixe é classificado como B por se encontrar inferiorizado em termos de frescura ou por se apresentar traumatizado em consequência de manuseamento incorrecto. O pescado proveniente do cerco costeiro apresenta, de um modo geral, um grau de frescura E ou A. Por outro lado, na pesca local observa-se uma variedade de situações resultantes da diversidade de artes usadas neste segmento da frota. Assim, o pescado capturado pelas armadilhas chega a bordo praticamente vivo pelo que, dada a proximidade da costa, o grau de frescura é, em regra, extra. As capturas do palangre, redes de emalhar de um pano e tresmalho podem apresentar maior variação no seu grau de frescura, porém a maior parte do pescado capturado é classificada como E ou A. Também o pescado da frota polivalente costeira apresenta graus de frescura A e B, enquanto que o do arrasto costeiro é classificado entre A e B.

As rejeições referidas nas estatísticas (DGPA, 2000) dizem apenas respeito aos desembarques na Doca Pesca de Lisboa, onde é descarregada a maioria do peixe proveniente do norte de África e em 2000 atingiram cerca de 20 toneladas.

### Azoto Básico Volátil Total

Os resultados obtidos em 54 das espécies estudadas mostraram a grande variabilidade dos valores deste índice para um mesmo grau de frescura e que, em muitos casos, exemplares com diferentes graus de frescura apresentam gamas de variação iguais. Este último facto mostra que este índice não permite distinguir exemplares com diferentes graus de frescura.

Quadro 1 - Nome comum e científico das espécies estudadas.

| Nome Comum                  | Nome Científico                  | Nome Comum             | Nome Científico                   |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Abrótea (22)                | <i>Phycis phycis</i>             | Papagaio (1)           | <i>Thalassoma lunare</i>          |
| Amêijoia-boia (22)          | <i>Ruditapes decussatus</i>      | Pargo (11)             | <i>Pagrus pagrus</i>              |
| Amêijoia branca             | <i>Spisula solida</i>            | Pargo-mulato (19)      | <i>Plectorhynchumediterraneus</i> |
| Anequim (2)                 | <i>Isurus oxyrinchus</i>         | Pargo-ruço (3)         | <i>Pagrus caeruleostictus</i>     |
| Atum (8)                    | <i>Thunnus thynnus</i>           | Pargo-sêmola (2)       | <i>Pagrus auriga</i>              |
| Azevia (2)                  | <i>Microchirus azevia</i>        | Peixe-espada (11)      | <i>Lepidopus caudatus</i>         |
| Besugo (30)                 | <i>Pagellus acarne</i>           | Peixe-esp.-preto (31)  | <i>Aphanopus carbo</i>            |
| Bica (4)                    | <i>Pagellus erythrinus</i>       | Peixe-galo (14)        | <i>Zeus faber</i>                 |
| Cabra-lira (1)              | <i>Trigla lyra</i>               | Pescada (34)           | <i>Merluccius merluccius</i>      |
| Cação (10)                  | <i>Mustelus mustelus</i>         | Polvo (26)             | <i>Octopus vulgaris</i>           |
| Cachucho (13)               | <i>Dentex macrophthalmus</i>     | Polvo-cabeçudo (2)     | <i>Eledone cirrosa</i>            |
| Cantaril (11)               | <i>Helicolenus dactylopterus</i> | Pota-costeira (6)      | <i>Todaropsis eblanae</i>         |
| Cantarilho (4)              | <i>Sebastes</i> sp               | Pota-voadora (4)       | <i>Illex coindetii</i>            |
| Carapau/Chicharro (33)      | <i>Trachurus trachurus</i>       | Pregado (3)            | <i>Scophthalmus maximus</i>       |
| Carta-de-olhos-grandes (13) | <i>Bothus podas</i>              | Raias (12)             | <i>Raja</i> spp                   |
| Cavala (3)                  | <i>Scomber japonicuss</i>        | Rascasso-de-pintas (1) | <i>Scorpaena porcus</i>           |
| Cherne (6)                  | <i>Polyprion americanus</i>      | Robalo (14)            | <i>Dicentrarchus labrax</i>       |
| Chicharro-moiro (1)         | <i>Trachinotus ovatus</i>        | Roncador (1)           | <i>Umbrina cirrosa</i>            |
| Choco (10)                  | <i>Sepia officinalis</i>         | Ruivo (1)              | <i>Lepidotrigla cavillone</i>     |
| Chopo (1)                   | <i>Rossia macrosoma</i>          | Safio (12)             | <i>Conger conger</i>              |

Entre parêntesis indica-se o número de exemplares analisados.

Quadro 1 – (Continuação).

|                       |                                 |                 |   |
|-----------------------|---------------------------------|-----------------|---|
| Choupa (2)            | <i>Spondyliosoma cantharus</i>  | Salema (5)      | <i>Sarpa salpa</i>                        |
| Corvina (16)          | <i>Argyrosomus regius</i>       | Salmão (7)      | <i>Salmo salar</i>                        |
| Dentão bandeira (1)   | <i>Dentex gibbosus</i>          | Salmonete (13)  | <i>Mullus surmuletus</i>                  |
| Doirado (1)           | <i>Coryphaena hippurus</i>      | Salongo (1)     | <i>Beryx splendens</i>                    |
| Dourada (13)          | <i>Sparus aurata</i>            | Sarda (6)       | <i>Scomber scombrus</i>                   |
| Espadarte (14)        | <i>Xiphias gladius</i>          | Sardinha (20)   | <i>Sardina pilchardus</i>                 |
| Faneca (21)           | <i>Trisopterus luscus</i>       | Sargo (20)      | <i>Diplodus sargus</i>                    |
| Ferreira (1)          | <i>Lithognathus mormyrus</i>    | Sargo-safia (1) | <i>Diplodus vulgaris</i>                  |
| Gamba-branca (5)      | <i>Parapenaeus longirostris</i> | Sargo-veado (1) | <i>Diplodus cervinus</i>                  |
| Garoupa (8)           | <i>Epinephelus aeneus</i>       | Sarrajão (1)    | <i>Sarda sarda</i>                        |
| Goraz (9)             | <i>Pagellus bogaraveo</i>       | Savelha (1)     | <i>Alosa fallax</i>                       |
| Judeu-liso (1)        | <i>Auxis thazard</i>            | Solha (15)      | <i>Pleuronectes platessa</i>              |
| Leitão (1)            | <i>Galeus melastomus</i>        | Tamboril (11)   | <i>Lophius piscatorius</i>                |
| Linguado (14)         | <i>Solea vulgaris</i>           | Tintureira (7)  | <i>Prionace glauca</i>                    |
| Linguado-da-areia (1) | <i>Solea lascaris</i>           | Truta (10)      | <i>Oncorhynchus mykiss</i>                |
| Lula (20)             | <i>Loligo vulgaris</i>          | Veleiro (2)     | <i>Istiophorus platypterus</i>            |
| Mero (1)              | <i>Epinephelus alexandrinus</i> | Verdinho (1)    | <i>Micromesistius</i><br><i>poutassou</i> |
| Moreia (7)            | <i>Muraena helena</i>           | Zorro (1)       | <i>Alopias vulpinus</i>                   |

Entre parêntesis indica-se o número de exemplares analisados.

O conjunto de resultados obtidos vem realçar que este índice químico é apenas indicativo, não fornecendo, por si só, informação suficiente sobre o grau de frescura. Com base nos resultados obtidos apresenta-se no Quadro 2 uma proposta de valores limite para algumas espécies não consideradas na Decisão 95/149/CEE (1995).

### Azoto de Trimetilamina

O ATMA presente nos produtos da pesca é quase todo resultante da redução bacteriana do óxido de trimetilamina. Tal como para o ABVT, também os valores deste índice apresentavam sobreposições e uma grande gama de variação para um mesmo grau de frescura, isto é, os valores de ATMA medidos em exemplares classificados com diferentes graus de frescura eram os mesmos. Na figura 1 apresenta-se a gama de variação dos valores de ATMA dos exemplares não rejeitados e agrupados por famílias.

Quadro 2 – Proposta de valores limite para o teor em ABVT.

| Espécies   | Valor limite<br>(mg/ 100g) |
|--|----------------------------|
| <b>Peixes</b>                                    |                            |
| Azevia ( <i>Microchirus azevia</i> )             | 30                         |
| Besugo ( <i>Pagellus acarne</i> )                | 30                         |
| Carapau ( <i>Trachurus trachurus</i> )           | 25                         |
| Carta ( <i>Bothus podas</i> )                    | 30                         |
| Cavala ( <i>Scomber japonicus</i> )              | 25                         |
| Dourada ( <i>Sparus aurata</i> )                 | 30                         |
| Goraz ( <i>Pagellus bogaraveo</i> )              | 30                         |
| Pargo ( <i>Pagrus pagrus</i> )                   | 30                         |
| Peixe-espada ( <i>Lepidopus caudatus</i> )       | 35                         |
| Peixe-espada-preto ( <i>Aphanopus carbo</i> )    | 25                         |
| Sarda ( <i>Scomber scombrus</i> )                | 25                         |
| Sardinha ( <i>Sardina pilchardus</i> )           | 25                         |
| <b>Cefalópodes</b>                               |                            |
| Choco ( <i>Sepia officinalis</i> )               | 35                         |
| Lula ( <i>Loligo vulgaris</i> )                  | 35                         |
| Polvo ( <i>Octopus vulgaris</i> )                | 35                         |
| Pota ( <i>Illex coindetti</i> )                  | 35                         |
| <b>Crustáceos</b>                                |                            |
| Gamba-branca ( <i>Parapenaeus longirostris</i> ) | 35                         |
| <b>Bivalves</b>                                  |                            |
| Amêijoia-boa ( <i>Ruditapes decussatus</i> )     | 35                         |
| Amêijoia-branca ( <i>Spisula solida</i> )        | 35                         |

A análise detalhada dos resultados obtidos sugere que, para todas as espécies analisadas, se pode considerar que o limite de aceitabilidade é inferior a 8 mg de azoto/100g, valor este próximo da gama de valores máximos (10 a 15 mg de azoto/100g) referida por Connell (1975) para um conjunto de espécies capturadas no norte da Europa.

### Índice K

O índice K, definido como a razão entre a soma das concentrações de inosina e hipoxantina e a soma das concentrações de ATP e seus produtos de degradação, tem sido sugerido como um índice do grau de frescura. Nesta medida, determinou-se o valor deste índice em 56 espécies, procurando correlacioná-lo com o grau de frescura atribuído por análise sensorial. Resultados obtidos em 56 espécies revelaram a existência de grande variabilidade entre espécies. Isto é, algumas atinge,

rapidamente, percentagens elevadas enquanto que noutras, a evolução é lenta, obtendo-se valores relativamente baixos, mesmo quando apresentam um baixo grau de frescura.

Os resultados obtidos sugerem que em pescado com grau extra, o índice K é inferior a 20%. Para a maior parte das espécies, ao limite de aceitação correspondem valores entre 40 e 70%.

### **Contagens microbiológicas**

Os valores máximo e mínimo de contagens totais de mesófilos em 19 espécies apresentam-se no Quadro 3. Em apenas quatro (cação, carapau, raia e safio) foram detectadas contagens totais superiores a  $10^7$ , valor máximo admissível para o pescado fresco de acordo com o ICMSF (1986). Estas contagens totais reflectem, fundamentalmente, a contaminação inicial do pescado resultante da zona e do modo de captura bem como das condições de manuseamento, não podendo estabelecer-se uma relação directa com o grau de frescura.

### **Contaminantes**

Os teores máximos de alguns contaminantes - mercúrio, cádmio e chumbo – nos produtos da pesca estão fixados no Regulamento (CE) nº466/2001 (2001). No caso do mercúrio, este teor está fixado para a maioria das espécies em 0,5 mg/kg de peixe (0,5 ppm) e em 1 mg/kg de peixe (1 ppm) para algumas espécies particulares. Porém, tal como é referido neste Regulamento, deve ter-se também em conta a dose semanal admissível estabelecida, provisoriamente, a nível internacional. Esta dose, segundo a WHO (1976, 1990), é de 5 µg por quilograma de peso corporal e por semana que poderá incluir, no máximo, 3,3 µg de metilmercúrio, igualmente por quilograma de peso corporal e por semana. Por conseguinte, isto significa que o peso de peixe que se pode consumir, com segurança, depende do seu teor em mercúrio e do peso corporal do consumidor.

Quadro 3 - Contagens totais de mesófilos.

| Espécie      | m <sup>(*)</sup>    | M <sup>(*)</sup>    | Número de exemplares |
|--------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Atum         | 4,3x10 <sup>5</sup> | 3,0x10 <sup>6</sup> | 3                    |
| Besugo       | 3,2x10 <sup>5</sup> | 2,2x10 <sup>6</sup> | 5                    |
| Cação        | 5,6x10 <sup>4</sup> | 1,9x10 <sup>7</sup> | 5                    |
| Carapau      | 8,9x10 <sup>3</sup> | 3,5x10 <sup>7</sup> | 515                  |
| Corvina      | 2,2x10 <sup>3</sup> | 6,8x10 <sup>5</sup> | 5                    |
| Dourada      | 1,9x10 <sup>3</sup> | 1,1x10 <sup>5</sup> | 15                   |
| Pargo        | 3,8x10 <sup>5</sup> | 1,7x10 <sup>6</sup> | 5                    |
| Peixe-espada | 1,4x10 <sup>3</sup> | 1,6x10 <sup>6</sup> | 100                  |
| Pescada      | 2,1x10 <sup>3</sup> | 2,3x10 <sup>6</sup> | 103                  |
| Polvo        | 2,3x10 <sup>4</sup> | 1,3x10 <sup>6</sup> | 5                    |
| Raia         | 5,1x10 <sup>3</sup> | 1,4x10 <sup>7</sup> | 5                    |
| Safio        | 4,6x10 <sup>5</sup> | 2,7x10 <sup>7</sup> | 5                    |
| Salmão       | 4,3x10 <sup>4</sup> | 2,3x10 <sup>6</sup> | 5                    |
| Salmonete    | 8,0x10 <sup>3</sup> | 8,4x10 <sup>4</sup> | 5                    |
| Sarda        | 2,0x10 <sup>4</sup> | 6,4x10 <sup>5</sup> | 5                    |
| Sardinha     | 1,5x10 <sup>4</sup> | 2,1x10 <sup>5</sup> | 5                    |
| Sargo        | 1,1x10 <sup>4</sup> | 1,4x10 <sup>6</sup> | 5                    |
| Tamboril     | 4,8x10 <sup>3</sup> | 6,2x10 <sup>4</sup> | 5                    |
| Truta        | 1,7x10 <sup>3</sup> | 2,4x10 <sup>4</sup> | 15                   |

(\*) m – Mínimo registado; M – Máximo registado.

Nalguns exemplares de cerca de metade das espécies analisadas foram detectados níveis de mercúrio superiores aos valores limite (Fig. 2), destacando-se, de entre estas, as cartilaginosas, com excepção da raia. No entanto, é de referir que em muitos exemplares foram igualmente detectados níveis muito baixos. Esta variabilidade está relacionada, como é sabido, não só com o tamanho dos exemplares, mas também com a zona de captura.

O cádmio e o chumbo foram igualmente doseados em vários exemplares de cefalópodes, tendo os valores encontrados ficado aquém dos valores limite, respectivamente, 0,5 e 0,2 ppm (Reg. 466/2001, 2001).

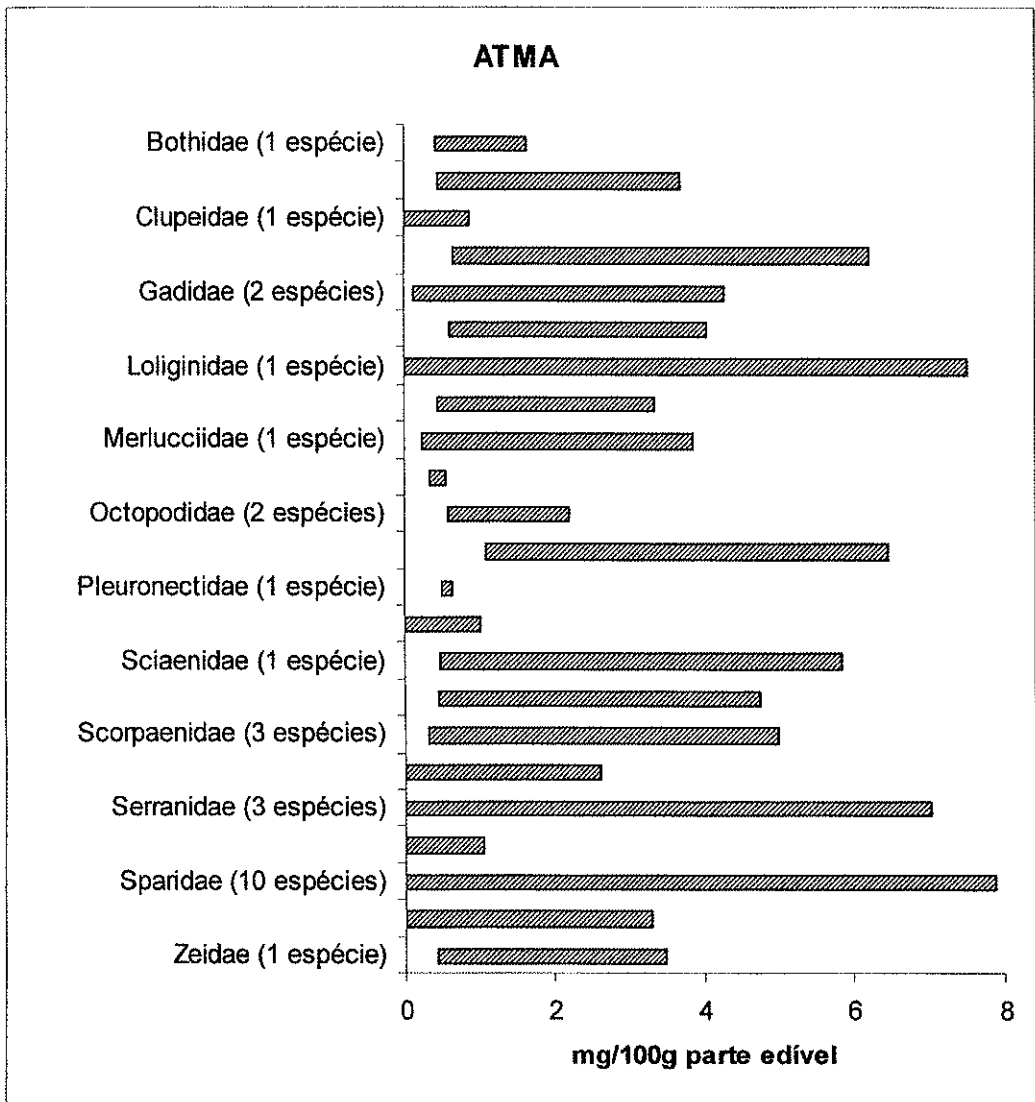


Figura 1 – Gama de variação dos valores de ATMA (mg/100g) para várias famílias antes da rejeição. (Bothidae: Carta-de-olhos-grandes; Carangidae: Carapau/Chicharro, Chicharro-moiro; Clupeidae: Sardinha; Congridae: Safio; Gadidae: Abrótea, Faneca; Haemulidae: Pargo-mulato; Loliginidae: Lula; Lophiidae: Tamboril; Merlucciidae: Pescada; Muraenidae: Moreia; Octopodidae: Polvo, Polvo-cabeçudo; Penaeidae: Gamba-branca; Pleuronectidae: Solha; Rajidae: Raias; Sciaenidae: Corvina; Scombridae: Atum, Cavala, Sarda Sarrajão; Scorpaenidae: Cantaril, Cantarilho, Rascasso-de-pintas; Sepiidae: Choco; Serranidae: Cherne, Garoupa, Mero; Soleidae: Azevia, Linguado; Sparidae: Besugo, Bica, Cachucho, Dourada, Goraz, Pargo, Pargo-russo, Pargo-sêmola, Salema, Sargo-safia; Trichiuridae: Peixe-espada, Peixe-espada-preto; Zeidae: Peixe-galo).

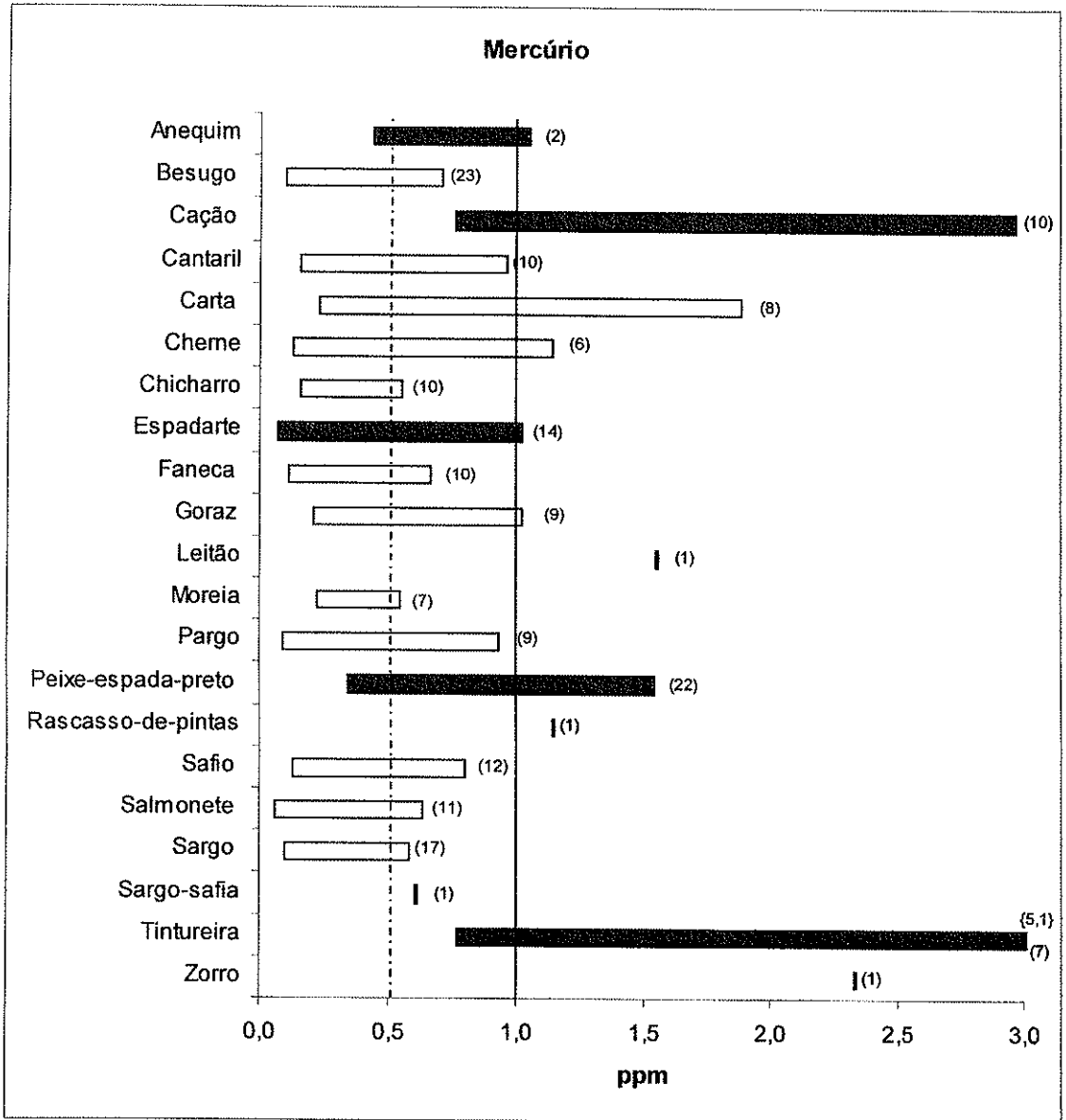


Figura 2 – Teor de mercúrio (ppm) em espécies que ultrapassam os respectivos valores limite.  
 □ Limite 0,5 ppm; ■ limite 1 ppm. Entre parêntesis encontra-se o número de exemplares analisados e entre chavetas o teor máximo.

## CONCLUSÕES

De um modo geral, pode afirmar-se que a larga maioria do pescado fresco comercializado em lota apresenta um bom grau de frescura.

Considera-se que a análise sensorial constitui uma ferramenta fundamental para a avaliação do grau de frescura, impondo-se, no entanto, a elaboração de tabelas específicas para cada espécie ou a introdução de outros sistemas dos quais se destaca o “Método do Índice de Qualidade” (QIM). Os índices químicos não permitem, de modo inequívoco, discriminar diferentes graus de frescura, mas podem servir de base para o estabelecimento de limites de rejeição.

De um modo geral, as contagens totais de mesófilos podem considerar-se aceitáveis, significando que nenhum peixe foi capturado em zonas muito contaminadas, nem as condições de manuseamento introduziram contaminações elevadas.

Em cerca de 30% das 72 espécies analisadas foram detectados, em alguns exemplares, níveis de mercúrio superiores aos valores limite prescritos na Legislação Europeia. Entre estas salientam-se alguns cartilagíneos e o peixe-espada-preto cujos teores deste contaminante recomendam um consumo parcimonioso, tendo em conta as doses semanais admissíveis que são recomendadas pela Organização Mundial de Saúde.

Este projecto foi financiado pela UE no âmbito do Programa Iniciativa Comunitária Pesca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Vol. 1, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 684 p.
- 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.
- Connell, J. J., 1975. Control of Fish Quality. Fishing News Ltd, 179 p.
- CE, 95/149/CE Decisão da Comissão de 8 de Março de 1995 que fixa os valores limite de azoto básico volátil total (ABVT) para determinadas categorias de produtos

- da pesca e os métodos de análise a utilizar. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº L 97 de 29.04.95.
- CE, 2406/96 Regulamento do Conselho de 26 de Novembro de 1996 Relativo à Fixação de Normas Comuns de Comercialização para Certos Produtos da Pesca. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº L 334 de 23.12.96.
- CE, 466/2001 Regulamento da Comissão de 8 de Março de 2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº L 77 de 16.03.2001.
- DGPA, 2000. Datapescas nº 47- Janeiro a Dezembro de 2000, 12 p.
- ICMSF, 1986. Micro-Organisms in Foods 2: Sampling for Microbiological analysis in Principles and Specific Applications, 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell Scientific Publications, p. 189-191.
- IPQ, 1988. Determinação do teor de mercúrio. Método espectrofotométrico de absorção atómica sem chama. NP-2928, 5 p.
- IPQ, 1986. Microbiologia Alimentar – Contagem de Microrganismos a 30°C. NP-3278, 6 p.
- Ryder, J.M., 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 678-680.
- WHO, 1976. Environmental Health Criteria 1: Mercury. Geneva, World Health Organization, 132 p.
- WHO, 1990. Environmental Health Criteria 101: Methylmercury. Geneva, World Health Organization, 144 p.

# EVALUATION OF MICROBIOLOGICAL RISKS IN FISH PRODUCTS

Paul A. Gibbs, BSc, PhD, FIFST

Cientista Convidado, Escola Superior de Biotecnologia, UCP, Porto

---

## **Introduction**

A hazard may be defined as the potential to adversely affect the health of a person; in foods this would equate to food-borne infection or intoxication. A risk is a measure of the probability of occurrence of the hazard and effects on health. There are risks in every human activity, but we accept certain risks more readily than others do. Evaluation of risks for a consumer therefore comprises a determination of the hazards that may be present in that food, whether it be a viable microorganism or a toxic product of metabolism, the level of the hazard in the food and the likely effect of that level of hazard on the consumer, i.e. a dose-response, or on the population consuming the product. Since the frequencies of occurrence of food-borne pathogens are often poorly understood, that there are non-homogeneous distributions (of organisms), unknowns (e.g. dose responses), variabilities, probabilities and uncertainties in each step of the risk evaluation, the end result of such an evaluation is likely to yield very wide limits of uncertainty. Nevertheless, mathematical means of microbiological risk assessment are being developed rapidly as a result of the Uruguay round of the General Agreement on Tariffs & Trades (GATT). The World Trade Organisation Sanitary and Phytosanitary Agreement (SPS) states that where there is dispute between nations about the safety of a food product, the countries involved should provide a risk assessment to help quantify whether the risks to consumers are significant. An extension to this is in the establishment of Food Safety Objectives (FSO), that is a statement of the frequency or level of a microbiological hazard that is acceptable in that food. Thus an FSO will have three components, a description of the food, the hazard of concern, and the expected level of protection. The means for

achieving an FSO would be by application food safety management systems (GMP/GHP, HACCP etc.).

It is beyond the scope of the current communication to describe and evaluate the mathematics of microbiological risk assessments, but the data required and the processes leading to risk assessment, will be covered.

### Food safety

The supply of safe food is now largely assured by the recognition of the benefits of application of hazard analysis and control of critical points in processing (HACCP). However, there are some food processes that cannot assure the destruction of food-borne pathogens, e.g. washing of salad items, cold-smoking or fermentation of fish, and these foods will always pose more of a risk to consumers than fully processed foods. It is not only the initial microbiological contamination from the environment in which the food was originally grown and harvested, but the possibility of further contamination and multiplication during handling that must be minimized by appropriate hygienic practices. Risk assessment is a useful tool to quantify such risks, provided that relevant data is available, and this is often not the case.

### Hazards in Fish

#### *Know your enemy*

*Clostridium botulinum* consists of a heterogeneous collection of anaerobic spore-forming bacteria, capable of elaborating neuro-paralytic toxins. The spores of the proteolytic and mesophilic strains of types A & B are generally associated with animals and soils, and run-off of agricultural land into the aquatic environment. The psychrotrophic type E strains are now regarded as typically aquatic, living particularly in mud and silts with a high organic matter content. Type E strains seem to be ubiquitous in temperate and colder waters of Northern Europe, especially in the Baltic and North Sea coasts of Scandinavia, but also in many enclosed bodies of water, such as bays and large lakes, e.g. in the USA / Canada Great Lakes. This type can also occasionally cause losses in trout farm ponds. Indeed, the ubiquity of the psychrotrophic strains of type E was established as a result of many cases of botulism

in the 1960s from vacuum- and modified atmosphere- packaged (VP / MAP), lightly processed fish taken from the Baltic. Fish taken from such environments should be treated as posing a particular risk from botulism and handled, stored and processed accordingly. Nevertheless, consumption of fresh fish is almost never associated with botulism - spoilage almost always occurs before toxin levels become a hazard. Proper cooking will eliminate the vegetative forms of the organism, but not spores. Lightly preserved products are a different matter, however.

*Vibrio* species include *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae*. Generally these species are associated with sewage polluted warmer waters, although they will survive cooler temperatures. *V. parahaemolyticus* is most commonly found in marine waters above 19°C although it can grow in laboratory conditions as low as 5°C. Originally this species was thought to be associated with the consumption of shellfish, but raw or near-raw finfish (sushi) are now often the cause of outbreaks in Japan in summer months. *V. cholerae* is historically associated with sewage contamination of seawater, and with consumption of raw shellfish. Proper cooking eliminates all *Vibrio* spp., although the low temperatures and short times used in poaching salmon and trout may permit survival.

*Aeromonas hydrophila* has been associated with human diarrhoeal illness, but the epidemiology, virulence factors and relationships between the mesophilic and psychrotrophic strains and pathogenicity, are not yet fully understood. Similarly, *Plesiomonas shigelloides* pathogenicity is not well documented, although all strains are mesophilic and therefore there is a seasonality to cases, generally from uncooked shellfish or under-cooked finfish.

*Listeria monocytogenes* has been the subject of intensive investigations during the past decade, as it has been shown to be distributed widely in soils and waters, has a wide temperature (psychrotrophic) and salinity range for growth, is facultatively anaerobic, and in susceptible segments of the population (pregnant women, fetuses, neonates, immunocompromised persons and the elderly), there is a high mortality rate. In salmon,  $D_{60}$  values of ca. 4.5 minutes have been reported. (Embarek & Huss, 1993), close to the temperature profiles of poaching of salmon. Major concerns have been

expressed about the safety of cold-smoked trout and salmon, and indeed the organism has often been found in many samples of cold smoked fish.

Several viruses have been reported as contaminants of filter-feeding molluscs, and there have been many outbreaks of viral hepatitis A (HAV) Norwalk viral gastroenteritis. Viruses are accumulated during filter feeding, but unlike bacteria, are only poorly removed by depuration and do not multiply in shellfish.

Histamine or scombroid fish poisoning is generally associated with the microbial production of histamine from those fish containing high levels of the amino acid histidine. Several species of bacteria are capable of decarboxylating histidine, and control measures are based on maintaining scombroid fish at temperatures of  $<5^{\circ}\text{C}$  and limiting shelf life.

### Microbiological risks in fish

#### *Raw fish and shellfish*

Whilst several of the pathogenic bacteria potentially associated with marine foods are capable of growth under chill storage conditions applied to fresh fish, cooking will severely reduce their numbers. However, the low temperatures/short times applied for cooking of fish or shellfish (e.g. poaching; product temperatures of  $65^{\circ}\text{C}$  for 5-10 mins of salmon or trout), may not entirely eliminate *L. monocytogenes*. Refrigerated storage of cooked fish should therefore be limited to *ca.* 6-10 days to minimize the possibility of growth of survivors, even if the product had been cooked in the final container, eliminating post-process contamination, e.g. 'sous vide' products.

Similarly, cooking of fish will not eliminate spore-formers nor botulinal toxin if that had been pre-formed. The risk of botulism from fresh fish is extremely small but the organism must be assumed to be present, as in most raw materials. Huss (1994) reported that consumption of fresh fish has never been shown to cause botulism. However, there is a potential exception in farmed trout where there may be growth of type E in organically rich sediments of the pond. In such cases there may be sufficient toxin present in the water to affect the behaviour of the live fish, and fish from such a pond should never be used for human consumption. Extended refrigerated storage of cooked fish should be avoided to minimize the risk of germination of surviving spores

of bacterial pathogens, and growth in the absence of competitive flora. Shelf lives should be limited to <10 days at 4°C, even for products cooked in the final pack, e.g. 'sous vide' products. Although the psychrotrophic, non-proteolytic strains of *Cl. botulinum* are capable of growth at temperatures as low as 3.3°C, growth rates are very slow, toxin formation in the absence of spoilage, only occurring after 4-8 weeks at 4°C. Whilst VP or MAP of fresh or processed fish has become common in recent years, it is important to recognize that increased levels of CO<sub>2</sub>, do not significantly decrease the rate of botulinal toxin production, and that toxin production may occur in the absence of overt spoilage (Eklund, 1982).

The other vegetative pathogens are readily controlled by correct chilled storage and cooking, followed by short shelf lives in chill after cooking. However, consumption of raw bivalves (e.g. oysters) has been associated with outbreaks of infections by *Vibrio* spp. and other pathogens accumulated by the filter feeders, in several part of the world. A particular area of concern is contamination by *V. vulnificus* in the shellfish beds off Florida. It is particularly important to establish the microbiological status of the growing areas of bivalves with respect to total heterotrophic flora and pathogens and in any doubt to apply depuration treatment. However, there is some concern regarding the 'viable but non-culturable' (VNC) state that vibrios can enter in seawater, with respect to their accumulation in bivalves and reverting to a culturable and infective state.

#### *Further processed fish products*

Combining other ingredients with fish gives rise to consideration of the microbial contamination of those ingredients. Many of the pathogens of concern in fish are also of concern in other food items, but there may be a quantitative difference in their presence according to the nature of the ingredient. Cooking of the ingredients prior to combining with fish would be expected to reduce the numbers of the pathogens, except for bacterial spores. Of potentially greater importance is the assembly of the product subsequent to the heating stage, as this should be carried out in strictly hygienic conditions.

### *Cold-smoked fish*

This group of products is potentially one of the most hazardous of all fish products. These products are preserved for short periods of time under refrigeration, by the combined action of salting and physical drying and smoke components, and consumed without further cooking. Currently, there are moves to reduce the salt levels or to decrease water losses during processing in these products, from the recommended minimum of 3.5% salt-on-water-phase, the level regarded as the minimum for control of the growth of psychrotrophic strains of *Cl. botulinum*. As stated above, these organisms must be regarded as being ubiquitous in the aquatic environment and therefore on marine foods, and lower levels of salt could lead to growth and toxin production.

*Listeria monocytogenes* is also found in the aquatic environment and on fresh fish. Whilst salting and smoking, followed by VP and chilling, are individually not sufficient to control the growth of this organism, in combination the growth rate is suppressed but not totally inhibited. There is evidence that the strains of this pathogen found on the raw fish are not those isolated from finished product (Rørvik *et al.*, 1995; Autio *et al.*, 1999) and thus control of contamination within the processing plant is more important.

### Risk Assessment

The proposed draft guidelines for the control of *L. monocytogenes* in foods, for consideration by the Codex Committee on Food Hygiene (issued August 2001 for consideration in Bangkok in October 2001), are based on considerations of risk assessment, and will be used to illustrate the stages of the assessment. The first question is that of the risk for consumers in different susceptible populations groups (elderly, immunocompromised, infants, pregnant women) relative to the general population. These risk groups were assessed from epidemiological data from France and the USA. It was determined that organ transplant patients (immunocompromised) were 2584 times more susceptible than non-immunocompromised persons when challenged with a dose of log 7.5 cfu. Elderly persons were only 1.6-7.5 times more susceptible than younger non-immunocompromised persons were. Therefore specific

control measures are justified for foods clearly identified as for the vulnerable groups. The second question is that of estimating the number of cases of listeriosis that would be likely from consumption of foods containing different levels of the organism. From dose-response curves based on epidemiological data, for a dose per serving of log 7.5 organisms, the total number of cases per year in the USA would be expected to be 2,130. Following this, the cases/year for lower doses per serving were calculated as in Table 1.

**Table 1.** Predicted number of cases/year of listeriosis in the USA for different dose levels (Codex Committee for Food Hygiene, 2001).

| Maximum dose at consumption<br>(Log cfu/serving) | Predicted number of cases/year |
|--|--------------------------------|
| 7.5  | 2,130                          |
| 4.5  | 24.9                           |
| 3.5  | 5.3                            |
| 2.5  | 1.1                            |
| 1.5  | 0.2                            |
| 0.5  | 0.06                           |

It is clear that reducing the dose level per serving below log 3.5 cfu would reduce the number of cases/yr by >99%.

The final question that the Codex Committee attempted to answer was that of relative risk of those foods that do and do not support growth of *L. monocytogenes*. It was concluded that more data was required, but that at the moment there was no reason to believe that there any differences between dose levels in foods that do and do not support growth that would result in infections. Clearly, modelling of the growth of *L. monocytogenes* in foods is a valuable means of determining the likely outcome of changes in food storage and formulation.

The overall recommendation of Codex was that the level of *L. monocytogenes* in foods should not exceed 100cfu/g at the point of consumption, and that even when growth had occurred to levels of log 3cfu/g the risk of infection for

immunocompromised persons was low. The management options for maintaining these levels are those embodied in Good Hygienic Practice (GHP) and HACCP and in establishing microbiological criteria for raw materials, processing plant and surfaces and finished products. Codex also strongly recommended that data on the incidence of listeriosis is made available, through mandatory national notification of cases. It was also deemed important that all strains of *L. monocytogenes* be characterized by at least one discriminatory typing method, e.g. PFGE, sero- and phage-typing. Such information could be used to identify common vehicles of infection for apparently unrelated cases and enable appropriate investigations and corrective actions.

The Codex document also contains guidelines for the control of *L. monocytogenes* within food processing plants, including seafood processing (Annex 2.3).

The European Commission (1997) has published the principles to be used in the development of risk assessment for microbiological hazards in foods and the derivation of microbiological criteria for animal products. These do not contain any references to the specific hazards nor foods, but that development of microbiological criteria should be based upon risk assessment, and the utilization of the principles of HACCP, Guides to Good Hygienic Practice. Similarly, the FAO (2000) published the results of an expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods. In contrast to the EU document, the FAO consultation considers in detail, hazard characterization and exposure assessment for *Salmonella* in eggs and poultry and *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods, which category includes cold-smoked fish. The consultation document also includes a comparison of the various types of dose-response models for describing infection, morbidity or mortality, and comments upon the high degree of uncertainty and variation. Nevertheless, both these documents are of value in helping with a risk assessment.

## References

Autio, T.; Hielm, S.; Miettinen, M.; Sjöberg, A-M.; Aarnisalo, K.; Björkroth, J.; Mattila-Sandholm, T.; Korkeala, H., 1999. Sources of *Listeria monocytogenes*

- contamination in a cold-smoked rainbow trout plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 150-155.
- Eklund, M.W., 1982. Significance of *Clostridium botulinum* in fishery products preserved short of sterilization. *Food Technology*, 115, 107-112.
- Embarek, P.K.; Huss, H.H., 1993. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged pasteurised fish fillets. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 85-95.
- European Commission, 1997. Principles for the development of risk assessment of microbiological hazards under Directive 93/43/EEC concerning the hygiene of foodstuffs; Principles for the development of microbiological criteria for animal products and products of animal origin intended for human consumption. Office for Official Publications of the European Communities, 1998.
- FAO, 2000. Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods. FAO, Rome.
- Huss, H.H., 1994. Assurance of seafood quality. FAO Fisheries Technical Paper. No. 334. Rome; Food & Agricultural Organisation of the United Nations.
- Rørvik, L.M.; Caugant, D.A.; Yndestad, M., 1995. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 19-27.



# APLICAÇÃO DE ATMOSFERAS MODIFICADAS E GELO LÍQUIDO NA CONSERVAÇÃO DO PESCADO

Amparo Gonçalves, Rogério Mendes e Maria Leonor Nunes

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa

---

## INTRODUÇÃO

A deterioração do pescado deve-se ao efeito combinado de reacções químicas, resultantes da actividade de enzimas endógenas e do crescimento bacteriano. Dada a poiquilothermia dos peixes marinhos, o metabolismo e flora bacteriana comensal da pele e dos intestinos estão adaptados a temperaturas mais baixas do que nos mamíferos. Desta forma, a refrigeração tem menor efeito na redução da deterioração, comparativamente com a carne de mamíferos e de aves, em especial nos produtos da pesca capturados em águas temperadas e frias (Huss, 1995). O período de conservação de pescado, adequadamente mantido em gelo (e refrigerado), é de 8 a 12 dias para a maior parte das espécies de peixe (Huss, 1995). Considerando que as viagens de pesca têm duração variável em função da espécie e dos locais de captura, o período de vida útil em gelo do pescado desembarcado pode ser curto. Huss (1988) recomenda que o peixe seja arrefecido à temperatura do gelo fundente (0 °C) o mais rápido possível após a captura. Este autor refere que, por exemplo, se o peixe for mantido durante 6 horas a 10 °C o seu período de conservação será reduzido em 1 dia. Em geral, as taxas de deterioração autolítica e microbiana são dependentes do nível de contaminação microbiana, temperatura de conservação e embalagem.

O desenvolvimento das tecnologias de conservação de alimentos tem sofrido uma grande evolução desde a secagem natural ao sol até à congelação. Mais recentemente, o interesse pela atmosfera modificada e pelo gelo líquido tem aumentado por poderem constituir tecnologias alternativas para a conservação dos produtos da pesca.

## ATMOSFERA MODIFICADA

A aplicação de atmosferas modificadas constitui uma tecnologia de conservação cada vez mais usada dada a sua capacidade de prolongar o período de vida útil de produtos perecíveis. Basicamente esta tecnologia consiste na substituição do ar, que envolve o produto, por uma composição gasosa diferente e aplica-se em conjugação com a refrigeração, a temperaturas inferiores a 5°C, de modo a retardar a deterioração.

As três técnicas mais relevantes na aplicação desta tecnologia em produtos da pesca são: embalagem em atmosfera modificada (EAM), embalagem em vácuo (EV) e atmosfera controlada (AC). A primeira técnica consiste na colocação do produto alimentar numa embalagem de baixa permeabilidade aos gases, procedendo-se à evacuação do ar, seguida da injeção de um gás ou uma mistura de gases e selagem da embalagem. A proporção de cada componente da mistura gasosa é fixada na altura em que é introduzida na embalagem. Não se exerce controlo subsequente sobre a composição gasosa no interior das embalagens e, naturalmente, a concentração dos gases altera-se com o tempo. Esta técnica é utilizada principalmente na comercialização directa ao consumidor.

A EV é um processo muito semelhante à técnica EAM, consistindo apenas em evacuar todo o ar existente na embalagem. Tendo em conta que não é possível evacuar todo o ar, a atmosfera gasosa da embalagem em vácuo é passível de alterações durante o armazenamento. Nesta técnica é muito importante que a embalagem apresente baixa permeabilidade ao O<sub>2</sub>.

No processo AC aplicam-se gases isoladamente ou em mistura e a proporção de cada gás é controlada, mantendo a composição gasosa inicial ou alterando-a progressivamente durante a armazenagem e/ou circuito de distribuição. Esta técnica é utilizada em etapas primárias, no armazenamento e conservação a granel e no transporte de produtos. Os recipientes utilizados são de grandes dimensões, normalmente contentores de plástico ou de aço inox.

Os três principais gases usados comercialmente são o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o oxigénio (O<sub>2</sub>) e o azoto (N<sub>2</sub>) (Phillips, 1996), normalmente, em diferentes

combinações e proporções, dependendo principalmente da microflora capaz de crescer no produto, ou seja, da susceptibilidade do produto ao O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

O CO<sub>2</sub> (solúvel em água e em gordura) é o principal responsável pelo efeito bacteriostático das atmosferas modificadas, que se traduz na extensão da fase de latência dos microrganismos e no decréscimo da taxa de crescimento durante a fase logarítmica (Farber, 1991). O efeito inibidor deste gás num sistema alimentar é influenciado por vários factores, designadamente pelo tipo e fase de crescimento dos microrganismos presentes inicialmente, temperatura de armazenamento e tipo de produto embalado (Farber, 1991; Reddy *et al.*, 1992). Para a obtenção de um efeito bacteriostático máximo a temperatura deve ser mantida próxima de 0°C, uma vez que a solubilidade do CO<sub>2</sub> é maior às temperaturas mais baixas.

O O<sub>2</sub>, em geral, estimula o crescimento de bactérias aeróbias e poderá inibir o crescimento de bactérias estritamente anaeróbias (Farber, 1991). A presença deste gás pode provocar problemas de oxidação dos lípidos, sobretudo em pescado com elevado teor de gordura. Por este motivo, nestes produtos é aconselhável a utilização de misturas binárias de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> (Phillips, 1996). No entanto, esta situação coloca o problema do potencial crescimento de *C. botulinum*, por ser um microrganismo anaeróbio e, conseqüentemente, a produção da toxina neurotóxica do botulismo.

O N<sub>2</sub> é um gás inerte e inodoro com baixa solubilidade em água e em gordura. É usado, principalmente, para evitar o colapso de embalagens, sobretudo quando se utilizam atmosferas com elevada concentração de CO<sub>2</sub> e como substituto do O<sub>2</sub> de forma a retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento de microrganismos aeróbios (Farber, 1991).

Church (1998) refere que a primeira aplicação comercial significativa desta tecnologia ocorreu apenas em 1974, com a venda de carne embalada em atmosfera modificada enquanto que a primeira comercialização de peixe conservado nestas condições teve lugar apenas em 1979. Desde então, verificou-se uma considerável expansão do mercado de produtos conservados deste modo, em parte devido à crescente procura dos consumidores por alimentos frescos e refrigerados, contendo poucos aditivos e apresentando características muito semelhantes às do produto fresco.

Globalmente, o maior crescimento de vendas de produtos da pesca em EAM tem sido registado na Europa, principalmente em França e no Reino Unido (Hill, 1999). No início dos anos 90, os produtos da pesca representaram no Reino Unido o quarto maior sector do comércio retalhista de EAM, constituindo 10% do total (Hill, 1999).

Em Portugal não existe ainda comercialização de produtos da pesca em EAM embora a legislação portuguesa preveja a utilização de gases de embalagem em géneros alimentícios em geral (Decreto-Lei nº 363/98) e nos produtos da pesca em particular (Decreto-Lei nº 375/98).

Teoricamente parece existir um elevado potencial para o futuro desenvolvimento na Europa de todo o mercado de produtos em atmosfera modificada. No entanto, os especialistas não prevêem um crescimento rápido até que uma série de problemas seja solucionada, nomeadamente a segurança alimentar (relacionada sobretudo com o possível crescimento de *Clostridium botulinum*), ausência de uma rede de distribuição refrigerada em alguns países da Europa, impacte ambiental a longo termo das embalagens utilizadas e competição com produtos não embalados de elevada qualidade, particularmente no sector das pescas (Hill, 1999).

A utilização de atmosfera modificada em produtos da pesca foi revista por vários autores, existindo, no entanto, pouca informação sobre a sua aplicação em crustáceos. É frequente a utilização de misturas contendo 40-60%CO<sub>2</sub>, em combinação com N<sub>2</sub>, em espécies com elevado teor de gordura e 40%CO<sub>2</sub>/30%O<sub>2</sub>/30%N<sub>2</sub> em espécies consideradas magras e em crustáceos (Stammen *et al.*, 1990; Reddy *et al.*, 1992; Gibson e Davis, 1995; Phillips, 1996; Church, 1998). Para conservação a granel de todos os produtos da pesca, Church (1998) refere a utilização de 75%CO<sub>2</sub>/25% N<sub>2</sub>.

Relativamente à extensão do período de vida útil para pescado conservado em EAM, Church (1998) refere um período de vida útil típico no intervalo 3-14 dias, dependendo do produto. Em comparação com outros produtos, como a carne, este prolongamento é marginal, sendo compensado pela melhoria no manuseamento e apresentação do produto.

### *Ensaio de aplicação de atmosfera modificada*

No Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca (DITVPP) do IPIMAR têm sido realizados vários estudos sobre o efeito da aplicação de atmosfera modificada e controlada na conservação de algumas espécies de peixes ósseos, moluscos e crustáceos (Gonçalves *et al.*, 1997a; Gonçalves *et al.*, 1997b; Gonçalves *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2001a; Gonçalves *et al.*, 2001b). A avaliação das alterações da qualidade realizou-se através de análises sensoriais, físicas, químicas e microbiológicas.

Relativaente à conservação em atmosfera modificada estudou-se o efeito de três misturas gasosas, 40%CO<sub>2</sub>/32%O<sub>2</sub>/28%N<sub>2</sub>, 42%CO<sub>2</sub>/58%N<sub>2</sub> e 64%CO<sub>2</sub>/33%O<sub>2</sub>/3%N<sub>2</sub>, na conservação respectivamente de filetes de peixe-espada-preto (*Aphanopus carbo*) e de polvo inteiro (*Octopus vulgaris*) à temperatura de 2°C.

A avaliação sensorial em cru evidenciou uma diminuição acentuada do cheiro característico (Fig. 1) em todas os lotes de peixe-espada-preto, durante os primeiros 5 dias de conservação. A partir deste dia, registou-se a perda completa do cheiro típico no lote controlo (embalado em ar) e maior eficiência da mistura 40%CO<sub>2</sub>/32%O<sub>2</sub>/28%N<sub>2</sub> na preservação deste atributo. No polvo, o cheiro característico diminuiu acentuadamente entre o 2º e o 6º dias, mantendo-se relativamente constante nos lotes embalados nas duas misturas gasosas até ao final do período de conservação.

O cheiro amoniacal (Fig. 1), indicador da perda de frescura dos produtos da pesca, foi mais evidente a partir do 8º dia no peixe-espada-preto embalado em ar e apenas ao fim de 14 e 20 dias nos lotes embalados em 42%CO<sub>2</sub>/58%N<sub>2</sub> e 40%CO<sub>2</sub>/32%O<sub>2</sub>/28%N<sub>2</sub>, respectivamente. No caso do polvo, o efeito das misturas gasosas não foi tão evidente, registando-se pontuação média idêntica para os três lotes, a qual se manteve praticamente constante até ao final do período de conservação nos lotes embalados nas duas misturas gasosas.

A rejeição sensorial dos lotes controlo ocorreu ao fim de 9 e 14 dias de conservação, respectivamente para o polvo e peixe-espada-preto. Os lotes embalados em atmosfera modificada foram rejeitados pelo painel sensorial após 20 e 23 dias no

caso do peixe-espada-preto embalado em 42%CO<sub>2</sub>/58%N<sub>2</sub> e 40%CO<sub>2</sub>/32%O<sub>2</sub>/28%N<sub>2</sub>, respectivamente e ao fim de 16 dias no caso do polvo.

A evolução das contagens de microrganismos totais foi consideravelmente diferente nas amostras embaladas em ar (controlo) e em atmosfera modificada. No controlo, o número de microrganismos totais aumentou de aproximadamente 2,5x10<sup>2</sup> para 1,5x10<sup>6</sup> ufc/g ao fim de 5 dias de armazenagem do peixe-espada-preto (Fig. 2) e de 1,5x10<sup>4</sup> para 1,0x10<sup>6</sup> ufc/g ao fim de 9 dias no caso do polvo. Nos lotes EAM o crescimento de microrganismos foi mais lento, registando-se contagens máximas de 1,9x10<sup>6</sup> e 4,9x10<sup>5</sup> ufc/g ao fim de 23 e 16 dias, respectivamente nos filetes de peixe-espada-preto e no polvo embalados na mistura contendo 40%CO<sub>2</sub>/32%O<sub>2</sub>/28%N<sub>2</sub>. O número máximo admissível de microrganismos totais para produtos da pesca frescos (10<sup>7</sup> ufc/g) indicado pelo ICMSF (1986) não foi atingido em nenhum dos casos, quer nos lotes controlo quer nos lotes embalados nas misturas gasosas.

No que respeita à formação do azoto básico volátil total (ABVT), indicador de deterioração dos produtos da pesca, verificou-se um grande aumento no teor deste composto no lote controlo dos filetes de peixe-espada-preto (25 mgN/100g) entre o 8º e o 14º dias (Fig. 2), enquanto que nos filetes embalados em 42%CO<sub>2</sub>/58%N<sub>2</sub> e 40%CO<sub>2</sub>/32%O<sub>2</sub>/28%N<sub>2</sub> este aumento só ocorreu ao fim de 14 e 20 dias, respectivamente. No caso do polvo, o aumento do ABVT ocorreu muito mais cedo nos três lotes, entre o 2º e o 6º dia.

De um modo geral, os resultados obtidos evidenciaram maior eficácia da mistura 40%CO<sub>2</sub>/32%O<sub>2</sub>/28%N<sub>2</sub> na conservação dos filetes de peixe-espada-preto enquanto que no polvo inteiro não se observou um efeito notório das misturas testadas.

Em relação à conservação em atmosfera controlada, estudou-se o efeito de três atmosferas na conservação de gamba (*Parapenaeus longirostris*) inteira cujos resultados se apresentam na Tabela 1. Ao nível sensorial, os principais efeitos das atmosferas testadas, em relação à conservação convencional em gelo, foram o retardamento do aparecimento da melanose e do cheiro amoniacal e a manutenção do sabor típico, ocorrendo, por outro lado, uma diminuição do brilho e da cor. Este último efeito foi observado mesmo no lote mantido na atmosfera com menor concentração de CO<sub>2</sub> (13-20%CO<sub>2</sub>/17-14%O<sub>2</sub>). No entanto, não afectou a aceitabilidade da gamba

uma vez que foi considerada de qualidade sensorial aceitável ao fim dos cinco dias de conservação, enquanto que a gamba conservada apenas em gelo foi rejeitada pelo painel sensorial.

Os resultados das análises químicas evidenciaram uma considerável eficácia das atmosferas, sobretudo da atmosfera cuja concentração de CO<sub>2</sub> aumentou gradualmente durante a conservação (17-37%CO<sub>2</sub>/17-12%O<sub>2</sub>), na redução das actividades autolítica e microbiana, contribuindo para a manutenção dos teores iniciais de compostos característicos de um elevado grau de frescura, como a inosina monofosfato e para a inibição da formação de hipoxantina e de compostos azotados voláteis, típicos de produtos da pesca deteriorados. Porém, concentrações iniciais elevadas de CO<sub>2</sub> parecem favorecer a formação de aminas biogénicas, em especial a agmatina.

Como conclusão, pode dizer-se que a conservação em atmosfera controlada, contendo 13-37%CO<sub>2</sub> e até 17%O<sub>2</sub> manteve a aceitabilidade da gamba até 5 dias, possibilitando uma extensão mínima de aproximadamente 1 a 2 dias em relação à conservação usual em gelo.

## **GELO LÍQUIDO**

O controlo da temperatura é, de entre todos os factores que afectam o nível de deterioração do pescado, o que tem uma influência mais significativa. A utilização de gelo tem sido, durante muitos anos, a forma privilegiada de arrefecer o pescado e de o manter a baixa temperatura. Apesar da congelação e da água do mar refrigerada serem também utilizadas, a aplicação de gelo é ainda o método mais usado no controlo da temperatura do pescado.

Nos últimos anos foi desenvolvido um novo tipo de gelo conhecido como gelo binário, Flo-Ice™ ou "Slurry ice". Este gelo tem uma forma líquida e é composto por pequenos cristais de gelo microscópicos suspensos em salmoura ou água do mar, o que lhe confere uma temperatura mais baixa do que a do gelo em escama. Estas características fazem deste novo tipo de gelo um excelente meio de arrefecimento.

Em termos tecnológicos, os cristais de gelo são originados pelo arrefecimento de uma solução de salmoura ou água do mar ao passar num cilindro de aço inoxidável.

Posteriormente, os cristais de gelo formados na parede do cilindro são removidos, através de um mecanismo de raspagem, ficando em suspensão no fluido e formando, assim, um gelo de natureza líquida e bombeável. Este gelo pode ser armazenado num reservatório ou recirculado de novo pelo sistema de produção de gelo para, desta forma, aumentar a percentagem de cristais na mistura. A fracção de gelo pode atingir um máximo de 60% antes da suspensão se tornar demasiado viscosa e perder a sua capacidade de ser bombeado.

A temperatura do gelo líquido é mais baixa do que a do gelo convencional produzido com água doce e está dependente de dois factores: a força iónica da salmoura ou a salinidade da água do mar e a percentagem da fracção de gelo na mistura binária. O impacte destes dois factores na temperatura de produção está representada na figura 3. Por exemplo, se a percentagem de sal na salmoura for de 3% e a mistura binária for constituída por cerca de 40% de cristais de gelo, a temperatura resultante será de  $-2,9$  °C. À medida que a fracção de gelo aumenta a temperatura diminui, devido ao aumento da concentração de sal na salmoura restante.

Para além da vantagem prática de poder ser bombeado, o gelo líquido apresenta benefícios potenciais a dois níveis. Em primeiro lugar, os pequenos cristais e a natureza líquida do gelo permitem que este envolva completamente o peixe numa camada consistente, provocando assim o seu rápido arrefecimento. Em segundo lugar, o facto das temperaturas atingidas serem mais baixas do que as do gelo normal (Fig. 4), resulta numa temperatura de armazenagem mais baixa o que reduz as taxas de deterioração bacteriana e enzimática, mantendo o pescado com melhor qualidade durante mais tempo. Na Tabela 2 estão sumariados alguns dos principais aspectos que diferenciam o gelo líquido do gelo normal em escama.

No âmbito do desenvolvimento de novas tecnologias de conservação do pescado realizaram-se dois trabalhos no Laboratório de Bioquímica do DITVPP em que se estudou a utilização deste novo tipo de gelo (Huidobro *et al.*, 2001a; Huidobro *et al.*, 2002).

A colheita dos produtos de aquacultura, ao contrário dos animais terrestres, pode ser efectuada mediante abate nas zonas de produção, o que permite jogar com o compromisso entre o bem estar animal e a qualidade final dos produtos. Este aspecto

determinante tem levado os piscicultores a interessarem-se pelas condições de abate que proporcionem melhor qualidade às suas produções e que menos controvérsia levantem aos defensores dos direitos dos animais. Neste sentido têm sido desenvolvidos vários trabalhos que relacionam o método de abate com a qualidade do pescado (Kuhlmann *et al.*, 2000; Huidobro *et al.*, 2001b), contudo de entre os trabalhos realizados apenas um aborda a utilização de gelo líquido (STS, 1998).

### *Aplicação de gelo líquido*

Tendo em conta que a dourada é uma das principais espécies produzidas em Portugal, foi estudado o efeito do abate com gelo líquido na qualidade do produto final em comparação com a forma tradicional de abate, com gelo em escama e água. Os resultados obtidos mostraram que o tempo necessário para imobilizar completamente o pescado foi significativamente reduzido (40 min para 20 min). O teor em água da dourada foi também influenciado pelo abate com gelo líquido, tendo-se registado mais 2% de humidade do que na dourada abatida com uma mistura de gelo e água.

Como consequência do mais rápido arrefecimento e da mais baixa temperatura atingida do pescado abatido com gelo líquido, registaram-se ligeiros benefícios na qualidade físico-química. Contudo, verificou-se a presença de sangue aderente à pele, como resultado da sua maior difusão no meio líquido (o gelo em escama absorve este sangue) e ainda o aparecimento de uma névoa leitosa nos olhos da dourada abatida com gelo líquido (Fig. 5). Tendo em conta a importância que este parâmetro apresenta para o mercado nos primeiros dias de armazenagem, esta forma de abate diminui o valor comercial da dourada. Outros autores (Prout e Boulter, 1998) registaram efeito idêntico em bacalhau que, todavia, consideraram como reversível e justificaram-no como decorrente de uma congelação parcial. Trabalhos futuros deverão ser conduzidos de forma a estudar esta questão.

Foi ainda efectuado um estudo comparativo da refrigeração a bordo de gamba (*Parapenaeus longirostris*) com gelo líquido e com gelo normal em escama. A qualidade foi avaliada através de parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e sensoriais, após 1 e 4 dias de armazenagem.

A aplicação de gelo líquido imediatamente após a captura da gamba reduziu mais rapidamente a temperatura, diminuiu a formação de compostos azotados e retardou o aumento de pH e o desenvolvimento de microrganismos, durante a armazenagem em refrigerado. Por outro lado, na textura (força máxima à ruptura, dureza e elasticidade) registaram-se apenas ligeiras alterações. No entanto, verificou-se o desaparecimento das cores brilhantes características e o aparecimento de tonalidades mais baças na carapaça da gamba arrefecida com gelo líquido, o que deprecia o valor comercial dos produtos. Contudo, a aplicação de gelo líquido revelou-se vantajosa em relação à aplicação de gelo em escama e parece ser particularmente indicada no processamento de matéria prima que vai posteriormente ser descascada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHURCH, N., 1998. MAP fish and crustaceans – sensory enhancement. *Food Sci. Technol. Today*, 12 (2): 73-83.
- DECRETO-LEI nº 363/98. Condições de utilização dos aditivos alimentares, com excepção dos corantes e dos edulcorantes. *Diário da República*, Nº 268, I Série A, 19.11.1998.
- DECRETO-LEI nº 375/98. Normas sanitárias relativas à produção e colocação no mercado dos produtos da pesca destinados ao consumo humano. *Diário da República*, Nº 272, I Série A, 24.11.1998.
- FARBER, J.M., 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology – a review. *J. Food Prot.*, 54: 58-70.
- GIBSON, D.M.; DAVIS, H.K., 1995. Fish and shellfish products in sous vide and modified atmosphere packs. *In: Principles of modified atmosphere and sous vide product packaging.* (Eds.) Farber, J.M.; Dodds, K.L., Technomic Publishing Company Inc., Pennsylvania. pp 153-174.
- GONÇALVES, A.; PEREIRA, T.; ALBUQUERQUE, M.; NUNES, M. L., 1997a. Alterações microbiológicas do peixe-espada-preto (*Aphanopus carbo*) e do polvo (*Octopus vulgaris*) armazenados em atmosferas modificadas. Congresso Nacional de Microbiologia Micro 97. Tomar, 29 Novembro - 1 Dezembro.

- GONÇALVES, A.; PEREIRA, T.; NUNES, M.L., 1997b. Effect of modified atmospheres on the shelf life of black scabbardfish (*Aphanopus carbo*). 27th Annual WEFTA Meeting. Madrid, 20 – 22 October.
- GONÇALVES, A.; PEREIRA, T.; SEQUEIRA, S.; NUNES, M. L., 1999. Alterações do peixe-espada-preto conservado em atmosferas modificadas. *In*: Livro de Actas do 4º Encontro de Química de Alimentos. (Eds) Sociedade Portuguesa de Química; Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra. pp 5-7.
- GONÇALVES, A.; TAFULA, J.; ALVES, R.; NUNES, M. L., 2001a. Alterações sensoriais e químicas de gamba (*Parapenaeus longirostris*) conservada em atmosfera dinâmica. *In*: Livro de Actas do 5º Encontro de Química de Alimentos. (Eds.) Sociedade Portuguesa de Química; Universidade Católica, Escola Superior de Biotecnologia, Porto. pp 333 - 335.
- GONÇALVES, A.; TAFULA, J.; ALVES, R.; NUNES, M. L.; CABRITA, J., 2001b. Effect of modified atmosphere on the shelf life of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). 31st Annual WEFTA Meeting. Espoo, 27 – 31 May.
- HILL, S., 1999. Product trends and developments for the fish processing sector in Europe. *Int. Food Inf. Service*, May 1999 (citado em 28.08.2001). [http://www.ifis.org/hottopics/fish\\_article.html](http://www.ifis.org/hottopics/fish_article.html).
- HUIDOBRO, A.; LOPEZ-CABALLERO, E.; MENDES, R., 2002. On board processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) with liquid ice. Effect on quality. *Eur. Food Res. Technol.* (submetido para publicação).
- HUIDOBRO, A.; MENDES, R.; NUNES, M.L., 2001a. Slaughtering of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in liquid ice: influence on fish quality. *Eur. Food Res. Technol.*, 213: 267-272.
- HUIDOBRO, A.; PASTOR, A.; TEJADA, M., 2001b. Adenosine triphosphate and derivatives as freshness indicators of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Sci. Technol. Int.*, 7: 23-30.
- HUSS, H.H., 1988. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Colección FAO: Pesca, N° 29, FAO, Roma. 132 p.
- HUSS, H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.*, N° 348, FAO, Rome. 195 p.

- ICMSF, 1986. Sampling plans for fish and shellfish. *In: Microorganisms in foods*, vol. 2, Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. (Ed.) The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp 181-196.
- KUHLMANN, H.; MUENKNER, W.; VAN DE VIS, H.; OEHLenschLAeGER, J.; KOCK, M., 2000. Investigations of anaesthetic effect of 'Aqui-S' and chemical similar structured compounds on eel (*Anguilla anguilla*). *Archiv fuer Lebensmittelhygiene*, 51: 60-62.
- PHILLIPS, C. A., 1996. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 31: 463-479.
- PROUT, P.; BOULTER, M., 1998. Initial trials of the binary icing of fish. Seafish Report n° SR518, Seafish Technology, Hull, Reino Unido.
- REDDY, N.R.; ARMSTRONG, D.J.; RHODEHAMEL, E.J.; KAUTTER, D.A., 1992. Shelf life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review. *J. Food Saf.*, 12: 87-118.
- STAMMEN, K.; GERDES, D.; CAPORASO, F., 1990. Modified atmosphere packaging of seafood. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 29: 301-331.
- STS Report, 1998. Informe sobre la optimización del método de sacrificio. STS Crta. Vieja de Ajalvir km 2,2. Polígono Industrial La Garena Naves 12-13, Alcalá de Henares, Madrid, Espanha.

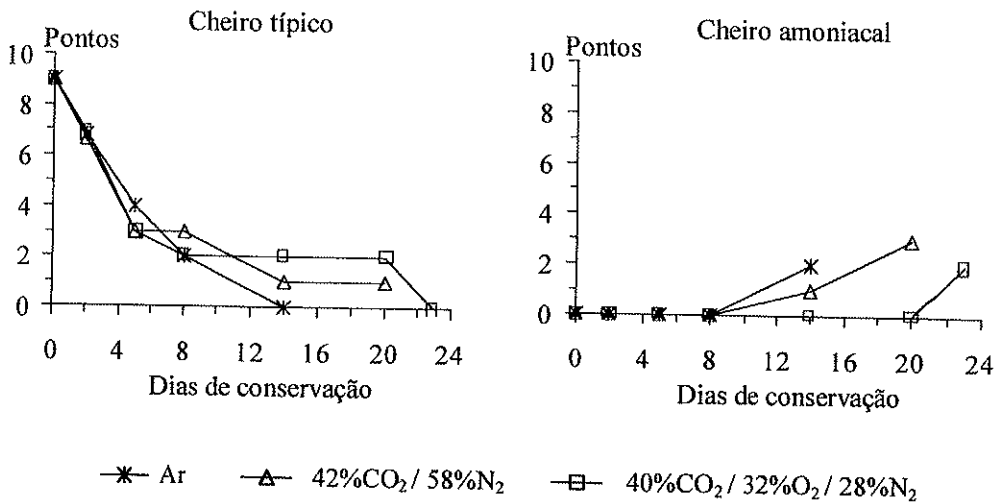


Figura 1 - Evolução do cheiro típico e do cheiro amoniacal durante a conservação de filetes de peixe-espada-preto crus embalados em atmosfera modificada e em ar a 2 °C.

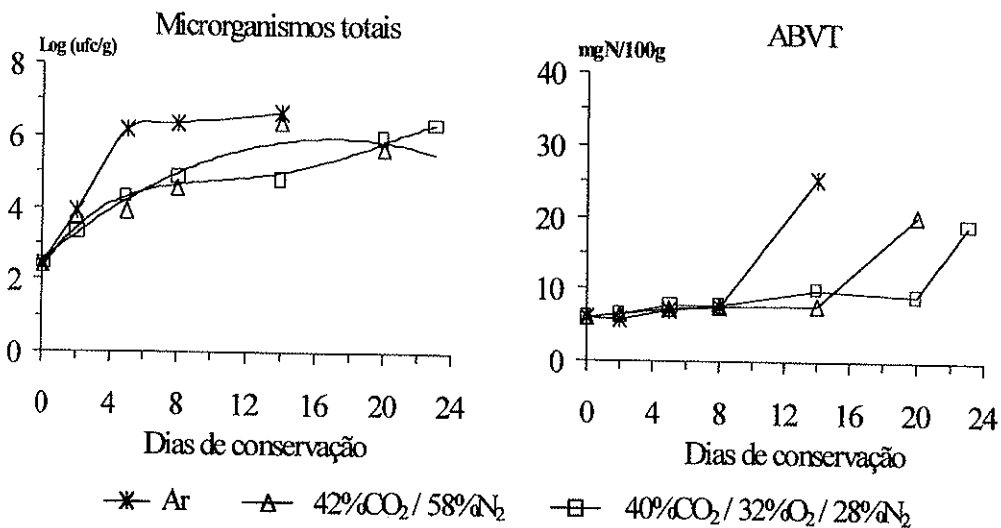


Figura 2 - Evolução das contagens de microrganismos totais e dos teores de azoto básico volátil total (ABVT) durante a conservação de filetes de peixe-espada-preto crus embalados em atmosfera modificada e em ar a 2 °C.

Tabela 1 - Alterações de gamba após 5 dias de conservação em gelo e em atmosfera controlada a 1-2 °C.

|  | pH   | IMP<br>( $\mu\text{mol/g}$ ) | Hx<br>( $\mu\text{mol/g}$ ) | ABVT<br>(mgN/100g) | Qualidade sensorial |
|--|------|------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|
| Gamba inicial                                | 7,18 | 10                           | 1                           | 24                 | Aceitável           |
| Conservação em gelo                          | 7,72 | 6                            | 1                           | 52                 | Inaceitável         |
| 13-20%CO <sub>2</sub> / 17-14%O <sub>2</sub> | 7,58 | 8                            | 1                           | 52                 | Aceitável           |
| 24-32%CO <sub>2</sub> / 12-09%O <sub>2</sub> | 7,55 | 8                            | 1                           | 34                 | Aceitável           |
| 17-37%CO <sub>2</sub> / 17-12%O <sub>2</sub> | 7,19 | 9                            | 1                           | 26                 | Aceitável           |

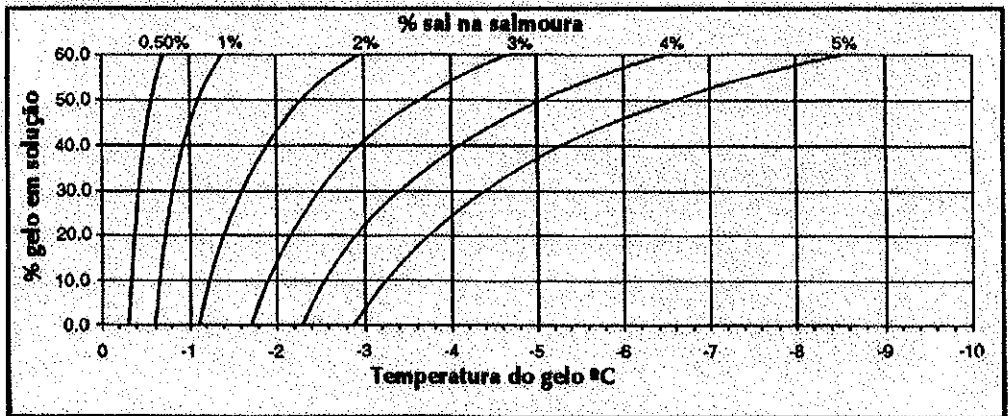


Figura 3 - Variação da temperatura do gelo líquido em função da concentração de cristais de gelo em suspensão e da concentração de sal na salmoura.

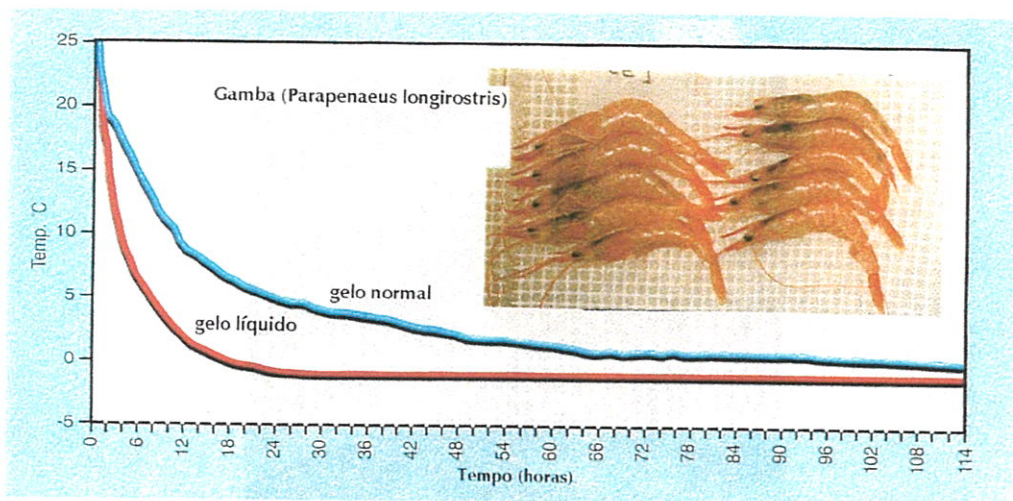


Figura 4 - Evolução da temperatura de gamba (*Parapenaeus longirostris*) ao longo da armazenagem em gelo líquido e em gelo em escama.

Tabela 2 – Comparação das vantagens do gelo líquido face ao gelo em escama.

| <i>Gelo em Escama</i>   | <i>Gelo Líquido</i>  |
|---|--|
| As escamas podem danificar o pescado                          | Envolve e protege o pescado  |
| O arrefecimento é lento                                       | O arrefecimento é imediato e uniforme  |
| A temperatura do pescado não é uniforme                       | Todo o pescado é mantido à mesma temperatura                                   |
| O pescado é desidratado                                       | Mantém a hidratação e os sais naturais do pescado                              |
| Provoca perdas de peso e de sabor                             | Mantém o peso e o sabor dos produtos   |
| O pescado mostra sinais de flacidez e de brandura             | Mantém a dureza e a solidez do pescado fresco                                  |
| Em certas espécies requer o apoio de conservantes             | Não requer conservantes nem outros produtos                                    |
| Baixa transferência térmica ( $190 \text{ W m}^2/\text{°C}$ ) | Elevada transferência térmica ( $7.000\text{-}9.000 \text{ W m}^2/\text{°C}$ ) |
| A fusão é muito lenta ao contacto inicial                     | A fusão é imediata ao contacto inicial   |
| A fusão é rápida após 24 h                                    | Após arrefecimento do pescado a fusão é muito lenta                            |



Figura 5 - Aspecto dos olhos de dourada 24 h após o abate com gelo líquido e com gelo em escama.

# BACALHAU: QUALIDADE E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

Pedro, S\*.; Rodrigues, M. J.; Nunes, M. L.; Albuquerque, M. M.; Batista, I.  
Instituto de Investigação das Pescas e do Mar; DITVPP;  
Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa; \*e-mail: spedro@ipimar.pt

---

## 1. ASPECTOS GENÉRICOS

O peixe salgado seco, e em particular o bacalhau, é um dos alimentos mais apreciados pelos portugueses, caracterizado por um sabor e textura particulares e por um longo período de conservação. No entanto, embora o consumo de bacalhau salgado seco tenha uma longa tradição, a necessidade de uma preparação (demolha) prévia durante 1 a 2 dias torna-o pouco adequado ao estilo de vida moderno. Assim, têm surgido no mercado produtos prontos a cozinhar ou utilizar, à base de bacalhau demolido. Contudo, estes produtos são frequentemente bastante diferentes dos caseiros, apresentando alguns problemas de qualidade, provavelmente relacionados com o método de demolha e consequentes condições de armazenagem.

## 2. VALOR NUTRICIONAL

O bacalhau fresco é uma espécie magra com teores médios de gordura inferiores a 1% e um valor proteico entre 18 e 19%, enquanto que as percentagens de água e substâncias minerais se situam, respectivamente, ao redor de 80 e 1,4% (Ferreira e Graça, 1963). No processo de salga e seca tem lugar uma absorção de sal e uma considerável perda de água, originando um produto salgado com um teor proteico relativamente elevado. As características químicas e sensoriais do produto final são condicionadas não só pelos processos de salga e seca, mas também pelo tipo de sal e qualidade intrínseca da matéria prima.

A composição química média deste tipo de produto apresenta-se no Quadro 1 (Ferreira e Graça, 1963). Os teores em humidade e cloretos são, destes parâmetros, os que determinam a comercialização do bacalhau salgado seco, variando entre 41,00-46,30% e 17,00-20,05 (gNaCl/100g) na década de 50, tal como apresentado por

Ferreira (1953) e entre 40,20-50,30% e 17,00-20,05 (gNaCl/100g) na década de 90 (resultados não publicados).

Quadro 1 - Principais constituintes (g/100 g de parte edível) e valor energético (kcal/100 g).

| Origem     | Água | Proteína | Gordura | Cloretos em NaCl | Cinza total | Valor energético |
|------------|------|----------|---------|------------------|-------------|------------------|
| Islândia   | 41,2 | 39,7     | 0,5     | 16,30            | 18,52       | 164              |
| Nacional   | 42,6 | 34,7     | 0,5     | 17,42            | 19,65       | 143              |
| Noruega    | 41,0 | 37,6     | 0,6     | 18,70            | 20,29       | 155              |
| Terra Nova | 40,0 | 43,1     | 0,7     | 14,43            | 16,60       | 179              |

Ainda de acordo com Ferreira e Graça (1963), os níveis de cálcio, fósforo, ferro e cobre em bacalhau nacional salgado seco são, respectivamente, 73, 225, 2,0 e 0,1 mg/100g. Os teores de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> são 160 e 42 µg/100g enquanto que o da PP se situa em cerca de 1,2 mg/100g.

### 3. PARÂMETROS QUÍMICOS

O bacalhau utilizado na salga/seca deve apresentar bom grau de frescura, com níveis de ABVT inferiores a 25 mgN/100g (Decisão 95/149/CE, 1995) e cumprir os limites quanto aos teores em metais pesados, podendo apresentar um teor máximo de mercúrio de 0,5 mg/kg de peixe (0,5 ppm), de cádmio entre 0,05 e 0,1 ppm e de chumbo entre 0,2 e 0,4 ppm (Regulamento (CE) nº 466/2001, 2001). No que respeita ao bacalhau salgado, verde ou seco, deve apresentar um teor em sal compreendido entre 16 e 20% (expresso em cloreto de sódio). O teor de humidade no bacalhau salgado verde deve estar compreendido entre 51 e 58%, enquanto no bacalhau salgado seco os teores de humidade devem ser iguais ou inferiores a 46% (para peixe a granel) e iguais ou inferiores a 47% (para peixe pré-embalado) (IPCP, 1991; IPQ, 1990).

#### 4. ESPÉCIES UTILIZADAS

Considera-se bacalhau salgado seco o produto preparado exclusivamente a partir da espécie *Gadus morhua* L. e das sub-espécies *Gadus morhua morhua ogac* e *Gadus morhua macrocephalus*. Os produtos apresentados demolhados, desfiados ou à posta devem indicar a espécie utilizada, podendo a sua autenticidade ser verificada por comparação dos perfis de distribuição das proteínas obtidos por electroforese. Consideram-se espécies afins salgadas secas os produtos preparados exclusivamente a partir de uma das seguintes espécies: *Phycis blennoides* (abrótea-do-alto), *Melanogrammus aeglefinus* (alecrim), *Pollachius virens* (escamudo), *Molva molva* (lingue), *Pollachius pollachius* (paloco) ou *Brosme brosme* (zarbo).

#### 5. CLASSIFICAÇÃO

A classificação do bacalhau salgado seco é feita quanto à qualidade (presença de defeitos) e ao peso unitário (tipo comercial). No que respeita à qualidade, o bacalhau pode ser classificado em primeira ou em segunda categoria. Em relação ao tipo comercial, o bacalhau pode ser subdividido em sete classes: especial, graúdo, crescido, corrente, miúdo, sortido grande e sortido pequeno. Os defeitos classificam-se em: defeitos de preparação, conservação e apresentação. Consideram-se defeitos de preparação, a escala incompleta ou defeituosa, a presença de fendas ou manchas de fígado, o “queimado” ou “melado” e a deficiência de salga. Como defeitos de conservação engloba-se o “vermelho”, o “empoado”, um cheiro nitidamente desagradável, colorações anormais e o “ressoado”. Finalmente, os defeitos de apresentação dizem respeito à presença de corpos estranhos ou de parasitas.

#### 6. PARASITAS

O bacalhau pode ser hospedeiro de várias espécies de parasitas que podem causar doença no Homem, sendo as mais frequentes o *Anisakis simplex*, *Contracaecum osculatum*, *Hysterothylacium auctum* e *Pseudoterranova decipiens*. A sua distribuição varia com o local de captura, dependendo da espécie e respectivo ciclo de vida (Myjak *et al.*, 1994). Em Portugal, num estudo recente (Ramos, 1998) sobre a presença de parasitas em bacalhau salgado seco, refere-se que apenas 12

exemplares dos 88 analisados se encontravam não parasitados, sendo a serosa peritoneal o local preferencial de localização dos parasitas.

No que respeita à sobrevivência dos parasitas, verificou-se que larvas de nemátodes sobrevivem 28 dias em salmoura com teores de sal de 21% (FDA, 1998). No entanto, a utilização de matéria-prima congelada a uma temperatura de -20°C durante 24 horas leva à inactivação dos nemátodes (Huss, 1994). Nesta medida, o bacalhau salgado seco não deve representar risco de infestação para o consumidor pois que, frequentemente, é produzido a partir de bacalhau congelado, além de sofrer uma salga prolongada e um processo de desidratação que criam condições adversas para a sobrevivência dos parasitas. Acresce ainda referir que o bacalhau é consumido, habitualmente, após um tratamento térmico, sabendo-se, por outro lado, que o aquecimento durante 1 minuto a 55°C leva à inactivação de todos os nemátodes (Huss, 1994). No entanto, a presença de parasitas mortos no bacalhau tem sido associada a diversas manifestações alérgicas no Homem (Fernández de Corres *et al.*, 1996). As principais manifestações clínicas incluem: sintomas digestivos, broncoespasmo, hipotensão/síncope, anafilaxia generalizada e sintomas cutâneos e reumáticos (Berasategui, com. pess.).

## 7. MICRORGANISMOS

O pescado salgado pode ser portador de elevado número de microrganismos degradativos halófilos, que apresentam um crescimento óptimo na presença de NaCl ou outros electrólitos. De entre estes microrganismos destacam-se as bactérias agentes do “vermelho”, que causam o avermelhamento do produto, e os bolores agentes do “empoado”, que levam ao aparecimento de pequenos pontos castanho-escuros. Estas alterações contribuem para a desvalorização comercial do produto, devendo os seus teores ser  $\leq 10^3/g$  (Ribeiro, 1974). Ainda segundo este autor, tanto o teor em microrganismos mesófilos como em bolores e leveduras deve ser  $\leq 10^5/g$  de produto.

É prática corrente detectar e/ou quantificar um grupo de bactérias, cujo habitat é o intestino e que aí existem em considerável número, como indicadores da exposição a condições prováveis de contaminação fecal e, conseqüentemente, da possível

presença de microrganismos patogénicos. Os organismos normalmente utilizados no pescado como indicadores são os coliformes fecais, a *Escherichia coli*, os enterococos e os esporos de clostrídios sulfito redutores. Devido à elevada sobrevivência dos esporos de clostrídios sulfito redutores, este parâmetro será o mais interessante para determinar em pescado salgado, sendo o respectivo limite de  $10^2/g$  (Ribeiro, 1974). Os microrganismos patogénicos e/ou toxinogénicos que poderão sobreviver neste tipo de produtos são, fundamentalmente, os que possuem características de halotolerância. Segundo as normas bacteriológicas de peixe salgado apresentadas por Ribeiro em 1974, a *Salmonella* deve estar ausente em 25g e os estafilococos coagulase positiva devem estar ausentes em 2 g de produto. Em estudos realizados com bacalhau salgado seco verificou-se a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em 24% das amostras analisadas e a ausência de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* em todas as amostras. Os teores aproximados de *S. aureus* variaram entre 10 e 100 microrganismos/g (Monraia, 1997). A presença de *S. aureus* é devida, principalmente, a contaminação pelos operadores dado que se encontra nas vias respiratórias superiores, na pele, nos cabelos e unhas do Homem. Em condições favoráveis produz nos produtos alimentares um certo número de enterotoxinas, as quais podem provocar intoxicações nos consumidores. Estas toxinas são, em geral, muito resistentes a enzimas proteolíticas e ao calor (100 °C, 1 hora). Os sintomas habituais, que podem aparecer entre 2 a 4 horas após o consumo de produtos contaminados, incluem náuseas, vómitos e, por vezes, diarreia.

De um modo geral, pode considerar-se que o bacalhau salgado seco é um produto que não representa risco para a saúde. No entanto, os microrganismos nele presentes, cujo desenvolvimento se encontra inibido devido à baixa actividade da água e ao elevado teor em sal, encontram condições potencialmente propícias ao seu desenvolvimento quando este produto é submetido a demolha. Para evitar a provável proliferação de microrganismos durante este processo é recomendável que esta seja realizada em ambiente refrigerado e com boas condições higiénicas. Na ausência de padrões bacteriológicos para bacalhau demolhado, poder-se-ão considerar os limites internacionais para pescado cru, a seguir enunciados: microrganismos mesófilos totais

$\leq 5 \times 10^5/\text{g}$ , *E. coli*  $\leq 10/\text{g}$ , *Salmonella* ausente em 25 g, *Vibrio parahaemolyticus*  $\leq 10^2/\text{g}$  e *Staphylococcus aureus*  $\leq 10^3/\text{g}$  (ICMSF, 1986).

## 8. INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

Ultimamente, têm-se registado no sector da produção de bacalhau salgado seco várias tentativas de inovação tecnológica ao nível da salga e da demolha, fundamentalmente, para a obtenção de produtos mais saudáveis e prontos a cozinhar. Paralelamente, os efluentes deste sector apresentam a particularidade de possuírem elevados teores em sal o que dificulta a degradação da matéria orgânica presente. O problema do tratamento dos efluentes ganha maior acuidade ao ter-se em consideração as crescentes exigências da legislação ambiental.

Tem-se registado, recentemente, uma tendência para a substituição parcial do cloreto de sódio por outros sais, devido às preocupações crescentes dos efeitos negativos do sódio na saúde, que tem sido associado à hipertensão. Neste sentido, tem-se utilizado misturas de NaCl/KCl em produtos curados, dando origem a uma redução de 30% no teor final de sódio no produto (Pilkington e Allen, 1994). Todavia, o uso de misturas de sais pode ter implicações nas características organolépticas do produto e ainda no rendimento do processo. Paralelamente, têm sido ensaiadas várias técnicas de salga rápida, entre as quais se destaca a aplicação de vácuo (Campos *et al.*, 1993).

A demolha tradicional do bacalhau é uma operação relativamente empírica realizada antes da preparação culinária, demorando um a dois dias. Como alternativa, tem sido testada a utilização de vácuo (Akse *et al.*, 2000; Rodriguez-Barona *et al.*, 2000) no sentido de acelerar o processo, melhorar o rendimento e contribuir para uma menor carga microbiana. Por outro lado, tem-se procurado utilizar bacalhau salgado verde como matéria prima para a demolha no sentido de diminuir os custos e encurtar o processo de fabrico. No entanto, os produtos obtidos a partir desta matéria prima podem apresentar maior carga microbiana, assim como características organolépticas diferentes das esperadas neste tipo de produto, nomeadamente textura e sabor.

O bacalhau demolhado, ao contrário do bacalhau salgado seco, é um produto que se deteriora facilmente, tornando-se necessário recorrer a diferentes métodos de

conservação de forma a prolongar a sua estabilidade e a garantir a segurança do produto. Neste contexto, tem-se recorrido à aplicação de vários aditivos tais como sorbatos e polifosfatos, imediatamente após a demolha, com o objectivo de inibir o desenvolvimento microbiano e melhorar as características organolépticas. Outra forma de obviar a rápida deterioração do bacalhau demolhado consiste na utilização de tratamentos térmicos convencionais ou de radiação por microondas (Fernandez-Segovia *et al.*, 2000) que levam a uma diminuição da carga microbiana. O facto da maioria dos microrganismos necessitarem de oxigénio para o seu desenvolvimento tem levado à utilização de diferentes tipos de embalagem que modificam o ar que envolve o produto. Assim, utilizam-se embalagens a vácuo ou com atmosferas modificadas, em que nestas últimas o ar é substituído por misturas gasosas ricas em dióxido de carbono e deficientes em oxigénio. No entanto, as estratégias de conservação referidas não são, por si só, suficientes para garantir a estabilidade e segurança do produto, devendo associar-se o abaixamento da temperatura de armazenagem para níveis de refrigeração. Porém, o recurso a temperaturas de congelação permite assegurar a salubridade e conservação do produto por longos períodos.

Finalmente, é de salientar que é possível combinar a utilização de mais de dois métodos de conservação, constituindo assim barreiras adicionais ao desenvolvimento microbiano.

## **9. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A qualidade alimentar do bacalhau salgado seco advém, fundamentalmente, do seu elevado teor proteico e depende dos teores de humidade e sal que asseguram a inibição do desenvolvimento da maioria dos microrganismos. A implementação de boas práticas de fabrico, incluindo regras de higiene, é determinante para a qualidade final deste produto e dos produtos demolhados. Para a sua avaliação é imprescindível a realização de controlos microbiológicos, cuja utilização apresenta grandes limitações, devido não só à morosidade na obtenção de resultados como também à restrição da actuação apenas ao nível do produto final. Assim, torna-se importante a adopção de uma filosofia preventiva (como o sistema HACCP), permitindo a

implementação de medidas adequadas à minimização dos riscos, após análise dos perigos para cada ponto de controlo crítico do processo produtivo.

Por outro lado, a facilidade de preparação dos alimentos começa a ganhar mais importância, dadas as novas necessidades dos consumidores, cada vez com menor disponibilidade de tempo para preparar e confeccionar alimentos. Nesta medida, a apresentação de produtos já desfiados e/ou demolhados, prontos a cozinhar ou utilizar, poderá dar resposta a estas necessidades. No entanto, estes produtos só terão sucesso se ganharem a confiança dos consumidores ao apresentarem uma boa relação qualidade/preço e um período de conservação razoável.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSE, L.; PRYTZ, K.; JOENSEN, S.; GALLART, L.; CARLEHÖG, M.; EILERTSEN, G.; SKJERDAL, T., 2000. New Methods for Desalting of Bacalao. Poster apresentado na 30ª Reunião da WEFTA, Ilhas Faroe.
- CAMPOS, E. I.; SERRA, J.; FITO, P., 1993. Estudio de la deshidratación osmótica a vacío en truchas (*Salmo gairdneri*) cultivadas. In Anales de Investigación del Master en Ciencia e Ingeniería de Alimentos. P. Fito, J. Serra, E. Hernandez, D. Vidal (eds). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. pp. 493-509.
- CE, 95/149/CE Decisão da Comissão de 8 de Março de 1995 que fixa os valores limite de azoto básico volátil total (ABVT) para determinadas categorias de produtos da pesca e os métodos de análise a utilizar. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº L 97 de 29.04.95.
- CE, 466/2001 Regulamento da Comissão de 8 de Março de 2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº L 77 de 16.03.2001.
- FDA, 1998. Parasites. Ch. 5. In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide, 2<sup>nd</sup> ed., 59-64. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC.

- FERNÁNDEZ DE CORRES, L.; AUDÍCANA, M.; DEL POZO, M. D.; MUÑOZ, D.; FERNÁNDEZ, E.; NAVARRO, J. A.; GARCÍA, M.; DÍEZ, J., 1996. *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: Report on 28 cases of allergy caused by this nematode. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 6 (5): 315-319.
- FERNANDEZ-SEGOVIA, I. ; ESCRICHE, I.; ANDRÉS, A.; ALAPONT, E.; DOMENECH, E.; BARAT, J. M.; SERRA, J. A., 2000. Effects of Microwave radiation and Conventional Thermal Treatments on the Microbial Growth of Cooled Desalted Raw Cod (*Gadus morhua*). Poster apresentado na 30ª Reunião da WEFTA, Ilhas Faroe.
- FERREIRA, F.A.G., 1953. Contribuição para o Estudo Químico do Bacalhau. Comissão Reguladora do Comércio de Bacalhau. Ministério da Economia. 31p.
- FERREIRA, F.A.G.; GRAÇA, M.E.S., 1963. Tabela da Composição dos Alimentos Portugueses. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Lisboa-Porto), 2ª ed., 186 p.
- HUSS, H. H., 1994. Assurance of Seafood Quality. FAO Fisheries Technical Paper 334, Rome. 169 p.
- ICMSF, 1986. Sampling plans for fish and shellfish. *In: Microorganisms in Foods. Sampling for microbiological analysis: principles and applications*, vol 2, 2<sup>nd</sup> ed., 181-202. Roberts, T.A., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Kilsby, D.; Olson Jr., J.C., Silliker, J.H., Eds. Blackwell Scientific Publications. University of Toronto Press, Canada.
- IPCP, 1991. Classificação e Parâmetros de Qualidade: Bacalhau (e Espécies Afins) Salgado, Verde ou Seco. *Cadernos de Normalização* Nº 2. Instituto Português de Conservas e Pescado. 14p.
- IPQ, 1990. NP 3357. Peixe salgado seco. Bacalhau e afins. Definição e preparação. Instituto Português da Qualidade. 5 p.
- MONRAIA, C., 1997. Caracterização da Flora Microbiológica de Bacalhau Salgado Seco. *Revista Portuguesa de Nutrição*. Vol. VII (3): 45-52.
- MYJAK, P.; SZOSTAKOWSKA, B.; WOJCIECHOWSKI, J.; PIETKIEWICZ, H., ROKICKI, J., 1994. Anisakid larvae in cod from the southern Baltic Sea. *Arch. Fish. Mar. Res.*, 42 (2): 149-161.

- PILKINGTON, D. H.; ALLEN, J. C., 1994. Substitution of Potassium Chloride for Sodium Chloride in Commercially-Produced Dry-Cured Hams. *J. Food Prot.*, 57 (9): 792-795, 801.
- RAMOS, P., 1998. *Anisakis* sp.: Risco para a Saúde Pública? *Veterinária Técnica*, 3: 30-41.
- RIBEIRO, A.M.R., 1974. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 5 (1): 17-25.
- RODRIGUEZ-BARONA, S.; ANDRÉS, A.; JIMÉNEZ-AMOR, F.; ESCRICHE, I.; FITO, P.; BARAT, J. M., 2000. Liquid Phase Retention during Cod Desalting. Effect of Vacuum Impregnation. Poster apresentado na 30ª Reunião da WEFTA, Ilhas Faroe.

# APROVEITAMENTO DE DESPERDÍCIOS E APLICAÇÃO DE TECNOLOGIAS LIMPAS NO SECTOR DA PESCA

Maria Leonor Nunes e Irineu Batista

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

Avenida de Brasília, 1449-006 LISBOA

[mlnunes@ipimar.pt](mailto:mlnunes@ipimar.pt)

---

## RESUMO

Os produtos da pesca e aquicultura compreendem um elevado número de espécies que são objecto de distintas utilizações, de acordo com a sua maior ou menor abundância e hábitos de consumo. Embora a comercialização de pescado inteiro fresco/refrigerado seja ainda uma prática corrente, verifica-se uma tendência crescente para a procura de produtos pré-preparados ou mesmo prontos a cozinhar. Neste sentido, uma maior intervenção do sector produtivo nas áreas da conservação e processamento vai, necessariamente, gerar quantidades significativas de desperdícios cuja eliminação constitui um problema adicional para o industrial, frequentemente de difícil solução. Paralelamente, é também conhecido que os produtos da pesca e aquicultura são mais perecíveis que outros produtos alimentares o que concorre para aumentar o volume de desperdícios.

Para além deste problema, é de salientar que as indústrias de processamento de pescado são muito exigentes em termos de consumos de água, de que resultam quantidades consideráveis de efluentes com elevadas cargas de material orgânico. Nesta medida, os sectores de transformação dos produtos da pesca e aquicultura não podem continuar a ser geridos apenas em moldes tradicionais, sendo absolutamente indispensável o seu enquadramento numa política de gestão do consumo de água e redução do seu impacte ambiental.

Assim, é objectivo deste trabalho dar a conhecer não só alternativas para a valorização de desperdícios de pescado, mas também a aplicação de tecnologias

limpas nas empresas de processamento de pescado como forma de diminuir o consumo de água e reduzir o volume de efluentes.

## INTRODUÇÃO

Os produtos da pesca e aquicultura compreendem um elevado número de espécies que são objecto de distintas utilizações de acordo com a maior ou menor abundância, exigências dos mercados e hábitos de consumo. De acordo com a FAO (2000), a produção a nível mundial registou, entre 1961 e 1998, um crescimento médio das capturas de 3,6 %/ano, tendo estabilizado ao redor de 120 milhões de toneladas/ano e, por seu lado, o consumo anual aparente *per capita* variou no mesmo período entre 9 e 16 kg. A percentagem de pescado destinada a utilizações não alimentares tem-se situado, nos últimos anos, em cerca de 20 milhões de toneladas e o restante é comercializado inteiro em fresco (cerca de 38% do pescado desembarcado) ou sujeito a processamento industrial em que os produtos finais são variados, destacando-se, entre outros, os congelados, enlatados, salgados, secos, marinados e fumados.

Das cerca de 60 milhões de toneladas encaminhadas para produções industriais resultam desperdícios cujo total está estimado pela FAO (2000) em 20 milhões de toneladas. O facto das unidades de processamento se encontrarem normalmente dispersas, embora perto dos principais locais de descarga da matéria prima e terem escalas variáveis de produção, por vezes com fabricos sazonais, leva a que o seu aproveitamento industrial nem sempre seja possível. A maior parte das operações é efectuada em terra, todavia algumas empresas preferem o fabrico a bordo no sentido de evitarem reprocessamentos posteriores. Algumas operações estão mecanizadas, contudo algumas são ainda manuais. De entre as principais espécies processadas destacam-se o bacalhau, atuns, pescadas e pequenos pelágicos.

Os processos tecnológicos mais frequentes no âmbito da indústria de processamento de pescado – descongelação, descabeçamento, evisceração, corte em postas, filetagem - são muito exigentes em termos de consumos de água de que resulta a produção de quantidades consideráveis de efluentes. Estes contêm elevados níveis de

matéria orgânica, em regra mais elevados no caso de espécies gordas, devido à presença de proteínas, gordura e sólidos em suspensão.

Tal facto apresenta não só custos económicos, mas sobretudo ambientais pelo que é indispensável que, mais do que uma atitude reactiva, seja adoptada uma postura pró-activa que tenha em conta estes condicionalismos e adopte modelos mais ajustados à sua actividade industrial através da procura de soluções, quer para aproveitamento de desperdícios quer em termos de redução dos consumos de água e do impacte ambiental.

### **APROVEITAMENTO DE DESPERDÍCIOS DE PESCADO**

Os produtos da pesca deterioram-se mais rapidamente do que outros alimentos em virtude do seu habitat natural, das condições de manuseamento e conservação e ainda das características bioquímicas intrínsecas, pelo que as rejeições ao longo do circuito, que vai desde a captura até ao processamento, podem ser elevadas. Por outro lado, do fabrico dos vários produtos fazem parte operações, nomeadamente evisceração, descabeçamento, corte em postas e filetagem de que resultam desperdícios que podem atingir 60 %, como se ilustra na figura 1, para a filetagem de espécies magras. Na filetagem de peixe gordo, o volume de desperdícios estima-se em 40-50% e na produção de conservas oscila entre 30-40 %. Estes são constituídos essencialmente, por peixe rejeitado, cabeças, vísceras, espinhas e pele nos quais os compostos azotados e os lípidos são os principais constituintes bioquímicos. Tradicionalmente, este material era encaminhado para a produção de farinhas e óleos de peixe, todavia, em muitos países, o número destas unidades tem vindo a diminuir, pelo que este tipo de desperdícios é frequentemente encaminhado para lixeiras ou aterros.

Os resultados obtidos no Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca (DITVPP), do IPIMAR, no âmbito de projectos sobre valorização de produtos da pesca e de desperdícios das unidades de processamento, sugerem que a recuperação de proteínas e lípidos através da produção de hidrolisados proteicos e de concentrados lipídicos, respectivamente, bem como a

extracção de colagénio e enzimas que apresentam, em regra, um elevado valor comercial, são alternativas possíveis para o aproveitamento destes desperdícios.

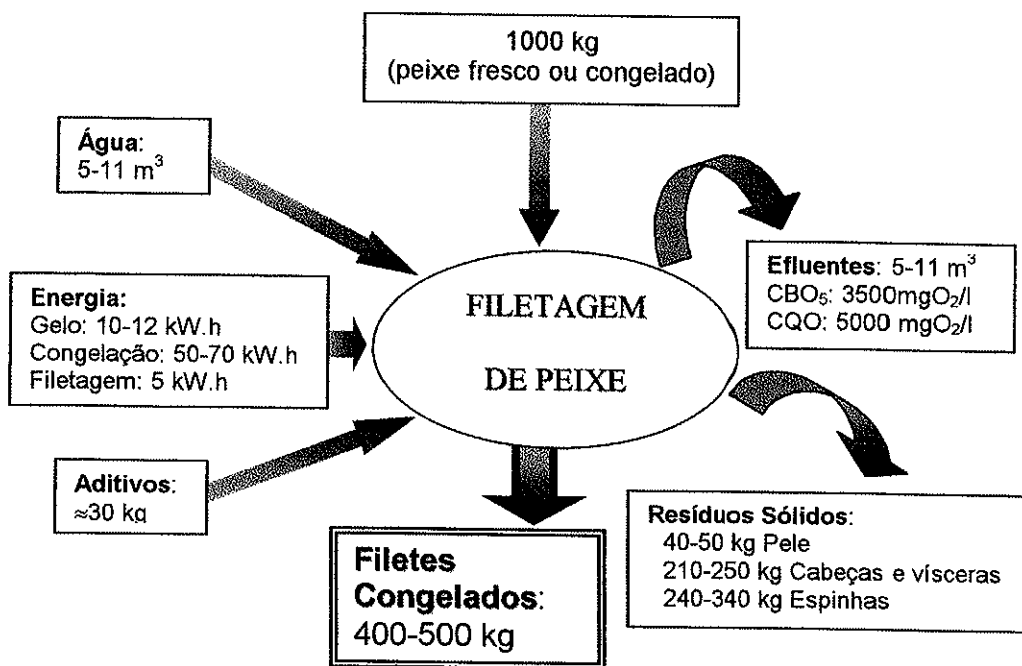


Figura 1. Valores médios usuais de consumos de água e de energia, produção de desperdícios e características químicas dos efluentes em unidades de filetagem de peixe magro (Adaptado de UNEP e DEPA, 2000).

### *Hidrolisados proteicos*

Os hidrolisados proteicos resultam da hidrólise das proteínas por via química ou enzimática. As suas propriedades são distintas das proteínas uma vez que os péptidos e aminoácidos apresentam grande solubilidade na água, não sendo termo-coaguláveis. Estes compostos apresentam actividade biológica (Fouchereau-Peron *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 2001; Ravallec-Plé *et al.*, 2001; Bordenave *et al.*, 2002) e propriedades nutricionais distintas das proteínas dado que são mais facilmente absorvidos e/ou metabolizados pelos animais.

Estes produtos podem ser usados como suplemento na alimentação animal, sobretudo de peixes na fase juvenil, pelo facto de se tratar de material muito digerido e incluir moléculas susceptíveis de actuar como factores de crescimento uma vez que

podem aumentar a secreção de enzimas ao nível do tracto digestivo. Por outro lado, podem aumentar a produção de macrófagos e ainda funcionar como imunoestimulantes, sobretudo nos primeiros estádios de desenvolvimento destes animais, altura em que o seu sistema imunológico está pouco desenvolvido.

Uma outra utilização possível é como fonte de azoto em meios de cultura bacterianos, em particular para pesquisa e identificação de *Vibrio* e *Lactobacilos* (Batista e Nunes, 1997; Pedro *et al.*, 2000).

### *Colagénio*

Esta proteína, uma glico-proteína do tecido conjuntivo, encontra-se não só no músculo dos peixes ósseos (2 a 5%) e cartilagíneos (cerca de 11%), mas sobretudo na pele onde pode atingir valores superiores a 30%. Embora presente em pequenas percentagens, o colagénio tem características físico-químicas e bioquímicas que o tornam especialmente indicado para algumas aplicações, em particular na indústria alimentar, sob a forma de gelatina.

### *Proteases*

Nos organismos marinhos encontram-se enzimas com características muito distintas das provenientes de animais terrestres ou de microrganismos, em virtude da grande diversidade de espécies adaptadas a habitats muito distintos. De entre estas, destacam-se as proteases (Batista e Pires, 2002) pelas aplicações específicas que podem ter na indústria alimentar.

Apesar da utilização destas enzimas ser ainda limitada, é possível realçar algumas aplicações na indústria do pescado. Assim, têm sido usadas para eliminar o tecido conjuntivo do saco das ovas para a produção de caviar e sucedâneos, despelagem de lula, peixe inteiro ou filetes, eliminação de escamas em filetes com pele e também na produção de molhos de peixe.

### *Concentrados de ácidos gordos*

Os lípidos do pescado são constituídos, maioritariamente, por ácidos gordos polinsaturados de elevado peso molecular, alguns dos quais do tipo  $\omega 3$  cuja

importância na nutrição humana e na prevenção de doenças cardiovasculares foi reconhecida há já algum tempo. Tal facto tem levado à recomendação da suplementação da dieta alimentar com estes compostos, nomeadamente sob a forma de concentrados de  $\omega 3$  os quais podem ser obtidos a partir de óleos de peixe por via química ou enzimática (Bandarra *et al.*, 2000). A experiência adquirida sugere que esta última via poderá ser mais interessante.

No mercado existem já vários produtos sob a forma de cápsulas, especialmente de óleos de salmão e de fígado de bacalhau e alabote pelo que a produção de encapsulados com óleos de outras espécies, desde que ricos em  $\omega 3$ , parece promissora.

## **APLICAÇÃO DE TECNOLOGIAS LIMPAS NO SECTOR DA PESCA**

As questões associadas ao uso dos recursos hídricos suscitam preocupações crescentes uma vez que a água própria para consumo é um bem cada vez mais escasso. Assim, os elevados consumos de água por parte da indústria, nomeadamente do sector da pesca, têm que ser encarados de uma forma crítica no que respeita à avaliação das necessidades e à formulação de uma utilização mais racional, tanto mais que é expectável que o seu custo para as unidades industriais venha a sofrer aumentos significativos. A maior parte desta água é eliminada como efluente, contendo elevadas cargas de material orgânico que, cada vez mais constituem um factor a ter em conta na competitividade e sustentabilidade das empresas. Por outro lado, está prevista legislação europeia que estabelecerá procedimentos e limites estritos no que respeita, em particular, ao tratamento de efluentes, recolha de desperdícios sólidos e emissões gasosas.

Uma abordagem inovadora, leva necessariamente, à aplicação de tecnologias limpas e ao desenvolvimento e implementação de Sistemas de Gestão Ambiental (SGA) que exigem a redução e racionalização dos consumos de água, a procura de soluções mais eficazes, quer no encaminhamento de resíduos sólidos tipo urbano, incluindo os desperdícios de peixe, quer no tratamento de efluentes. Nestas indústrias, as quantidades de resíduos sólidos, designados como perigosos, essencialmente óleos minerais, lubrificantes e fluidos refrigerantes, são reduzidas.

O conceito de tecnologias limpas, concepção que pode ser definida como “... aplicação contínua a processos, produtos e serviços, de uma estratégia ambiental integrada e preventiva no sentido de aumentar a eficiência global e diminuir os riscos para o Homem e para o ambiente...”, baseia-se numa filosofia pró-activa enquanto que o controlo ambiental tradicional se apoia numa avaliação reactiva após os acontecimentos (Proença *et al.*, 2001).

Na implementação de tecnologias limpas estão compreendidos aspectos que podem ir desde a gestão de materiais, eliminação de resíduos, redução de desperdícios, efluentes e emissões gasosas até ao melhoramento de práticas de fabrico ou mesmo lançamento de novos produtos, muito embora a eliminação de resíduos sólidos, a redução dos consumos de água e a minimização do volume e carga orgânica dos efluentes sejam os aspectos fundamentais. Todavia, a aplicação deste tipo de tecnologia não evita, obviamente, o tratamento posterior das descargas, havendo que recorrer, de acordo com o tipo, carga e volume à correcção do pH, separação de sólidos, tratamento biológico aeróbio ou anaeróbio, filtração por membranas, etc.

A experiência adquirida no âmbito do desenvolvimento de um projecto a nível europeu (Projecto ECOMAN), em que intervieram institutos de investigação e empresas da Finlândia (produtos fumados e marinados), França (produtos congelados), Espanha (conservas de atum) e Portugal (conservas de sardinha), mostrou, de forma inequívoca, que a aplicação de tecnologias limpas exige formação adequada de todo o pessoal da empresa, incluindo o que não está directamente ligado à produção, procedimentos bem estruturados no que respeita a operações e funcionamento de equipamentos, identificação de todas as condutas de água e canalizações de efluentes.

### *Resíduos sólidos tipo urbano*

Estes constituem, em volume, a principal corrente de resíduos gerada pela maior parte das empresas de processamento de produtos da pesca. Entre estes salientam-se resíduos de peixe e materiais de plástico (películas, recipientes, embalagens, etc.), cartão e metal (por exemplo alumínio nas conserveiras), sal, madeira, sólidos e óleo de peixe bem como de fossas assépticas. São normalmente

recolhidos pelos Municípios, muito embora possa haver o envolvimento de terceiros que façam recolhas selectivas, sobretudo quando a reciclagem é possível ou interessante sob o ponto de vista económico, caso de “paletes” de madeira, plástico e cartão. No contexto da aplicação de tecnologias limpas é indispensável a segregação por tipo de produto e a compactação a fim de facilitar a gestão posterior deste tipo de resíduos. Os resíduos de matéria prima, quando não encaminhados para unidades de farinação ou de rações, são também usualmente recolhidos como resíduo tipo urbano.

### *Consumos de água*

A água é usada na produção de vapor, preparação de salmoura, lavagem e transporte de matérias primas, limpeza de equipamento e das áreas de trabalho e ainda arrastamento de desperdícios sólidos. As taxas de consumo de água variam em função da escala de produção, tipo de matéria prima e processamento, nível de automatização e maior ou menor facilidade de limpeza e higienização. Os resultados obtidos no contexto do projecto atrás mencionado indicam que, em regra, as unidades cujo fabrico se baseia no processamento de matéria prima congelada são mais exigentes em relação a gastos de água. Em geral, os consumos situam-se em cerca de 5-11 m<sup>3</sup>/ton de matéria prima nas unidades de filetagem e de 10-15 m<sup>3</sup>/ton de matéria prima nas unidades de produção de conservas, como se ilustra nas figuras 1 e 2. Há, no entanto, outras que são muito mais exigentes, entre as quais se destacam as unidades de processamento de crustáceos e de moluscos bivalves, sobretudo as que produzem produtos tipo miolo, em que os consumos podem atingir mais de 70 m<sup>3</sup>/ton de matéria prima.

As estratégias a adoptar para reduzir os consumos de água envolvem novas soluções tecnológicas ou alterações e/ou aquisições de equipamento, sendo de privilegiar, sempre que possível, as primeiras. Para tal é indispensável dispor de um diagrama de fluxo que identifique, detalhadamente, as várias operações do processo, as entradas de matéria prima e restantes materiais e as saídas de produto final e dos diversos tipos de efluente e desperdícios, bem como as operações auxiliares (por exemplo, preparação de salmoura, água clorada e produção de vapor) e de limpeza (diárias e semanais) de material, equipamento e instalações, sendo ainda indispensável

que a cada operação esteja associado um balanço de massas, como se ilustra na figura 3 para a operação de cozedura e arrefecimento de sardinha no âmbito da produção de conservas (Proença *et al.*, 2001).

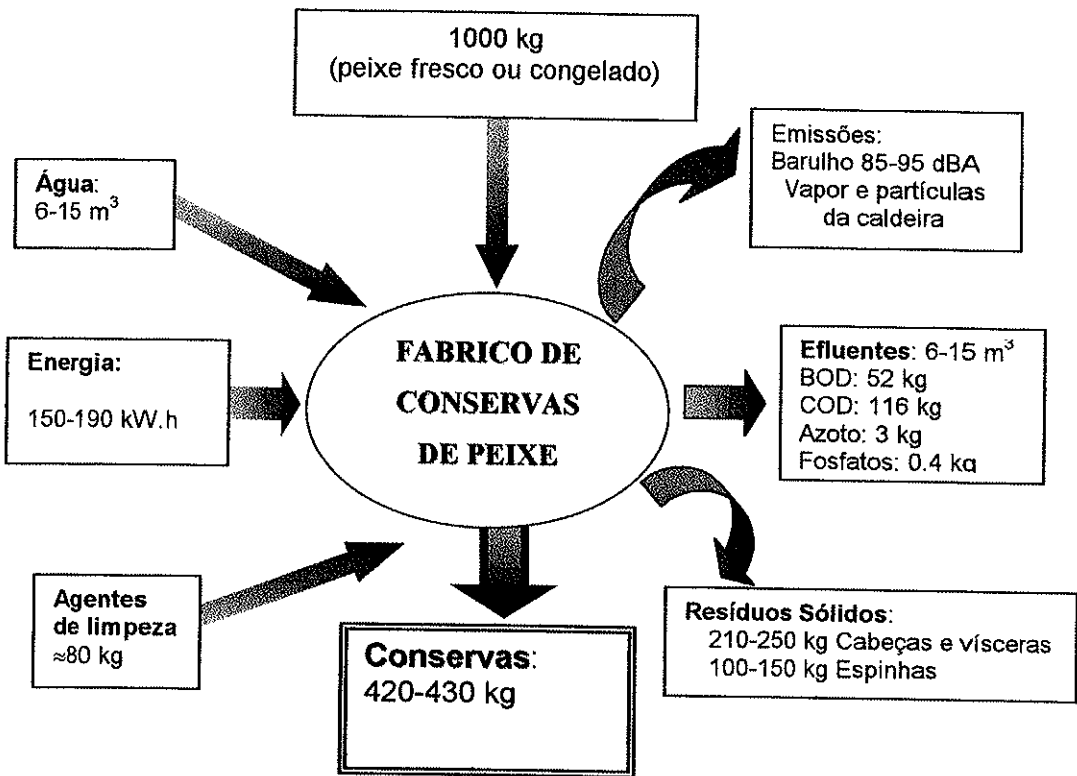


Figura 2. Valores médios usuais de consumos de água e de energia, produção de desperdícios e características químicas dos efluentes em unidades de conservas de peixe (Adaptado de UNEP e DEPA, 2000).

O primeiro passo consiste na quantificação detalhada dos gastos de água, recorrendo, se necessário, à instalação de contadores e à análise regular dos consumos, sobretudo nas operações mais exigentes e durante os períodos mais intensos de laboração. Na fase seguinte é indispensável quantificar as exigências reais de cada operação – processo, auxiliar e de limpeza - e otimizar os consumos, tendo em conta boas práticas de fabrico; paralelamente há que introduzir metodologias organizativas que permitam melhorar o desempenho e controlar e garantir o cumprimento das

decisões. Por último, são definidos os objectivos, elaborados planos e tomadas decisões sobre as soluções e medidas a introduzir para reduzir os consumos. Dentro destas, destaca-se o recurso a sistemas de transporte de desperdícios que evitem ou minimizem o uso de água, uso de pressões elevadas em vez de grandes caudais nas operações de limpeza, utilização de ar comprimido como substituto da água, reutilização da água pouco suja - por exemplo a usada na descongelação de matéria prima pode ser usada no encaminhamento de resíduos ou nas fases iniciais dos ciclos de lavagem das zonas sujas -, controlo e vigilância dos consumos de água, sobretudo nos equipamentos e áreas mais exigentes, utilização de válvulas que parem automaticamente o fluxo de água quando o equipamento não está a operar, utilização de chuveiros para lavagem de matéria prima ao longo do processo, funcionamento de sistemas de arrefecimento em circuito fechado, recolha ou segregação de desperdícios sólidos antes da limpeza e, por último, sensibilização do pessoal.

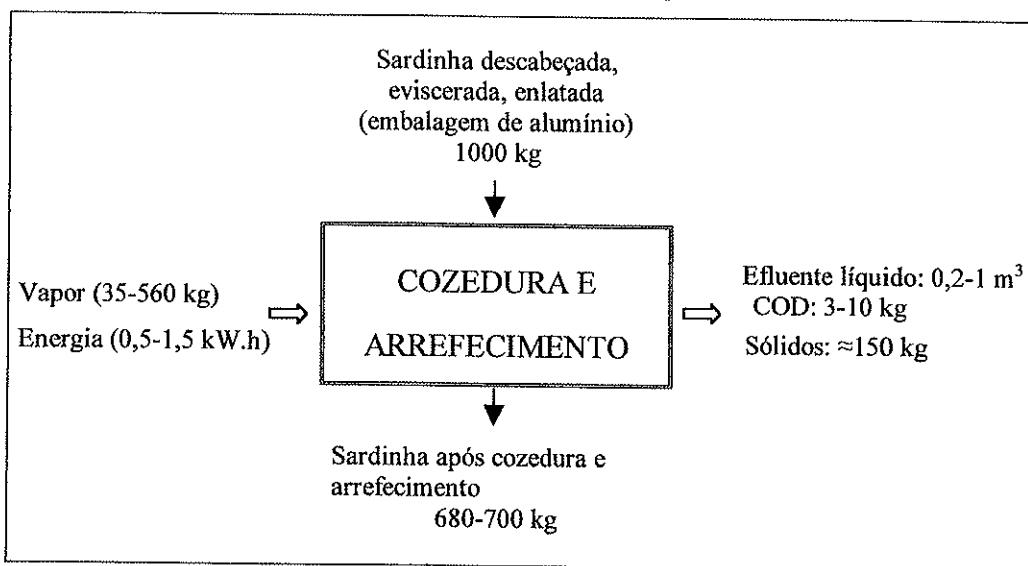


Figura 3. Exemplo de um balanço de massas para a operação de cozadura e arrefecimento de sardinha.

As operações de limpeza nas unidade de filetagem/congelção e de conservas consomem, em regra, 25-40 % do total de água e mais de 50 % deste volume é utilizado nas primeiras fases, sendo, assim, indispensável ter planos de limpeza e

desinfecção bem estruturados, em que o equipamento, a concentração dos detergentes e a temperatura da água são criteriosamente seleccionados.

Os resultados obtidos permitem concluir que o enquadramento destas medidas pode conduzir a reduções de 1,2 - 4,4 m<sup>3</sup> e de cerca de 7 m<sup>3</sup>/ton de matéria prima, respectivamente nas unidades de filetagem de peixe magro e nas unidades de conservas. Por seu lado, a sensibilização do pessoal pode contribuir para reduções na ordem de 10 %.

### *Volume e carga orgânica dos efluentes*

Os efluentes gasosos provenientes das unidades de processamento de pescado são menores, destacando-se, em particular, os resultantes das caldeiras de vapor nas unidades de produção de conservas que exigem a colocação de filtros para segregar partículas e compostos voláteis.

Os efluentes líquidos, por seu lado, são significativos em consequência dos elevados volumes de água utilizada nas unidades de processamento de pescado que, na sua quase totalidade, é eliminada como efluente, pelo que a redução do consumo de água se reflecte na diminuição das descargas. Os efluentes deste tipo de unidades contêm escamas, espinhas e pedaços de músculo, vísceras, sangue, detergentes e outros agentes de limpeza de que resultam elevados níveis de matéria orgânica, nomeadamente óleo e gordura, proteínas e outros compostos azotados solúveis bem como sólidos em suspensão, podendo os teores de fosfatos e nitratos ser também apreciáveis.

Em regra, as operações que mais contribuem para os elevados caudais de efluentes são o manuseamento da matéria prima antes do processamento, sobretudo a descongelação e lavagem, bem como a lavagem do equipamento e das zonas de produção. Por seu lado, a carga orgânica é influenciada não só pelo tipo de processamento e instalação mas também pela espécie. Assim, por exemplo, os efluentes das unidades em que se processa peixe gordo apresentam níveis mais elevados de sólidos em suspensão pelo facto destes não serem eviscerados a bordo e terem teores mais altos de gordura.

A estratégia a desenvolver para reduzir os volume de efluente e a carga orgânica é semelhante à preconizada anteriormente para reduzir o consumo de água, isto é, numa primeira fase há que quantificar e caracterizar cada corrente no que respeita ao volume e parâmetros físico-químicos e, de seguida, adoptar e implementar medidas adequadas. As soluções mais frequentemente preconizadas consistem na colocação de grelhas ou armadilhas que impeçam o arrastamento de material sólido pelas correntes líquidas, recolha frequente dos desperdícios de peixe no sentido de prevenir o arrastamento dos compostos solúveis, remoção do material sólido antes das operações de limpeza e higienização e segregação/decantação da gordura, ilustrando-se na figura 4 um tipo de grelha desenvolvido pela Sea Fish Authority especificamente concebido para unidades de processamento de pescado (Denton *et al.*, 2000).

Nas unidades de produção de conservas de peixe, os principais problemas estão associados aos resíduos libertados durante a cozedura da matéria prima e de óleo vegetal aquando da adição do molho de cobertura e também às operações de lavagem. A aplicação de tecnologias limpas pode conduzir a reduções significativas, nomeadamente no que respeita aos níveis de BOD e COD que podem passar de 52 e 115 kg para 12 e 27 kg por tonelada, respectivamente. Por seu lado, os compostos azotados em solução podem descer de 3 para cerca de 0,7 kg/ton de matéria prima, enquanto que a percentagem de fosfatos pode passar de 0,4 kg de fósforo por tonelada de matéria prima para cerca de 0,1 kg. As características dos efluentes de unidades de conservas de sardinha e de atum são distintas, importando destacar que nestas últimas os volumes, níveis de BOD, de sólidos em suspensão e de gordura (kg) são, em regra, o dobro dos encontrados nas unidades que laboram sardinha (UNEP e DEPA 2000).

Ainda segundo a UNEP e DEPA (2000), a aplicação de tecnologias limpas na preparação de filetes de peixe magro pode levar a reduções de mais de 30% no volume de águas residuais, de cerca de 70% no caso do BOD, COD e azoto em solução e de 50% no que respeita aos fosfatos.

Nas unidades de processamento de crustáceos, para além dos elevados volumes de efluentes em consequência dos significativos consumos de água, é de destacar os níveis de BOD bem como a quantidade de sólidos em suspensão que

podem atingir valores da ordem de 130 e 210 kg/ton de matéria prima, respectivamente.

A aplicação de tecnologias limpas é, como se depreende, um processo dinâmico que exige permanente sensibilização do pessoal, quantificação dos consumos de água e energia e caracterização dos parâmetros químicos dos efluentes. Por outro lado, é indispensável analisar e rever regularmente as práticas em uso, desenvolver e avaliar o impacte de novas iniciativas e implementar as práticas acordadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDARRA, N.M.; BATISTA, I.; CARDOSO, C.; NUNES, M. L., 2000. Alternative methods for the preparation of polyunsaturated  $\omega$ 3 fatty acids concentrates. Proceedings of the 30<sup>th</sup> WEFTA Plenary Meeting, 19-22 June 2000, Tórshavn, the Faroe Islands (eds A. Gudjónsson and O. Niclasen), pp. 161-168.
- BATISTA, I.; NUNES, M. L., 1997. Preparation of enzymatic hydrolysates from fish wastes. *In* Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality, eds. J. B. Luten, T. Børresen and J. Oehlenschläger. Amsterdam, Elsevier, pp. 59-70.
- BATISTA, I.; PIRES, C., 2002. Comparative studies of the proteolytic activity of crude extracts from the digestive tract of three shark species. Aceite para publicação no *Journal of Aquatic Food Product Technology*.
- BORDENAVE, S.; FRUITIRE, I.; SANNIER, F.; GILDBERG, A.; BATISTA, I.; PIOT, J. M., 2002. Effect of fish wastes hydolysates fractions on guinea pig ileum and ACE activity. Aceite para publicação em *Preparative Biochemistry and Biotechnology*.
- DENTON, W.; WATSON, R.; ARCHER, M.; WILSON, P., 2000. Water and effluent minimisation in fish processing. Comunicação apresentada na 30<sup>a</sup> reunião Anual da WEFTA. Tórshavn (Ilhas Faroe), 19 a 22 de Junho de 2000.
- FAO, 2000. The state of world fisheries and aquaculture, Rome 142p.

- FOUCHEREAU-PERON, M.; DUVAIL, L.; MICHEL, C.; GILDBERG, A.; BATISTA, I.; LE GAL, Y., 1999. Isolation of an acid fraction from a fish protein hydrolysate with a CGRP-like biological activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 87-92.
- PEDRO, S. C.; BATISTA, I.; REIS, T.; ALBUQUERQUE, M. M.; PIRES, C.; BRAGA, V., 2000. Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood samples by using enzymatic fish hydrolysates as the nitrogen source. Comunicação apresentada na 30ª Reunião Anual da WEFTA. Tórshavn (Ilhas Faroe), 19 a 22 de Junho de 2000.
- PROENÇA, A.C.; NUNES, M. L.; BARATA, F., 2001. Clean technologies in sardine canning industry. Proceedings of the 30<sup>th</sup> WEFTA Plenary Meeting, 19-22 June 2000, Tórshavn, the Faroe Islands (eds A. Gudjónsson and O. Niclasen), pp. 145-150.
- RAVALLEC-PLÉ, P.; CHARLOT, C.; PIRES, C.; BRAGA, V.; BATISTA, I.; Van WORMHOUDT, A.; Le GAL, Y.; FOUCHEREAU-PÉRON, M., 2001. Presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from enzymatic processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (11): 1120-1125.
- ROUSSEAU, M.; BATISTA, I.; LE GAL, Y.; FOUCHEREAU-PERON, M., 2001. Purification of a competitive antagonist for CGRP action from sardine hydrolysates. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 4, nº1, Issue of April 15.
- UNEP e DEPA, 2000. Cleaner production assessment in fish processing, (<http://www.agrifood-forum.net/publications/guide/index.htm>)

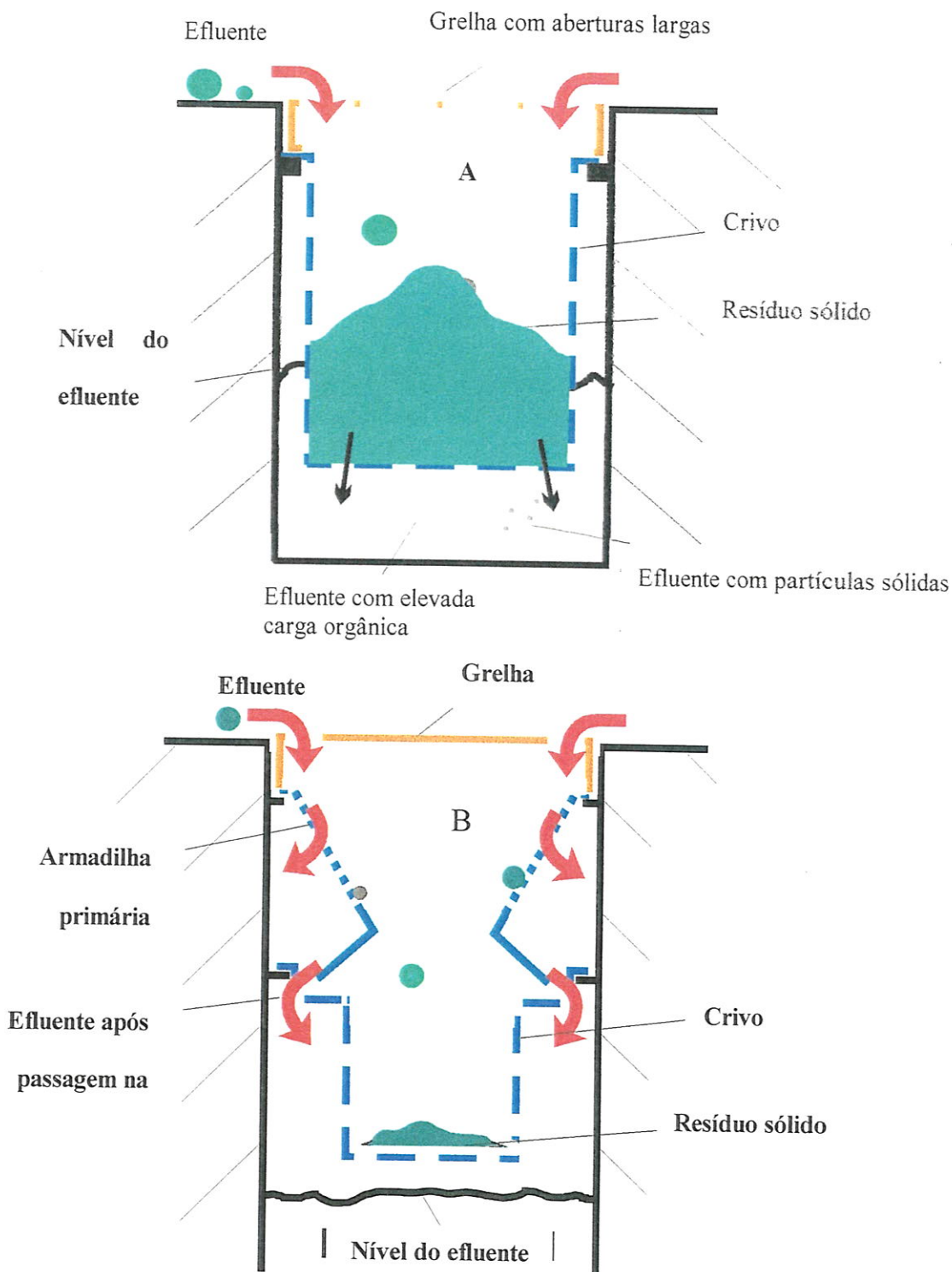


Figura 4. Grelhas para separação de sólidos, modelo tradicional (A) e modelo desenvolvido especificamente para unidades de processamento de pescado (Denton *et al.*, 2000).



## VALOR NUTRICIONAL DE PRODUTOS DA PESCA

Narcisa M. Bandarra, Irineu Batista, João Tafula, Maria Leonor Nunes

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

Avenida de Brasília, 1449-006 LISBOA

---

### RESUMO

O conhecimento da composição química dos produtos da pesca é um dos aspectos fundamentais para avaliar o seu valor nutricional. Existe, actualmente, muita informação sobre a composição química, mas alguns dados necessitam de ser revistos e actualizados em virtude do desenvolvimento de métodos analíticos mais fiáveis, tendo sido ainda introduzidos nos hábitos alimentares novas espécies e produtos derivados do pescado.

As proteínas do pescado são um dos seus principais constituintes, apresentam teores que variam entre 8 e mais de 25 %, sendo, por sua vez constituídas, por todos os aminoácidos essenciais. A gordura é outro constituinte importante, apresentando o seu teor grandes variações inter e intraespecíficas. Assim, grande número das espécies consumidas tem baixo teor de gordura que se localiza principalmente no fígado, enquanto que nas espécies gordas está distribuída sob a pele, no tecido muscular e na cavidade abdominal envolvendo as vísceras. Esta gordura é constituída por uma elevada percentagem de ácidos gordos polinsaturados do tipo  $\omega 3$  cujos efeitos benéficos para a saúde têm sido amplamente estudados. Os níveis de colesterol são, em regra, baixos comparativamente aos encontrados em produtos alimentares como os ovos e a manteiga.

Assim, de modo a contribuir para uma actualização da informação nutricional existente sobre os produtos da pesca, tem-se vindo a proceder no âmbito do Projecto PRAXIS XXI 1747/95 à caracterização das principais espécies de pescado consumidas em Portugal, tendo em vista a elaboração de uma base de dados.

## **INTRODUÇÃO**

Uma alimentação saudável envolve o consumo de todos os constituintes necessários ao bom funcionamento do organismo. O pescado é um dos alimentos indispensáveis para uma dieta equilibrada e, além de estar muito disponível, apresenta também grande variedade de espécies, alto valor nutricional e, em regra, é de fácil digestão. Além disso, a especificidade da constituição dos lípidos do pescado confere-lhe ainda um papel importante na prevenção de acidentes cardiovasculares, cujos efeitos benéficos para a saúde têm sido largamente evidenciados (Eritsland *et al.*, 1994; Ascherio *et al.*, 1995; Nestel, 2000). O consumo anual *per capita* de cerca de 60 kg coloca Portugal entre os maiores consumidores de pescado a nível mundial. Além disso, inclui também uma grande diversidade de espécies.

A composição química dos produtos da pesca, para além dos aspectos intrínsecos é influenciada por factores ambientais e geográficos. Regra geral, as variações sazonais das percentagens de proteína e minerais são menores do que as observadas a nível do teor em gordura.

Existem muitos dados na literatura sobre a composição química dos produtos da pesca mas torna-se necessário a sua actualização tanto devido ao desenvolvimento de metodologias mais rigorosas como à introdução de novos produtos da pesca na dieta alimentar.

Nesta medida, é objectivo deste trabalho contribuir para uma caracterização mais completa dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal de modo a que estes possam ser utilizados pelos consumidores, industriais e nutricionistas bem como na rotulagem nutricional.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Matéria prima**

As várias espécies usadas neste trabalho foram adquiridas em mercados ou supermercados e transportadas para o IPIMAR. Após chegada ao laboratório, procedeu-se ao descabeçamento, evisceração e filetagem dos exemplares. No caso dos cefalópodes, analisou-se apenas o manto despelado juntamente com os tentáculos.

## **Análises químicas**

A composição química aproximada da parte edível das diferentes espécies – humidade, gordura, proteína e cinza - foi determinada segundo os métodos descritos no AOAC (1998).

O perfil de ácidos gordos foi analisado a partir de cerca de 300 mg de material liofilizado, de acordo com o método descrito por Lepage e Roy (1986) modificado por Cohen *et al.* (1988). A análise dos ésteres metílicos foi efectuada num cromatógrafo em fase gasosa Varian 3400 equipado com um auto-amostrador, um detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica da Chrompack CPSil 88 (0,32 mm d.i. x 50 m), usando as condições descritas por Bandarra *et al.* (1999).

A análise dos aminoácidos foi efectuada de acordo com o procedimento descrito no AOAC (1998).

A determinação do teor em colesterol foi efectuada a partir de cerca de 250 mg de material liofilizado homogeneizado, contendo como padrão interno 100 µl de uma solução de 0,5mg/ml de 5- $\alpha$ -colestano e seguindo o procedimento descrito por Naeemi *et al.* (1995), posteriormente modificado por Oehlenschläger (1998). A análise foi efectuada num cromatógrafo gasoso Hewlett Packard 5890 equipado com uma coluna HP5 (0,25 mm d.i.x30 m). Como gás de arraste foi usado hélio (fluxo de 1ml/min) e a razão de 'split' usada foi de 100:1. A temperatura do forno, do injector e do detector de ionização de chama foram, respectivamente, 280 °C, 285 °C e 300 °C.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O teor de humidade das espécies analisadas (Quadro 1) variou entre 63,4 e 83,2 %, correspondendo os valores mais baixos às espécies mais gordas o que resulta da relação inversa entre o teor de gordura e a humidade (Stansby, 1962). Por seu turno, o teor em gordura variou entre 0,1 e 27,7 %, sendo o constituinte que apresenta maior variação tanto entre espécies como numa mesma espécie. Neste sentido, é de realçar que nos pequenos pelágicos, o teor em gordura tem acentuadas variações sazonais como é o caso, por exemplo, da sardinha cujas percentagens variam entre 1,2

e 18,4 % (Bandarra *et al.*, 1997) e do carapau em que os valores se situam entre 1,4 e 7,5 % (Bandarra *et al.*, 2001).

A gama de variação do teor proteico foi de 13,4 e 21,5 %, sendo o valor mais baixo registado na enguia, espécie que apresentava o maior nível de gordura (27,7 %). Atendendo ao teor em gordura e proteína, as espécies podem ser agrupadas de acordo com a classificação proposta por Stansby (1962), apresentando-se nos Quadros 1 e 2 as diversas espécies analisadas e o respectivo grupo. A maioria das espécies são magras e pertencem ao grupo A enquanto que no grupo B se incluem as espécies gordas, sendo muitas delas pequenos pelágicos.

Quadro 1 – Peixes analisados e respectivos grupos.

| Família        | Nome científico                     | Nome vulgar        | Grupo |
|----------------|-------------------------------------|--------------------|-------|
| ANGUILLIDAE    | <i>Anguilla anguilla</i>            | Enguia             | C     |
| BERYCIDAE      | <i>Beryx decadactylus</i>           | Imperador          | A     |
| CARANGIDAE     | <i>Trachurus trachurus</i>          | Carapau            | B     |
| CLUPEIDAE      | <i>Sardina pilchardus</i>           | Sardinha           | B     |
| CONGRIDAE      | <i>Conger conger</i>                | Safio              | B     |
| GADIDAE        | <i>Pycis blennoides</i>             | Abrótea            | A     |
|                | <i>Gadus morhua</i>                 | Bacalhau*          | A     |
|                | <i>Molva molva</i>                  | Maruca             | A     |
| HAEMULIDAE     | <i>Plectorhinchus mediterraneus</i> | Pombo              | A     |
| LOPHIIDAE      | <i>Lophius piscatorius</i>          | Tamboril           | A     |
| MERLUCCIIDAE   | <i>Merluccius merluccius</i>        | Pescada            | A     |
| PLEURONECTIDAE | <i>Pleuronectes platessa</i>        | Solha              | A     |
| RAJIDAE        | <i>Raja clavata</i>                 | Raia               | A     |
| SALMONIDAE     | <i>Salmo salar</i>                  | Salmão             | C     |
|                | <i>Onchorrinchus mykiss</i>         | Truta-arco-íris    | A     |
| SCIAENIDAE     | <i>Argyrosomus regius</i>           | Corvina-legítima   | A     |
| SCOMBRIDAE     | <i>Scomber japonicus</i>            | Cavala             | B     |
|                | <i>Scomber scombrus</i>             | Sarda              | B     |
| SOLEIDAE       | <i>Solea solea</i>                  | Linguado           | A     |
| SPARIDAE       | <i>Pagellus acarne</i>              | Besugo             | B     |
|                | <i>Sparus aurata</i>                | Dourada            | B     |
|                | <i>Pagelus bogaraveo</i>            | Goraz              | A     |
|                | <i>Pagrus pagrus</i>                | Pargo              | A     |
| TRIAKIDAE      | <i>Mustelus mustelus</i>            | Cação              | A     |
| TRICHIURIDAE   | <i>Lepidopus caudatus</i>           | Peixe-espada       | A     |
|                | <i>Aphanopus carbo</i>              | Peixe-espada-preto | A     |
| XIPHIIDAE      | <i>Xiphias gladius</i>              | Espadarte          | A     |

\* Produto demolido. A – pescado gordura (G) inferior a 5 % e proteína (P) entre 15 a 20 %; B – pescado com G entre 5 a 15 % e P entre 15 a 20 %; C – pescado com G superior a 15 % e P inferior a 15 %.

Quadro 2 –Cefalópodes e crustáceos analisados e respectivos grupos.

| Família            | Nome científico                 | Nome vulgar      | Grupo |
|--------------------|---------------------------------|------------------|-------|
| <i>CEFALÓPODES</i> |                                 |                  |       |
| LOLIGINIDAE        | <i>Loligo vulgaris</i>          | Lula             | A     |
| OCTOPODIDAE        | <i>Octopus vulgaris</i>         | Polvo            | A     |
| OMMASTROPHIDAE     | <i>Illex spp.</i>               | Pota             | A     |
| SEPIIDAE           | <i>Sepia officinalis</i>        | Choco            | A     |
| <i>CRUSTÁCEOS</i>  |                                 |                  |       |
| ARISTEIDAE         | <i>Aristeus antennatus</i>      | Camarão-vermelho | A     |
| NEPHROPIDAE        | <i>Nephrops norvegicus</i>      | Lagostim         | A     |
| PENAEIDAE          | <i>Parapenaeus longirostris</i> | Gamba            | A     |

Os lípidos de pescado são constituídos por uma grande variedade de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, sendo, em regra geral, a percentagem de compostos com 20 ou mais átomos de carbono e com mais de quatro ligações duplas bastante superior à encontrada nos óleos vegetais ou em gorduras de animais terrestres. De entre os ácidos gordos polinsaturados, destacam-se como mais importantes o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 $\omega$ 3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 $\omega$ 3) (Ackman, 1979).

Na figura 1 apresentam-se as diferentes espécies de peixes agrupadas de acordo com as proporções de ácidos gordos polinsaturados, monoinsaturados e saturados. Na maioria das espécies os ácidos gordos polinsaturados são o grupo dominante. A corvina, o espadarte e o peixe-espada preto, com a proporção mais baixa de polinsaturados e o nível mais elevado de monoinsaturados, constituem, de certo modo, uma exceção relativamente à generalidade das espécies marinhas que são, usualmente, ricas nos ácidos gordos mais insaturados. O besugo foi a única espécie em que os saturados apresentavam a maior proporção, embora a distribuição dos três grupos de ácidos gordos fosse relativamente equilibrada.

As proporções dos três grupos de ácidos gordos nos cefalópodes e crustáceos que se apresentam na figura 2, mostram que, com exceção do choco, os polinsaturados são os maioritários. De salientar ainda o teor muito baixo de monoinsaturados no polvo os quais, por sua vez, constituem o grupo predominante no choco.

Nas figuras 3 e 4 apresenta-se o teor dos ácidos gordos mais abundantes nas diferentes espécies analisadas. A percentagem de ácido palmítico situa-se entre 11,8 e 21,6 %, mas na maioria das espécies encontra-se entre 15 e 21%. Este ácido gordo apresenta pequenas variações ao longo do ciclo de vida de cada espécie, sendo considerado um metabolito chave na síntese de outros ácidos gordos (Ackman, 1964). O ácido oleico é o monoinsaturado dominante como acontece, aliás, na generalidade das espécies de peixe, representando, porém nalguns casos (espadarte, peixe-espada e peixe-espada-preto) quase 30% do total de ácidos gordos. A percentagem de DHA é normalmente superior à de EPA, exceptuando-se a enguia e a sardinha, embora esta última espécie possa apresentar nalguns meses (Dezembro a Março) maiores níveis de DHA (Bandarra *et al.*, 1997). Nos cefalópodes destacam-se os níveis muito elevados de DHA na lula e na pota, mas nesta última espécie o teor de palmítico é apreciável, enquanto que na lula é muito reduzido. Nos crustáceos a distribuição dos teores destes quatro ácidos gordos é relativamente equilibrada.

Os teores de colesterol dos vários grupos de peixes moluscos e crustáceos apresentam-se no Quadro 3. Nos peixes magros (grupo A) o teor é relativamente baixo, com excepção da solha cujo valor é de 85 mg/100g. As espécies gordas (grupo B) apresentam, em média, níveis mais elevados do que as magras, verificando-se, por outro lado, que varia inversamente com o teor em gordura. Os moluscos têm, em regra, os valores mais elevados de colesterol, mas possuem na sua composição taurina, um aminoácido livre que minimiza a absorção deste esterol.

Quadro 3 – Teores de colesterol por grupos de espécies.

|            | <b>Grupo</b> | <b>Colesterol<br/>(mg/100g parte edível)</b> | <b>Mediana</b> |
|------------|--------------|--|----------------|
| Peixes     | A            | 20-85  | 34,5           |
|            | B            | 20-57  | 49             |
|            | C            | 26 e 40                                      | -              |
| Moluscos   | A            | 64-140                                       | 112            |
| Crustáceos | A            | 68 e 83                                      | -              |

A proteína do peixe tem um elevado valor biológico, entrando na sua composição todos os aminoácidos essenciais e não essenciais. Na figura 5 apresentam-se os teores de aminoácidos essenciais, destacando-se o bacalhau, o besugo, a cavala e a sarda com níveis acima de 8 g/100 g. Em todas as espécies, o aminoácido predominante foi o ácido glutâmico, seguido da alanina e da lisina. A percentagem de aminoácidos essenciais em relação ao total situou-se entre 41,3 e 45,2%, encontrando-se a mediana em 43,1%. Como termo de comparação, refira-se que esta percentagem no ovo é de 42,7. Usando ainda como referência os aminoácidos essenciais do ovo calculou-se, através da expressão  $[(AAE_i)_{peixe}/(TAAE)_{peixe}]/[(AAE_i)_{ovo}/(TAAE)_{ovo}] \times 100$  (Afolabi e Oke, 1981), a razão entre o teor de cada aminoácido essencial no peixe e o seu correspondente no ovo. Os resultados obtidos mostram que os níveis de lisina e leucina são muito superiores aos registados no ovo. Por outro lado a metionina é o aminoácido limitante, representando no carapau apenas 33,3 %.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman, R. G., 1964. Structural homogeneity in unsaturated fatty acids of marine lipids. A review. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 21: 247-254.
- Ackman, R. G. 1979. Fish lipids. Part 1. *In: Advances in Fish Science and Technology*. J. J. CONNELL (Ed.). Fishing News Books Ltd, Farham, Surrey, England, p. 86-103.
- Ackman, R. G., 1995. Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids. *In Composition, Nutritive Properties and Stability*. A. RUITER (Ed). Cab International, Wallingford, Oxon, UK, p. 117-156.
- Afolabi, O. A.; Oke, O. L., 1981. Seasonal variability of nutritive value of the fish blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Nutritional Reports International*, 24(6): 1251-1261.
- AOAC, 1998. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>th</sup>, 4<sup>th</sup> Revision, Vol I e II. Association of Official Analytical Chemistry, AOAC International, Washington, DC.

- Ascherio, A.; Rimm, E. B.; Stampfer, M. J.; Giovannucci, E. L.; Willet, W. C., 1995. Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. *New Eng. J. Med.*, 332: 977-982.
- Bandarra, N. M.; Batista, I.; Nunes, M. L.; Empis, J. M. A.; Christie, W. W., 1997. Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine *Sardina pilchardus*. *J. Food Sci.*, 62(1): 40-43.
- Bandarra, N. M.; Campos, R. M.; Batista, I.; Nunes, M. L.; Empis, J. M., 1999. Antioxidant synergy of  $\alpha$ -tocopherol and phospholipids. *JAOCS*, 76 (8): 905-913.
- Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L.; Empis, J.M., 2001. Seasonal variation in the chemical composition of horse-mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technology*, 212: 535-539.
- Cohen, Z.; Vonshak, A.; Richmond, A., 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. of Phycol.*, 24: 328-332.
- Eritsland, J.; Arnesen, H.; Seljeflot, I.; Kierulf, P., 1994. Long-term effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on haemostatic variables and bleeding episodes in patients with coronary artery disease. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 6: 17-22.
- Lepage, G.; Roy, C. C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27: 114-119.
- Naeemi, E. D.; Ahmad, N.; Al-Sharrah, T.K.; Behbahani, M., 1995. Rapid and Simple Method for Determination of Cholesterol in Processed Food. *Journal of AOAC International*, 78(6): 1522-1525.
- Nestel P. J., 2000. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (Supl.): 228-231.
- Oehlenschläger, J., 1998. Cholesterol content in edible part of marine fish species and crustacean shellfish. 28<sup>th</sup> Annual Meeting of WEFTA. Tromsø, Norway, October 4-7.
- Stansby, M. E., 1962. Proximate composition of fish. In *Fish in Nutrition*. EIRIK HEEN and RUDOLF KREUSER (Ed.). Fishing News (Books) Ltd., pp. 55-60.

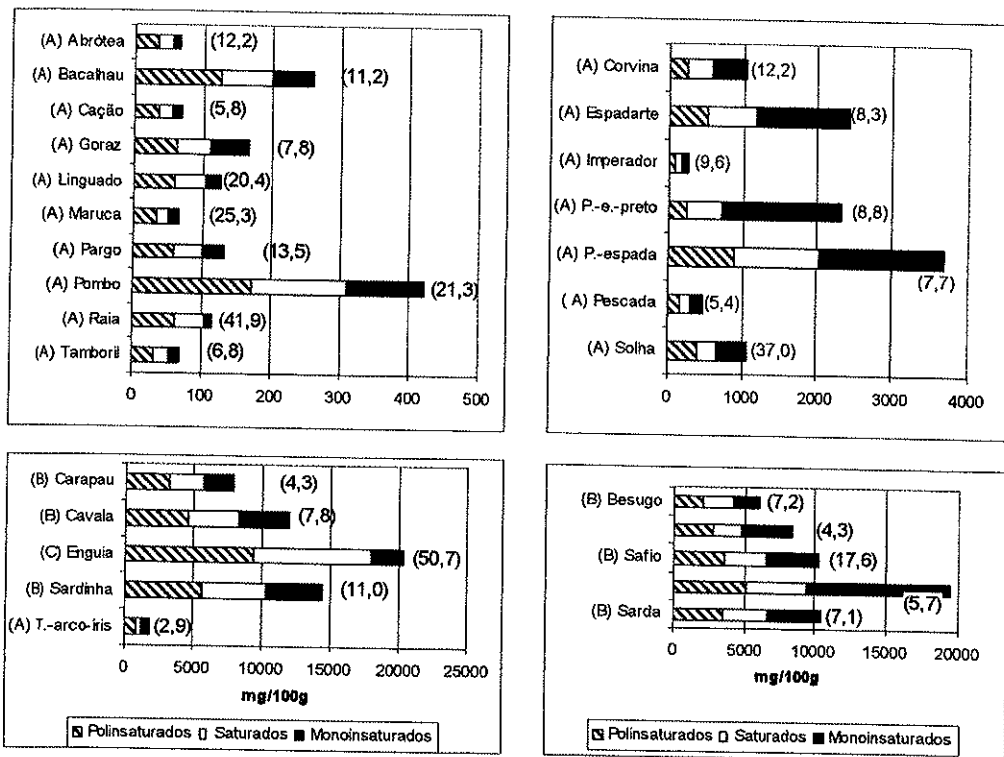


Figura 1 -- Distribuição dos totais de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados pelas várias espécies de peixes com a indicação do grupo a que pertencem de acordo com a sua composição química. Entre parêntesis encontra-se o valor da razão  $\omega 3/\omega 6$ .

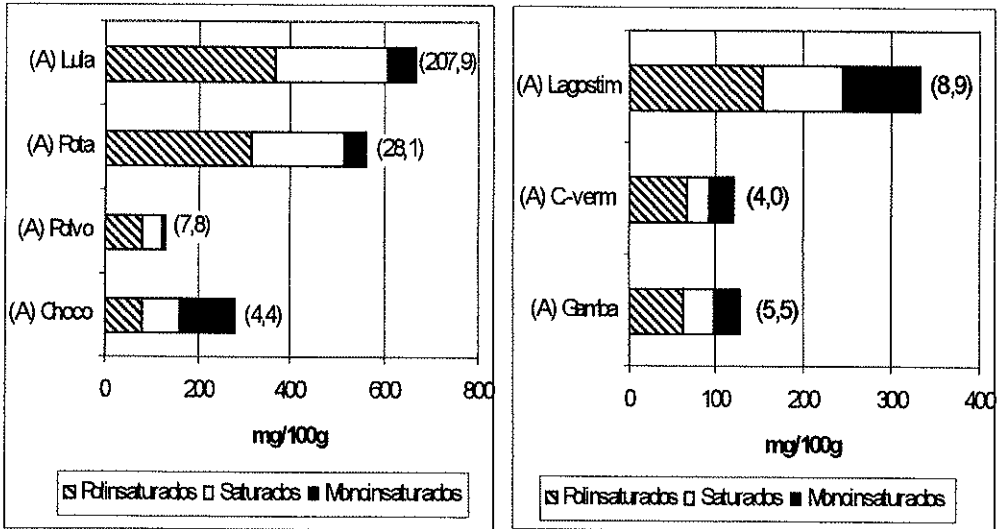


Figura 2 - Distribuição dos totais de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados nas várias espécies de cefalópodes e crustáceos com a indicação do grupo a que pertencem de acordo com a sua composição química. Entre parêntesis encontra-se o valor da razão  $\omega3/\omega6$ .

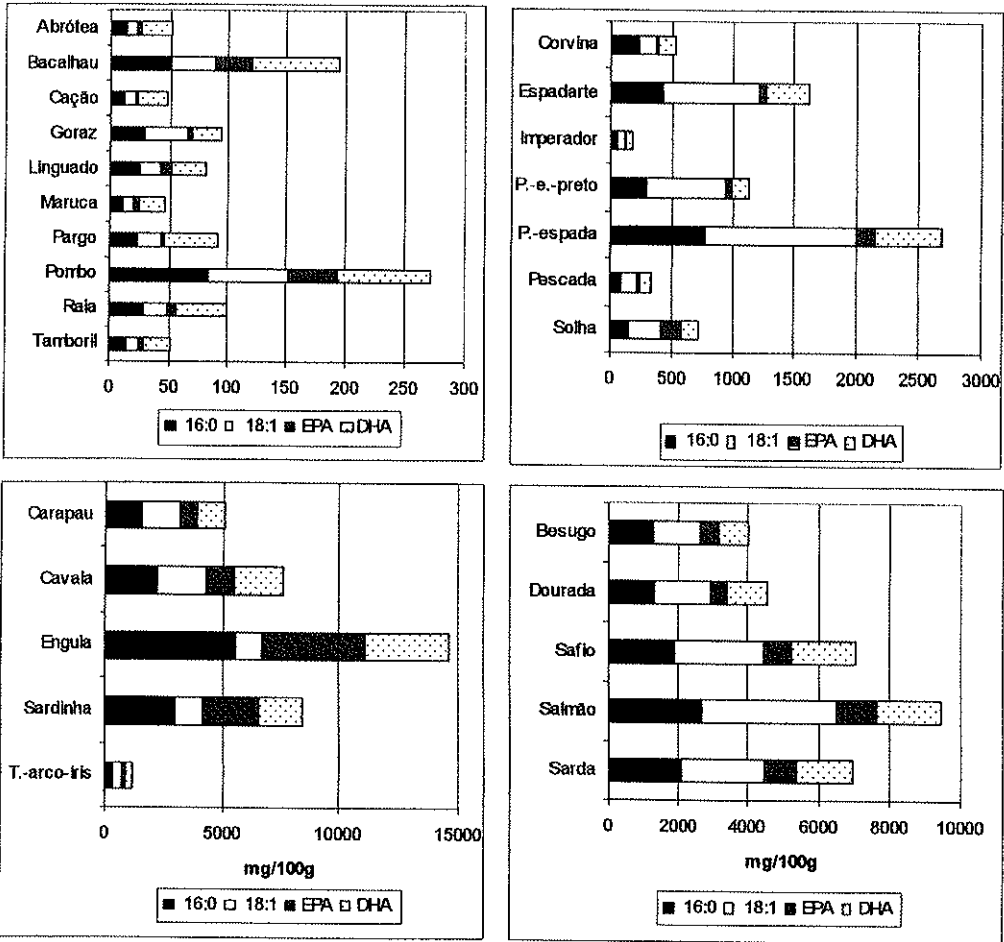


Figura 3 – Níveis de ácido palmítico (16:0), oleico (18:1), EPA (20:5 $\omega$ 3) e DHA (22:6 $\omega$ 3) em diferentes espécies de peixes.

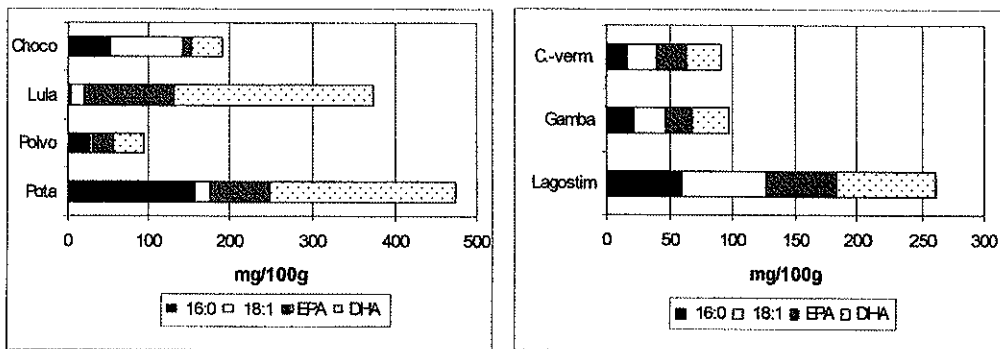


Figura 4 - Níveis de ácido palmítico (16:0), oleico (18:1), EPA (20:5 $\omega$ 3) e DHA (22:6 $\omega$ 3) em diferentes espécies de moluscos e crustáceos.

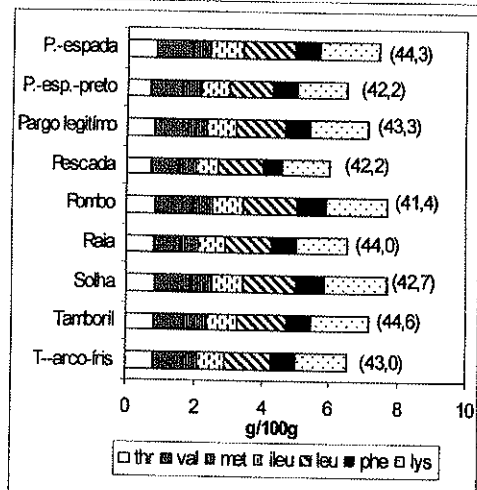
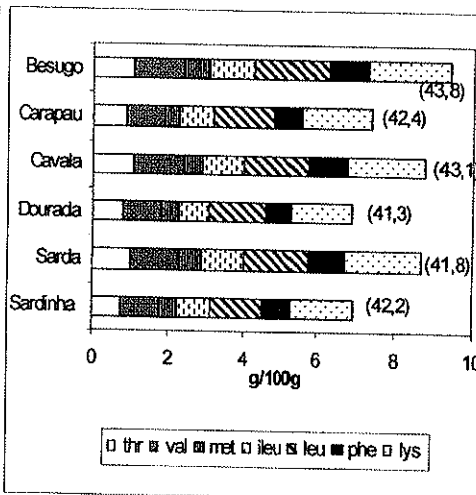
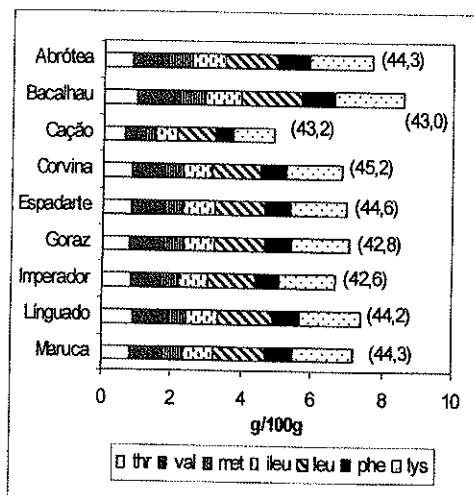


Figura 5 – Teor em aminoácidos essenciais nos peixes. Entre parêntesis apresenta-se a razão entre os aminoácidos essenciais e o total de aminoácidos.



# QUALIDADE E SEGURANÇA DOS PRODUTOS DA PESCA

Martins, M. F.; Lourenço, H. M.; Albuquerque, M. M.; Nunes, M. L.

[fmartins@ipimar.pt](mailto:fmartins@ipimar.pt)

Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca  
(DITVPP)

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR)

Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa

---

## RESUMO

A segurança dos produtos alimentares é um direito fundamental dos consumidores e constitui uma enorme preocupação não só para a Administração, mas também para a indústria e cadeias de distribuição. A nível das indústrias de produtos da pesca, a qualidade é assegurada através do controlo quer da matéria prima e produtos finais quer durante o processamento, armazenagem e transporte. Na distribuição, o principal objectivo consiste em garantir a manutenção da qualidade destes produtos, desde a recepção à sua aquisição pelo consumidor.

O IPIMAR, no âmbito das atribuições que lhe estão cometidas, tem vindo a desenvolver actividades de I&D que se traduzem em novas metodologias de análise mais rápidas e fiáveis, no sentido de prestar apoio à Administração e aos sectores da pesca e aquicultura. Paralelamente, presta serviços técnicos e analíticos à indústria, a grossistas e a retalhistas. Neste sentido, o DITVPP/IPIMAR está apetrechado com moderno equipamento e é acreditado, pelo IPQ, de acordo com a norma NP EN 45001 e a Directiva CNQ 8, para efectuar vários ensaios de rotina.

Como actividades mais relevantes nesta área, salientam-se a detecção de alguns microrganismos patogénicos, a validação de uma metodologia de determinação do metilmercúrio, a identificação de espécies por técnicas electroforéticas, focagem isoelectrica e biologia molecular e o desenvolvimento de sistemas de análise sensorial para pescado fresco.

## **INTRODUÇÃO**

Os produtos da pesca e aquicultura constituem uma das principais fontes proteicas de origem animal, estimando-se a sua contribuição em cerca de 23% do total consumido de proteína de origem animal. Estes produtos consideram-se uma alternativa mais saudável ao consumo de carne pois são de fácil digestibilidade e, por outro lado, a presença de ácidos gordos polinsaturados da série  $\omega$ -3, cujo efeito benéfico na prevenção das doenças coronárias confere-lhes um interesse adicional.

No entanto, estes produtos são muito perecíveis, perdendo rapidamente os atributos ligados à frescura devido às suas características intrínsecas e às condições do meio ambiente, estão também sujeitos a fenómenos de contaminação o que pode torná-los impróprios para consumo.

Importa pois conhecer, detalhadamente, os factores que condicionam a qualidade do pescado e aplicar os mecanismos que garantam o seu controlo. A indústria do sector, os consumidores e a Administração exigem cada vez mais respostas credíveis como forma de garantir um abastecimento adequado e de prevenir doenças devidas a infecções ou toxinfecções.

## **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PRODUTOS DA PESCA**

A análise sensorial é o método mais importante para avaliar a qualidade e frescura dos produtos da pesca. No entanto, ela deve ser efectuada por um painel de provadores bem treinados. É um método fiável podendo os seus resultados serem comparados com outros métodos de avaliação tais como métodos físicos, químicos e microbiológicos.

Sempre que os métodos sensoriais se revelem inconclusivos deve recorrer-se a métodos químicos, nomeadamente à verificação dos níveis dos compostos azotados voláteis (ABVT e TMA) e à determinação de peróxidos, dado que a alteração dos lípidos insaturados é uma das alterações químicas mais importante, porque leva à formação de hidroperóxidos cuja degradação origina aldeídos e cetonas que conferem um sabor forte a ranço bem como o aparecimento de colorações castanhas ou amarelas no tecido do peixe.

No que se refere às alterações microbiológicas, estas são condicionadas não só pelo número e natureza dos microrganismos presentes no pescado na altura da captura, mas também pelas condições de manuseamento, conservação e processamento, que são determinantes para o desenvolvimento de muitos microrganismos.

## SEGURANÇA DOS PRODUTOS DA PESCA

A segurança dos produtos da pesca é um direito dos consumidores e deve ser a maior preocupação do sector produtivo, da indústria e da grande distribuição, assegurando a qualidade dos mesmos, através do controlo de qualidade, uma vez que em Portugal algumas doenças podem ser causadas por microrganismos presentes no pescado.

Os principais microrganismos responsáveis pelas doenças causadas no homem são as bactérias patogénicas e, dentro destas, encontram-se as bactérias indígenas e as não indígenas. As bactérias indígenas encontram-se amplamente distribuídas nos ambientes aquáticos, salientando-se as seguintes: *Clostridium botulinum*, *Vibrio* sp., *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* e *Listeria monocytogenes*. As bactérias não indígenas são resultantes da contaminação posterior à captura do pescado devido ao manuseamento e processamento das quais se salientam a *Salmonella* sp., *Shigella*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*.

A presença de vírus no pescado resulta apenas de contaminações, quer através dos manipuladores de alimentos infectados quer através da água poluída. Por exemplo, os bivalves filtradores tendem a concentrar os vírus presentes na água onde se desenvolvem.

Também a presença de parasitas no peixe é muito frequente, mas a maior parte destes é pouco preocupante no que respeita à economia ou à saúde pública. Já as biotoxinas marinhas são responsáveis por um grande número de doenças relacionadas com o consumo de pescado, as quais, em Portugal, afectam, fundamentalmente, os moluscos bivalves, salientando-se as paralisantes (PSP), as diarreicas (DSP), as neurotoxinas (NSP) e as amnésicas (ASP).

As aminas biogénicas são muito importantes em termos de deterioração dos produtos da pesca e por representarem um perigo para o consumidor. Algumas

aminas, nomeadamente a histamina, quando ingeridas são susceptíveis de originar quadros alérgicos graves, mesmo em produtos da pesca que tenham sido sujeitos a cozedura, dado que é uma amina muito resistente ao calor, não sendo por isso destruída.

A contaminação com compostos químicos, como causa de doenças provocadas pelo consumo de pescado, é muito pouco frequente. No entanto, existem vários contaminantes com algum potencial tóxico como:

- Compostos inorgânicos – mercúrio e suas formas orgânicas, chumbo, cádmio, arsénio, sulfitos (usados no processamento de camarão);
- Compostos orgânicos - bifenilos policlorados, dioxinas, insecticidas;
- Compostos relacionados com o processamento – nitrosaminas;
- Os compostos utilizados em aquicultura – antibióticos e hormonas.

## **GARANTIA DA QUALIDADE DE PRODUTOS DA PESCA**

De acordo com a NP EN ISO 8402 <sup>(1)</sup>, a definição de Garantia da Qualidade é “o conjunto de todas as acções sistemáticas e planeadas, necessárias para proporcionar a confiança adequada para que um produto ou serviço possa satisfazer as exigências previstas para a qualidade”.

Assim, a monitorização da qualidade de produtos da pesca é uma das condições essenciais para garantir a segurança. Todas as entidades envolvidas no sector da pesca, como pescadores, produtores e industriais devem ser os principais responsáveis pelo controlo de qualidade do pescado. Para tal deverão pôr em prática sistemas de autocontrolo baseados nos princípios do sistema HACCP (Análise dos Perigos e dos Pontos de Controlo Crítico), conjugados com códigos de higiene e boas práticas de manuseamento e conservação.

## **ATRIBUIÇÕES DO DITVPP/IPIMAR NO ÂMBITO DA QUALIDADE E SEGURANÇA DE PRODUTOS DA PESCA**

### **I. ACTIVIDADES DE I&D**

Neste contexto, em que se privilegia o desenvolvimento de metodologias de ensaio mais rápidas e precisas, as áreas que, presentemente, têm merecido especial

atenção são: a detecção de microrganismos patogénicos, usando novas galerias de identificação, como por exemplo as cartas Vitek (Fig. 1) <sup>(2)</sup>; a validação de uma metodologia de determinação de metilmercúrio (Fig. 2) <sup>(3)</sup>; a identificação de espécies, por técnicas electroforéticas, focagem iso-elétrica e biologia molecular (Fig. 3) <sup>(4)</sup>; o desenvolvimento de tabelas de análise sensorial para pescado fresco (Tabela 1) <sup>(5)</sup>.



Figura 1 - Equipamento para identificação de microrganismos patogénicos.



Figura 2 – Equipamento para determinação de mercúrio e metilmercúrio.

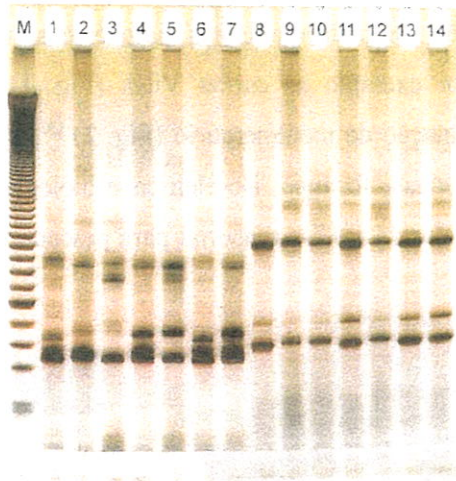


Figura 3 – Diferenciação de várias espécies sardinha por técnicas de biologia molecular. M-marcador de 50 pb; 1, 8-*S. aurita*; 2,9-*S. pilchardus*; 3,10-*S. sagax*; 4,11-*S. pilchardus*+ *S. aurita*; 5,12- *S. pilchardus*+ *S.sagax*; 6,13- *S. aurita* + *S. sagax*; 7,14- *S. pilchardus*+ *S. aurita* + *S. sagax*.

## II. ACTIVIDADES DE APOIO TÉCNICO AO SECTOR

Neste âmbito, os ensaios bioquímico/sensoriais mais solicitados têm sido os compostos azotados voláteis, as aminas biogénicas (em particular a histamina), a composição nutricional, o perfil de ácidos gordos, a identificação de espécies e a análise sensorial.

No caso dos contaminantes metálicos, as determinações mais efectuadas têm sido o mercúrio, o chumbo e o cádmio, principalmente em conservas de pescado.

O exame de embalagens metálicas de folha-de-flandres e alumínio em conservas de produtos da pesca também tem sido realizado regularmente, bem como ensaios de estanquicidade e a porosidade da camada de verniz.

No que se refere aos parâmetros microbiológicos, as principais solicitações dizem respeito à pesquisa e/ou contagem de microrganismos patogénicos, nomeadamente *Salmonella* sp., *Vibrio* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Clostridium* sp.; dentro dos não-patogénicos destacaram-se

coliformes, estreptococos fecais, bolores, leveduras e teores totais de microrganismos para os quais se recorreu a métodos normalizados.

Tabela 1 – Avaliação do Índice de Frescura da Dourada *Sparus aurata*.

| PARÂMETROS                      |                        | CARACTERÍSTICAS  | PONTUAÇÃO  |
|---------------------------------|------------------------|--|--|
| Aspecto Geral                   | Aspecto Superficial    | ☺ Brilhante, iridiscente<br>☹ Menos brilhante e iridiscente<br>☹ Ligeiramente descorado<br>☹ Descorado | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/><br>3 <input type="checkbox"/> |
|                                 | Firmeza da carne       | ☺ Rígida ( <i>rigor mortis</i> )<br>☺ Firme, elástica<br>☹ Mole, plástica                              | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
| Olhos                           | Transparência (córnea) | ☺ Límpida, translúcida<br>☹ Ligeiramente turva<br>☹ Turva, amarelada                                   | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
|                                 | Pupila                 | ☺ Negra brilhante<br>☹ Acinzentada (ligeiramente leitosa)<br>☹ Branca acinzentada                      | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
|                                 | Forma                  | ☺ Convexa<br>☹ Plana<br>☹ Côncava<br>☹ Afundada  | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/><br>3 <input type="checkbox"/> |
| Brânquias                       | Cor                    | ☺ Vermelha ou rosa brilhante<br>☹ Vermelha menos brilhante<br>☹ Vermelha descorada ou acastanhada      | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
|                                 | Cheiro                 | ☺ A algas pouco intenso<br>☹ A águas paradas<br>☹ Ligeiramente metálico ou intenso a algas             | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
| Abdómen                         | Cor                    | ☺ Branca prateada<br>☹ Esbranquiçada ou ligeiramente amarelada<br>☹ Amarelada                          | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
| Ânus                            | Aspecto                | ☺ Fechado<br>☹ Ligeiramente aberto<br>☹ Aberto   | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
| Peritoneu (em peixe eviscerado) | Aderência              | ☺ Aderente<br>☹ Menos aderente<br>☹ Rasgado  | 0 <input type="checkbox"/><br>1 <input type="checkbox"/><br>2 <input type="checkbox"/>                               |
| <b>Total</b>                    |                        |  | <b>0-22</b>  |

## ACREDITAÇÃO PELO INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE (IPQ)

De realçar que o DITVPP/IPIMAR está acreditado, pelo IPQ, de acordo com a norma NP EN 45001 (6) e a Directiva CNQ 8/97 (7), para efectuar vários ensaios de rotina, nos Laboratórios Físico Químico Sensorial e de Microbiologia.

## LABORATÓRIOS NACIONAIS DE REFERÊNCIA

É ainda Laboratório Nacional de Referência para a detecção das contaminações bacterianas de moluscos bivalves vivos onde se efectua a quantificação de coliformes fecais, pelo método do número mais provável (NMP) e também Laboratório Nacional de Referência para a determinação de mercúrio, chumbo e cádmio em produtos da aquicultura (8).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) NP EN ISO 8402, 1997. Gestão da Qualidade e Garantia da Qualidade. Vocabulário. Instituto Português da Qualidade.
- (2) BIOMÉRIEUX, 2000. BioLIAISON™ with VITEK DataTrac™ User Manual, bioMérieux Vitek, Inc. (ed), USA.
- (3) AFONSO, C. I. M., 2001. Peixe espada preto (*Aphanopus carbo*): determinação dos níveis de metais essenciais e metais tóxicos nos seus tecidos. Tese de mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 157 p.
- (4) QUINTEIRO, J.; VIDAL, R.; IZQUIERDO, M.; SOTELO, C. S.; CHAPELA, M. J.; PÉREZ-MARTIN, R.; REHBEIN, H.; HOLD, G. L.; RUSSELL, V. J.; PRYDE S. E.; ROSA, C.; SANTOS, A. T.; REY-MÉNDEZ, M., 2001. Identification of hake species (*Merluccius* Genus) using sequencing and PCR-RFLD analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (11): 5108-5114.
- (5) NUNES, M.L.; PEREIRA, T., 2000. Relatório final do Projecto FAIR PL 96 3253 “The evaluation of a simple, cheap, rapid method of non-protein determination in fish products through the processing/merchandising chain”, 120 p.

- (6) NP EN 45001, 1990. Critérios gerais para o funcionamento de laboratórios de ensaio. Instituto Português da Qualidade, 15p.
- (7) Directiva CNQ 8/97, 1997. Acreditação de laboratórios. Metodologias e regras gerais. Instituto Português da Qualidade, 11p
- (8) UE, 1998. Lista dos laboratórios nacionais de referência para a pesquisa de resíduos. Decisão da Comissão 98/536/CE. JO n.º L 251, 11.09.98, p. 39.



# **SALUBRIDADE DE MOLUSCOS BIVALVES: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**

Rui Cachola

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

Avenida 5 de Outubro – 8700 OLHÃO

---

## **RESUMO**

Dada a sua situação geográfica, Portugal é um país com grande apetência para a produção de moluscos bivalves quer nas zonas litorais oceânicas quer nas zonas estuarinas e lagunares.

O modo de alimentação e respiração destes seres vivos, filtração de água, leva a que, facilmente, acumulem microrganismos patogénicos provenientes do lançamento no meio aquático de efluentes urbanos não tratados ou deficientemente tratados ou ainda da escorrência das águas pluviais dos terrenos envolventes.

O IPIMAR desenvolve um programa de monitorização das zonas de produção de moluscos bivalves que permite a elaboração da classificação das respectivas zonas com base no resultado das análises microbiológicas efectuadas ao longo do ano.

Como meio de salvaguarda da saúde pública, todos os bivalves são, de acordo com a classificação da sua zona de produção, depurados, embalados e expedidos em centros apropriados ou nalguns casos transpostos para zonas não contaminadas.

## **PRINCIPAIS ASPECTOS RELACIONADOS COM A SALUBRIDADE DE BIVALVES**

Portugal é um país cuja situação geográfica e condições ambientais existentes influenciam positivamente a produção de moluscos bivalves, tanto na zona litoral oceânica como nas diferentes zonas lagunares e estuarinas que se distribuem ao longo da orla marítima.

Os moluscos bivalves apresentam uma produção anual estimada em mais de 10.000 toneladas, das quais uma parte significativa é exportada principalmente para Espanha e a restante é absorvida pelo mercado interno.

Estes animais respiram e alimentam-se através da filtração da água salgada, o que implica que acumulem muitos microrganismos, levando a concentrações superiores às encontradas no meio ambiente, pelo que as águas das zonas de produção de bivalves com forte contaminação urbana vão influenciar negativamente a salubridade dos moluscos bivalves. Deste modo, a protecção dos consumidores obriga a que seja necessário um controlo apertado no sentido de se salvaguardar a saúde pública.

Habitualmente, os moluscos bivalves são consumidos, utilizando métodos culinários que não recorrem a uma cozedura demorada (o que provocaria uma esterilização dos bivalves) e, assim sendo, se eles estiverem contaminados poderão provocar o aparecimento de graves afecções no aparelho digestivo.

Nesta medida, os moluscos bivalves podem ser transmissores de diversas doenças ou ser portadores de agentes patogénicos, nomeadamente de origem biológica, o que poderá provocar o aparecimento de várias doenças tais como, a título de exemplo, a disenteria, febre tifóide, cólera, hepatites, gastroenterites, etc.

Como já foi referido, as zonas de produção localizam-se na zona litoral, quer oceânica quer estuarina ou lagunar, uma vez que nestes locais os moluscos bivalves encontram a matéria orgânica e as condições físico-químicas favoráveis ao seu desenvolvimento, apesar de ao mesmo tempo sofrerem a influência dos esgotos urbanos e da escorrência das águas vindas dos terrenos circundantes. Perante tal cenário, é lógico que a contaminação bacteriana se faz sentir, com maior ou menor intensidade, de acordo com a contaminação das águas envolventes e a localização das zonas de produção em relação aos possíveis focos de poluição, assim sendo haverá que ter em linha de conta que o consumo dos moluscos bivalves tem de ser devidamente controlado desde a produção até ao mercado.

Atenta a esta situação, a Comunidade Europeia, publicou as Directivas nº 91/492/CEE de 15 de Julho e nº 97/61/CE de 20 de Outubro e a Decisão nº92/92/CEE de 9 de Janeiro, documentos estes que foram transpostos para o direito interno

português pelo Decreto-Lei nº 293/98 de 18 de Setembro. De acordo com esta legislação, são aprovadas as normas sanitárias relativas à produção e à colocação no mercado de moluscos bivalves vivos e fixadas as exigências relativas aos equipamentos e estruturas dos seus centros de depuração e expedição.

Do que acima foi referido os moluscos bivalves que se produzem em Portugal têm fortes possibilidades de serem poluídos por águas contaminadas e, assim sendo, para se salvaguardar a saúde pública foram criados centros de depuração e de expedição para os moluscos bivalves (mapa em anexo) cujo grau de contaminação bacteriana não seja superior a 6000 coliformes por 100 g de carne e líquido intervalvar. Esta operação de depuração consiste na colocação dos bivalves em tanques, com água previamente esterilizada, durante um período que permita a salubridade dos bivalves o qual varia de acordo com o grau de contaminação da zona da sua proveniência.

A depuração tem por base a fisiologia destes animais que, como já referido são filtradores por excelência pelo que, uma vez mergulhados em água salgada esterilizada, a corrente de água gerada pelos bivalves arrasta os microrganismos patogénicos existentes no seu interior. É ainda de referir que na esterilização da água se podem utilizar, como agentes esterilizadores, os três seguintes: ozono, cloro e raios ultravioletas. Em Portugal, o agente mais utilizado na esterilização da água de depuração de bivalves é a radiação ultravioleta uma vez que esta técnica apresenta como principais vantagens, em relação às restantes, ausência de produtos químicos tóxicos, tempos de contacto instantâneos, simplicidade de funcionamento e tecnologia, custos de funcionamento baixos e não afecta o meio ambiente.

Ainda tendo em consideração a legislação já referida, o Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR) tem, entre outras atribuições, o controlo da qualidade da produção de moluscos bivalves vivos e a classificação das respectivas zonas de produção.

No que respeita ao controlo da qualidade da produção e pondo como exemplo a região do Algarve, por ser a que apresenta maior produção de bivalves a nível nacional, procedeu-se, por uma questão de operacionalidade, à divisão da área de jurisdição de cada Capitania, em zonas perfeitamente delimitadas, tendo neste caso a

divisão sido feita de acordo com a influência negativa que os principais focos de poluição possam ter nos moluscos bivalves da zona.

Em cada uma destas zonas são recolhidas, regularmente, amostras de moluscos bivalves e de água para se efectuarem as respectivas análises bacteriológicas, sendo com base nos resultados obtidos ao longo do ano que se estabelecem as classificações das zonas produtoras, de acordo com o estabelecido na lei ( Quadro 1).

| <b>Quadro 1</b> |  |                              |
|-----------------|--|------------------------------|
| <b>CLASSE</b>   | <b>Nº DE COLIFORMES<br/>FECAIS/100 g</b> | <b>OBSERVAÇÕES</b>           |
| <b>A</b>        | <b>Menos de 300</b>                      |                              |
| <b>B</b>        | <b>De 300 a 6 000</b>                    | Em menos de 90% das amostras |
| <b>C</b>        | <b>De 6 000 a 60 000</b>                 |                              |
| <b>PROIBIDA</b> | <b>Mais de 60 000</b>                    |                              |

**LEGENDA**

Classe A - Bivalves que podem ser apanhados e comercializados para consumo humano.

Classe B - Bivalves que podem ser apanhados e destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial.

Classe C - Bivalves que podem ser apanhados e destinados a depuração intensiva, transposição prolongada (mínimo dois meses) ou transformação em unidade industrial.

Esta classificação está baseada em critérios bacteriológicos - coliformes fecais.

No nosso caso, os indicadores de contaminação fecal utilizados são os coliformes fecais ou a *E. coli*. Quanto à metodologia utilizada na realização das análises, ela consiste na aplicação do método dos tubos múltiplos em que são considerados cinco tubos para cada uma das três diluições, com meio verde brilhante e

sais biliares. Após a sementeira e respectiva incubação de 1 hora a  $36 \pm 1$  °C, seguida de nova incubação a  $44 \pm 0,5$  °C em banho de água ou estufa durante 48 horas, procede-se à leitura dos tubos de ensaio em que, no respectivo tubo Durham se tenha produzido gás que ocupe um décimo do seu volume, calculando-se, de acordo com tabelas de probabilidades (número mais provável), o valor correspondente de coliformes fecais presentes em 100 g de músculo e líquido intervalvar.

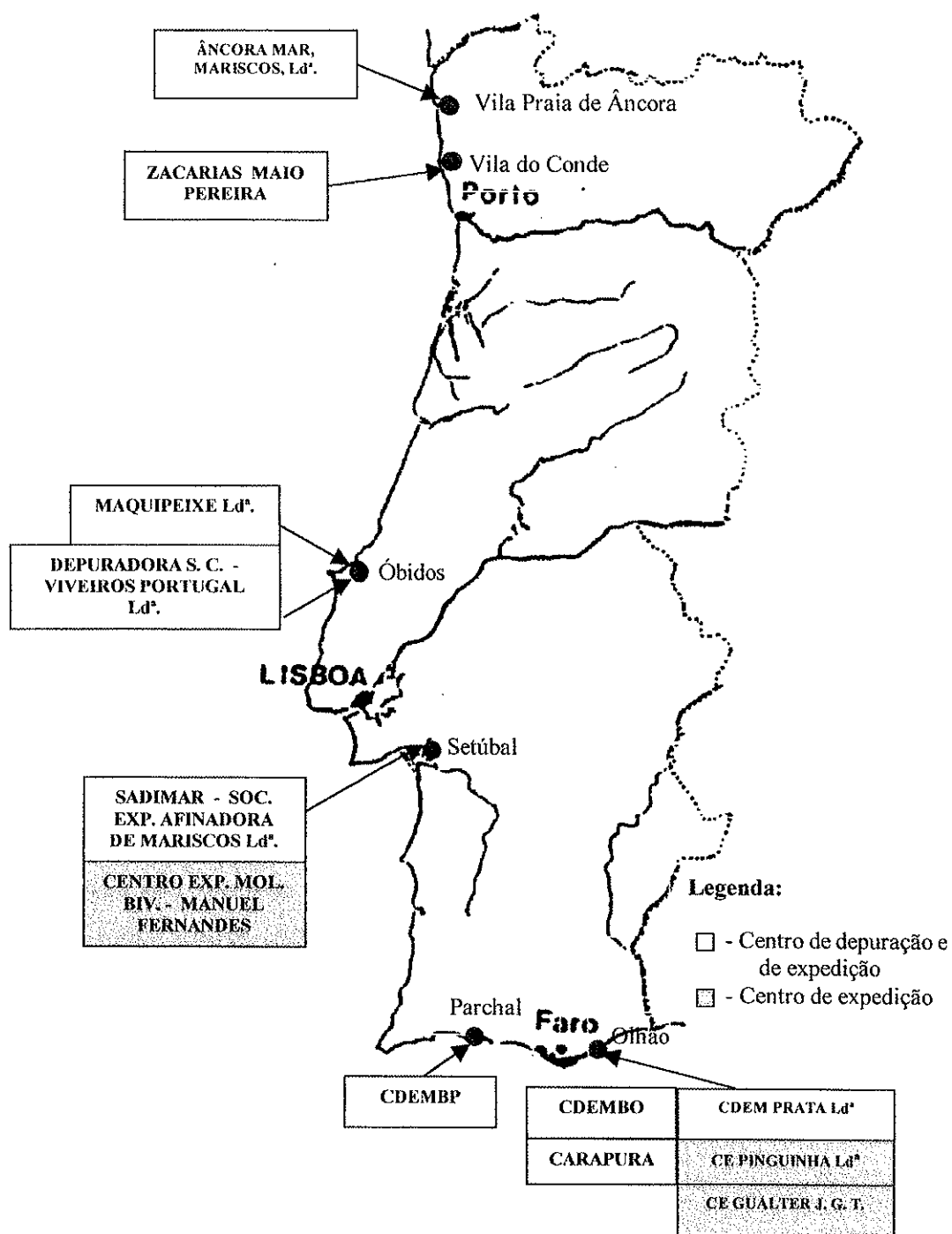
Tendo em consideração os valores obtidos nas análises efectuadas nas amostras de moluscos bivalves recolhidas nas diversas zonas de produção, é elaborada a lista de classificação daquelas zonas, tendo em consideração o conteúdo da legislação transcrita no Quadro 1.

Ainda dentro das atribuições do IPIMAR, procede-se ao controlo do funcionamento dos centros de depuração e ou expedição de moluscos bivalves vivos, através da efectivação de análises tanto à água dos tanques de depuração, quer à entrada quer à saída dos tanques, como aos moluscos bivalves, antes e depois de depurados ou no caso dos centros de expedição, ao produto a expedir.

Conviria salientar que, quer nas zonas litorais costeiras quer nas zonas lagunares, um dos factores determinantes para a poluição das águas e, por consequência, dos moluscos bivalves é o reduzido número de ETAR e o seu deficiente funcionamento ou concepção das existentes. Esta situação torna-se mais evidente nas zonas lagunares onde por via da dinâmica existente nas suas águas, muita das vezes o grau de contaminação é extensivo a grandes áreas onde se produzem bivalves, embora a sua distância do foco de poluição seja considerável.

Por último, queríamos fazer referência ao facto de se constatar que os métodos analíticos aprovados para a determinação dos coliformes fecais serem morosos e não permitirem, em tempo útil, tomar decisões relativamente ao grau de contaminação microbiológica que os moluscos bivalves destinados ao consumo apresentam, tanto à saída dos centros de depuração como dos centros de expedição.

# CENTROS DE DEPURAÇÃO E EXPEDIÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES LICENCIADOS



# SALUBRIDADE DE MOLUSCOS BIVALVES: OCORRÊNCIA DE BIOTOXINAS

S. M. Rodrigues, M. J. Botelho, P. R. Costa, P. Vale e M. A. de M. Sampayo  
Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

---

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de contaminações de bivalves por biotoxinas marinhas, em determinadas áreas específicas e durante certos períodos do ano, deve-se ao facto da alimentação dos moluscos bivalves se efectuar por filtração da água, resultando numa acumulação de metabolitos tóxicos produzidos por espécies fitoplanctónicas existentes nas águas. Em Portugal a produção média anual de bivalves atinge cerca de 10000 toneladas, de modo que a indústria que explora este recurso tem um papel muito importante a nível sócio-económico, pelo que a contaminação dos recursos marinhos por biotoxinas provenientes de determinadas microalgas tóxicas causa anualmente graves prejuízos económicos.

O IPIMAR é a entidade responsável pelo programa nacional de monitorização de biotoxinas marinhas que visa proteger a saúde pública e os recursos marinhos, promovendo o controlo da qualidade dos produtos marinhos, provenientes quer de bancos naturais quer de viveiros de aquacultura e implementando a utilização destes recursos no mercado nacional e internacional com garantias de segurança do produto, minimizando os riscos para a saúde pública. As biotoxinas monitorizadas na costa portuguesa incluem toxinas diarreicas (DSP), paralisantes (PSP) e amnésicas (ASP),

A toxicidade PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) tem como espécie responsável o dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* e desde 1995 que não têm ocorrido episódios de PSP na costa portuguesa. Nos últimos anos as biotoxinas que têm ocorrido com maior frequência, levando a períodos de interdição mais ou menos longos, são principalmente as toxinas do grupo DSP e também as toxinas ASP.

## ASP

O ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*) resulta da contaminação dos moluscos bivalves por ácido domóico (AD), que é uma potente biotoxina marinha produzida por diatomáceas do género *Pseudo-nitzschia*, nomeadamente *P. australis* na costa portuguesa. As toxinas amnésicas foram detectadas pela primeira vez em Portugal em 1995, e desde então têm sido encontradas regularmente nos moluscos bivalves durante períodos curtos comparativamente com as toxicidades produzidas por dinoflagelados (DSP e PSP), que apresentam uma permanência nos moluscos bivalves mais prolongada <sup>[1]</sup>. Estas toxinas também pode afectar pequenos peixes pelágicos como a sardinha e o biqueirão <sup>[2]</sup>.

## DSP

A toxicidade do tipo DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*) tem sido causada pela ocorrência de dinoflagelados tóxicos com relevância para o género *Dinophysis*, principalmente o complexo *D. acuminata* e *D. acuta*. As toxinas que foram inicialmente identificadas em bivalves relacionados com surtos de DSP, foram separadas em três grupos distintos de acordo com a sua estrutura de base: ácido ocadáico e dinofisistoxinas (AO e DTXs), pectenotoxinas (PTXs) e iessotoxinas (YTXs).

*AO e DTXs*: Este grupo de toxinas é constituído por poliéteres lineares com um grupo carboxílico livre e inclui o ácido ocadáico (AO), a dinofisistoxina-1 (DTX1), a dinofisistoxina-2 (DTX2) e a dinofisistoxina-3 (DTX3). Todas estas toxinas têm como estrutura base o esqueleto do AO podendo ser designadas pelo grupo DSP e têm sido encontradas quer em bivalves quer em microalgas.

Os sintomas observados num caso de intoxicação por DSP são diarreia, náuseas, vômitos e dores abdominais. O despoletar dos sintomas após o consumo de bivalves varia entre 30 minutos, nos casos mais graves, até 7 horas, e em mais de 70 % dos casos ocorre em menos de 4 horas, recuperando as vítimas ao fim de três dias <sup>[3]</sup>. Além destes sintomas é também conhecida a acção promotora de tumores do AO em animais de laboratório, no entanto, são ainda desconhecidas as implicações da sua exposição crónica no Homem por consumo de marisco contaminado <sup>[4]</sup>.

*PTX*: Estruturalmente as *PTX* são separáveis em dois grupos, um grupo que possui uma estrutura de éster cíclico (*PTX1-9*), e outro grupo que é designado por “seco ácido” no qual a ligação éster na estrutura cíclica é hidrolisada e expõe ácido carboxílico livre e o álcool (*PTX2SA*). A *PTX2* é produzida por *Dinophysis* spp. que produzem o AO e seus análogos, sendo uma precursora de outras toxinas. Uma vez que nas vieiras as *PTX* aparecem sempre acompanhadas pelas do grupo do AO, torna-se difícil avaliar a contribuição das *PTX* em intoxicações humanas separadamente. A *PTX2* quando administrada oralmente em ratos causa diarreia e danos graves no fígado e intestinos [5].

*YTX*: As espécies de dinoflagelados que têm sido consideradas responsáveis pelas *YTX* são o *Gonyaulax grindleyi* e o *Lingulodinium polyedrum*. Este terceiro grupo de toxinas é constituído pela iessotoxina e seus análogos, e consistem em poliéteres com radicais sulfato. Além da *YTX* foram determinadas as configurações de vários análogos como 45-hidroxi*YTX*; 45,46,47 trino*YTX*; homo*YTX* e 45-hidroxi-homo*YTX* [6].

Geralmente as *YTX* e *PTX* coexistem com o AO nos moluscos bivalves, levando frequentemente a que sejam associadas ao DSP. No entanto, as *YTX* diferem significativamente na estrutura química e efeitos toxicológicos do AO e *DTX*, pelo que devem de ser classificadas num grupo distinto. Não existem relatos de intoxicações humanas causadas pela ingestão de bivalves contaminados com *YTXs*. A presença de *YTX* é conhecida em vieiras e mexilhões provenientes do Japão, Chile, Noruega, Nova Zelândia e Itália. A *YTX* é a mais tóxica das toxinas originais do “grupo DSP” e quando administrada intraperitonealmente em animais causa danos graves no músculo cardíaco; as *YTX* dessulfatadas causam também necrose hepática e pancreal, contudo os efeitos toxicológicos no Homem estão ainda por determinar [7].

*AZA*: Foi descoberta recentemente uma nova classe de toxinas poliéteres após uma intoxicação humana com mexilhões da Irlanda, sendo os sintomas semelhantes aos de DSP. A nova toxina foi isolada e denominada azaspirácido (*AZA*). Para além do *AZA* existem quatro análogos, *AZA2* a *AZA5*. Considera-se que os compostos *AZA*, *AZA2* e *AZA3* possam ser produtos genuínos de um dinoflagelado, que ainda

não identificado, enquanto que o AZA4 e AZA5, serão produtos do metabolismo dos próprios bivalves <sup>[8]</sup>.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Amostragem: O programa de monitorização abrange todos os bancos de bivalves exploráveis nos estuários, lagoas e zona costeira, existindo 45 estações de amostragem fixas. As amostras de bivalves são enviadas para o Laboratório de Biotoxinas Marinhas no IPIMAR, pelos técnicos do IPIMAR através dos CRIP com uma frequência semanal/quinzenal, sendo a amostragem intensificada sempre que sejam detectadas espécies fitoplanctónicas tóxicas na água ou quando existam resultados positivos nas análises de biotoxinas, até que os bivalves fiquem isentos de toxinas e as espécies tóxicas se tornem raras.

Detecção de toxinas ASP: O AD é monitorizado por HPLC através do método de Quilliam *et al.*<sup>[9]</sup>, sendo o nível de tolerância para o AD de 20 µg de ácido domóico/g tecido.

Detecção de toxinas DSP: A monitorização de toxinas DSP é efectuada por bioensaio em ratinhos segundo o método de Yasumoto 84 <sup>[10]</sup>. Considera-se o ensaio positivo quando após injeção intraperitoneal dois em três ratinhos morrem até às 24 horas. Paralelamente é feita a confirmação das toxinas DSP por LC-MS utilizando o método de Suzuki <sup>[11]</sup>. O nível de tolerância para DSP é de 16 µg de AO equivalente/100g tecido.

Detecção de toxinas PTX, YTX e AZA: São detectadas no bioensaio de DSP, difíceis de identificar por métodos químicos, porque não há padrões comercializados.

## **RESULTADOS**

### ASP

Apresentam-se os resultados relativos às biotoxinas do tipo ASP na costa portuguesa nos anos 2000 e 2001. As zonas mais afectadas por ASP durante 2000 foram a Ria de Aveiro (Fig.1) e o Estuário do Mondego, Figueira da Foz (Fig. 2). Na Ria de Aveiro, em 2000 (Fig. 1), várias espécies apresentaram níveis de AD

preocupantes, mas somente o berbigão (*Cerastoderma edule*) apresentou valores que ultrapassaram o limite de tolerância (20 µg AD/g tecido), tendo sido interdita a sua apanha e comercialização. Em 2001 a detecção de AD ocorreu num menor número de espécies sendo o berbigão a espécie onde se detectou o máximo (40,0 µg AD/g tecido) (Fig. 3), no entanto o mexilhão (*Mytilus edulis*) também ultrapassou o limite de tolerância. Este ano não foi necessário interditar a zona por ASP, porque a mesma já se encontrava interdita por DSP. No Estuário do Mondego verificámos que o berbigão e a lambujinha (*Scrobicularia plana*) apresentaram níveis de AD superiores aos limites de tolerância, levando à interdição da apanha e comercialização destes moluscos bivalves na área de jurisdição da Capitania do Porto da Figueira da Foz (Fig. 2).

Na mesma zona em 2001 (Fig. 4), a toxicidade ASP surgiu mais tarde no início do verão, sendo as espécies afectadas o mexilhão e a lambujinha, não se verificando a presença de AD no berbigão. A lambujinha apresentou valores de toxicidade ASP superiores aos do mexilhão, com excepção do pico de 25 de Junho onde o mexilhão apresentou valores superiores. O valor máximo de AD observado até à data (64,6 µg AD/g tecido) foi bastante superior ao máximo detectado em 2000 para o berbigão (29,6 µg AD/g tecido). No Algarve, na Ria de Alvor, durante os meses de Fevereiro e Março de 2001 verificaram-se valores muito elevados de AD na amêijoabo (*Ruditapes decussata*), figura 5, pelo que se procedeu à solicitação da interdição da apanha e comercialização deste bivalve na Ria, área de jurisdição das Capitánias dos Portos de Portimão e Lagos. O máximo detectado foi de 163,0 µg AD/g tecido, oito vezes o limite de tolerância.

### DSP

A toxicidade DSP nos bivalves da costa portuguesa é um fenómeno recorrente, sendo o mexilhão uma das espécies mais afectadas por este tipo de biotoxinas. Apresentam-se os resultados de DSP determinados por bioensaio e por LC-MS para o mexilhão da Ria de Aveiro no ano 2000 (Fig. 6) e no ano 2001 (Fig. 7). Da análise da figura 6 observa-se que a toxicidade DSP surgiu na primavera, tendo

permanecido até ao fim de 2000, obrigando à interdição da apanha e comercialização deste bivalve na Ria de Aveiro por todo esse período. Entre 4 de Setembro e 9 de Outubro as quantidades de AO total determinadas por LC-MS não são suficientes para justificar os tempos médios de sobrevivência observados no bioensaio. Este facto poderá dever-se à presença de outras toxinas que não as do grupo do AO. No ano 2001 (Fig. 7), a toxicidade surgiu mais tarde, no início do verão. Neste ano os valores de AO total que se vêm observando por LC-MS são bastante superiores aos observados no ano anterior. Em 2000 o máximo de AO total detectado foi de 1,76  $\mu\text{g}$  AO total/g hepatopâncreas enquanto que em 2001 até à data, já se atingiu um máximo de 22,4  $\mu\text{g}$  AO total/g hepatopâncreas. Outra espécie que no corrente ano tem sido bastante afectada por DSP é a conquitilha (*Donax* spp.) da zona litoral de Lisboa, Setúbal e Algarve, originando a sua interdição. Os resultados do bioensaio obtidos para esta espécie apresentam-se na figura 8. Observa-se que a conquitilha é um organismo capaz de acumular rapidamente as toxinas em quantidade suficiente para se considerar um ensaio positivo (2 ratinhos mortos às 24 horas). Na conquitilha verificou-se uma depuração mais rápida das toxinas do que no mexilhão, espécie que normalmente é mais afectada por DSP. Na zona litoral do Algarve detectou-se DSP no final de Agosto até fins de Setembro, observando-se um pico máximo de toxicidade ( $0,33 \text{ h}^{-1}$ ) a 18 de Setembro que corresponde a um tempo médio de sobrevivência de três horas. Na zona litoral de Lisboa e Setúbal a toxicidade surgiu durante o mês de Julho e no final de Agosto início de Setembro, sendo os resultados de toxicidade encontrados na conquitilha da zona de Lisboa mais elevados, originando a morte dos ratinhos ao fim de 1 hora após injeção intraperitoneal.

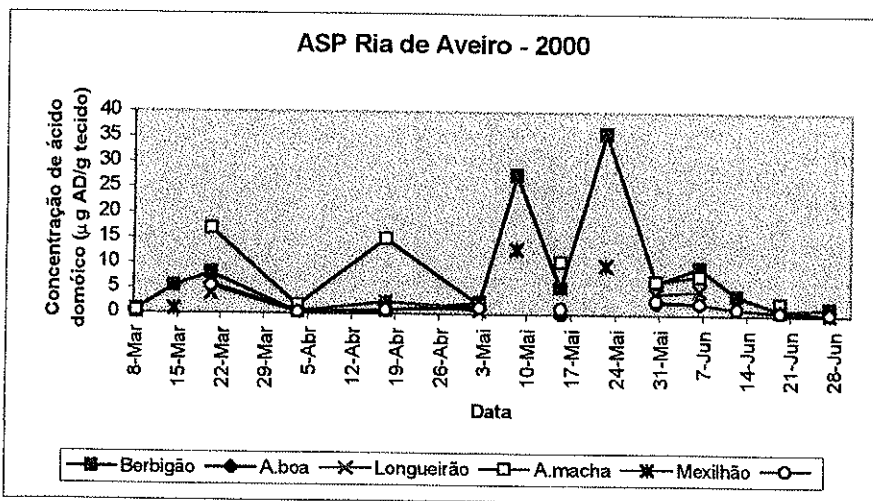


Figura 1 -Toxicidade ASP em bivalves da Ria de Aveiro no ano 2000.

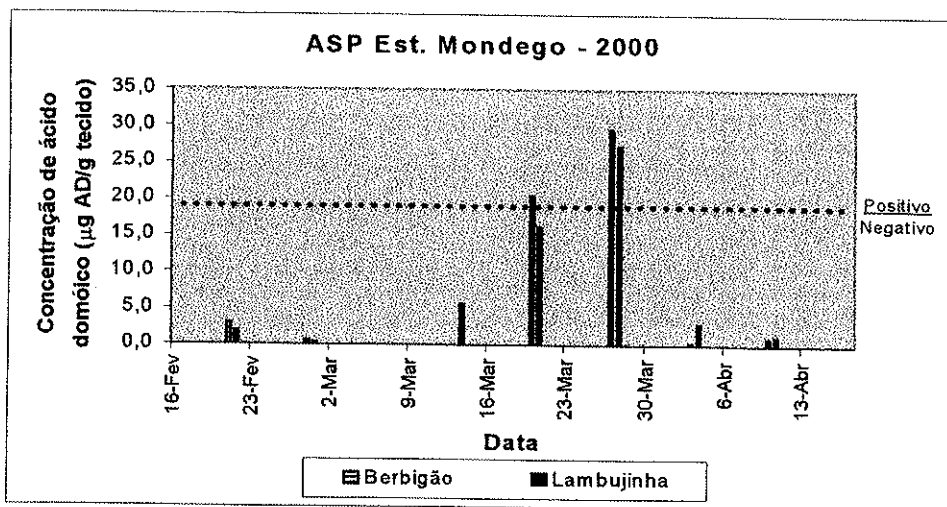


Figura 2 - Toxicidade ASP em bivalves do Estuário do Mondego no ano 2000.

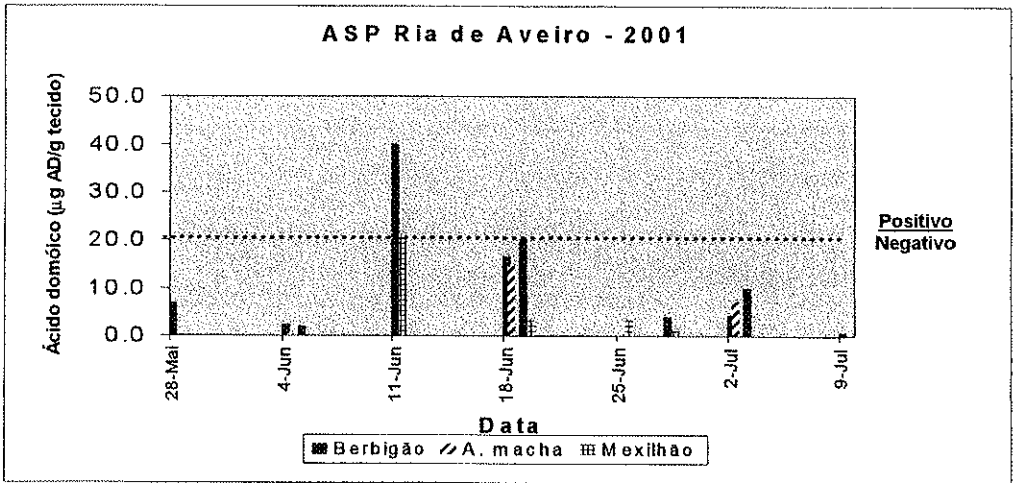


Figura 3 - Toxicidade ASP em bivalves da Ria de Aveiro no ano 2001.

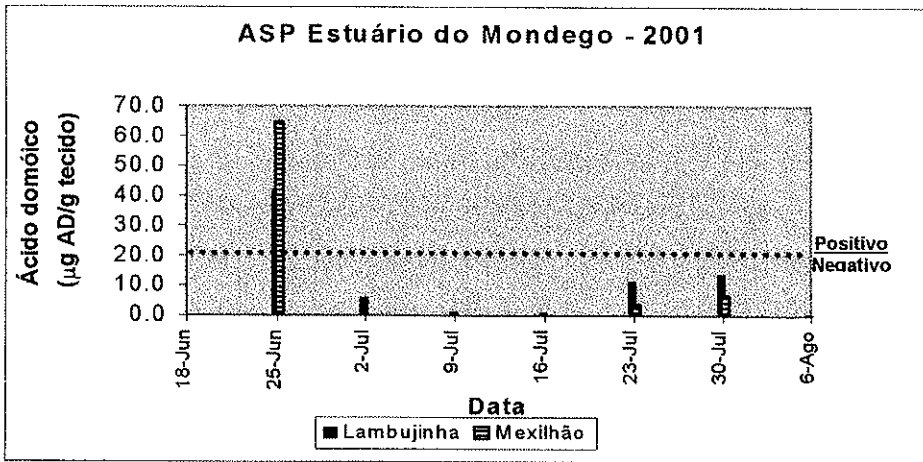


Figura 4 - Toxicidade ASP em bivalves do Estuário do Mondego no ano 2001.

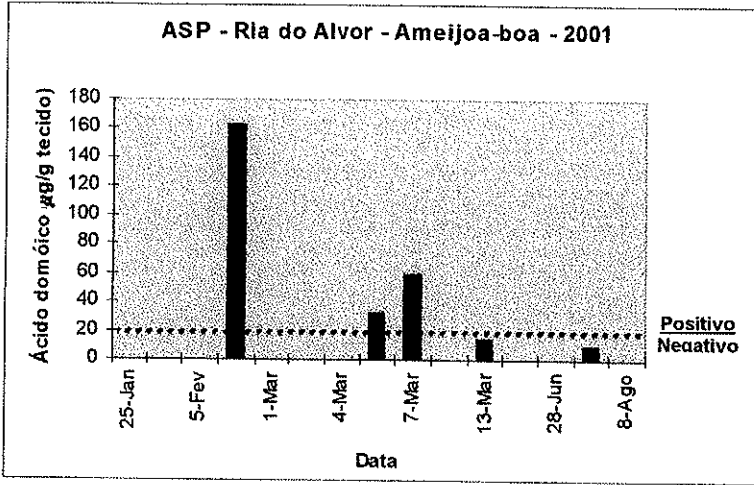


Figura 5 - Toxicidade ASP na amêijoa-boua da Ria de Alvor no ano 2001.

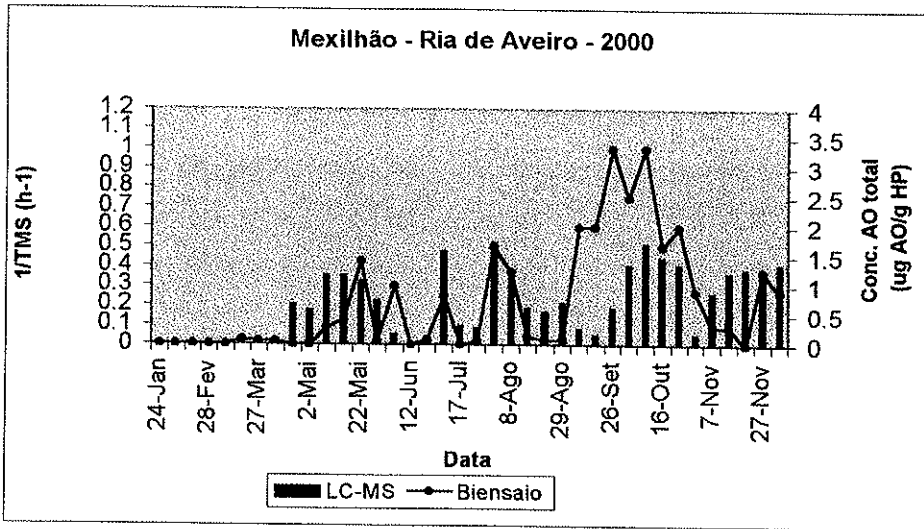


Figura 6 - Toxicidade DSP no mexilhão da Ria de Aveiro no 2000.

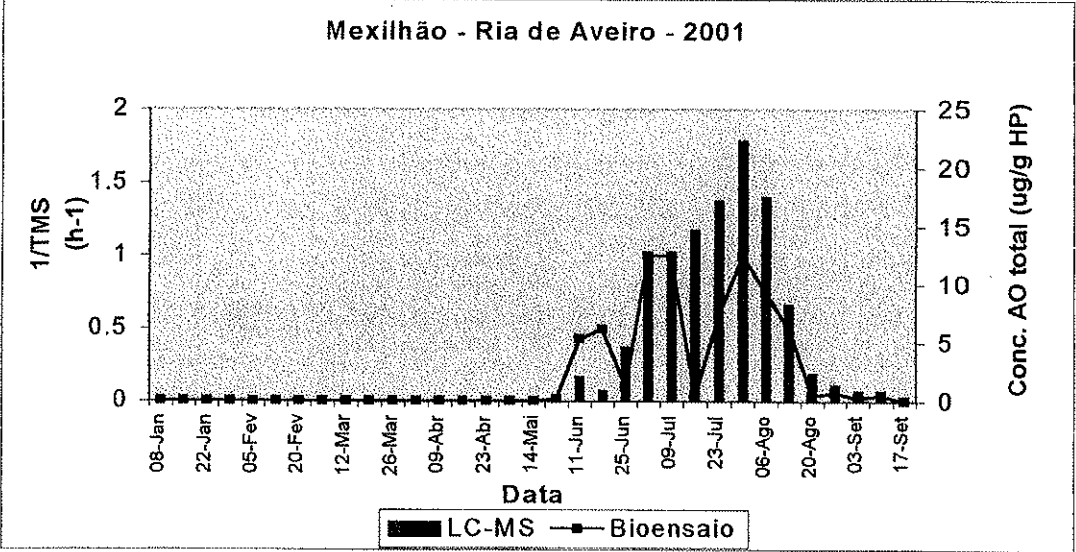


Figura 7 - Toxicidade DSP no mexilhão da Ria de Aveiro no 2001.

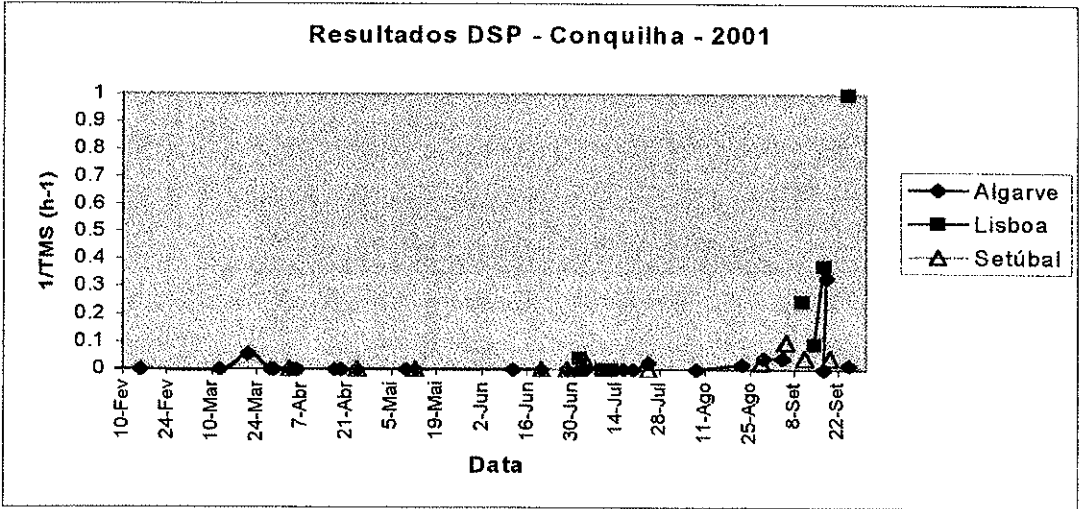


Figura 8 - Toxicidade DSP na conquilha da zona litoral de Lisboa, Setúbal e Algarve.

## **DISCUSSÃO**

### **ASP**

Nestes dois anos atingiram-se níveis de AD bastante elevados, ultrapassando largamente o limite de tolerância estabelecido, com relevo para a amêijoia-boia da Ria de Alvor na Primavera de 2001. Observou-se que a toxicidade ASP é um fenómeno recorrente, que surge principalmente na primavera início de Verão. Apesar de o mexilhão ser normalmente utilizado como espécie indicadora da presença de biotoxinas, verifica-se que no caso do ASP este não é o mais indicado pois existem outras espécies que acumulam mais o AD, como o berbigão, a lambujinha e a amêijoia-macha. Nos episódios de ASP mesmo que os bivalves acumulem níveis muito elevados de AD, a toxicidade pode decair rapidamente para níveis toleráveis em pouco tempo, originando períodos de interdição relativamente curtos quando comparados com os episódio de DSP, que chegam a atingir largos meses.

### **DSP**

A toxicidade DSP é a que mais tem afectado os bivalves provenientes da costa portuguesa, nomeadamente os bivalves provenientes da Ria de Aveiro que tem sido uma zona endémica para estas toxinas, especialmente o mexilhão que tem sido consecutivamente afectado pela contaminação prolongada de DSP. Na detecção das toxinas do grupo DSP verificaram-se algumas discrepâncias entre os resultados obtidos por bioensaio em ratinhos e os resultados de LC-MS. No ano 2001 estas discrepâncias foram menores que as observadas no ano 2000. As diferenças nos resultados obtidos pelos dois métodos é possivelmente justificada pela grande variabilidade que existe num ensaio com animais, pela sua reduzida sensibilidade e tratar-se de um método de largo espectro, podendo acusar vários tipos de toxicidade, contrastando com um método químico como o LC-MS muito preciso e com elevada especificidade. A detecção LC-MS permite um controlo mais rápido e eficaz das toxinas do grupo do AO, enquanto que o bioensaio exige um tempo de observação de 48 horas e não é quantitativo. O bioensaio tem no entanto a vantagem de detectar não só o AO e seus análogos, mas também as PTX, YTX, AZA, e qualquer outra toxina lipossolúvel que ainda se desconheça, protegendo melhor a saúde pública e daí ser o método oficial. O LC-MS pode no entanto ser proposto para a monitorização de áreas

onde o AO e os seus análogos sejam as toxinas dominantes sendo necessário conhecer bem o perfil de toxinas de cada zona. O ensaio de inibição da proteína fosfatase PP2A pode também ser utilizado como método alternativo para a detecção do AO e seus análogos <sup>[12]</sup>.

O reconhecimento da presença de PTX nos bivalves portugueses indica que a toxicidade encontrada pode estar não só associada ao teor de AO e seus análogos, mas também estar fortemente ligada à concentração de PTX2SA. A PTX2SA já foi confirmada em Fevereiro de 1998 em bivalves provenientes do Algarve, e em Março de 1998 em bivalves da região de Setúbal por LC-MS <sup>[5]</sup>.

Presentemente o bioensaio é o único método para a detecção das AZA, PTX e YTX. O método de LC-MS pode ser utilizado como método alternativo ao bioensaio, uma vez que consegue detectá-las, tendo como constrangimento a inexistência de padrões o que não permite a sua utilização generalizada.

A ocorrência de toxinas DSP nos moluscos bivalves não se restringe a um problema de saúde pública, é também um problema sério a nível socio-económico para a indústria do sector.

## REFERÊNCIAS

- [1] Vale P., Sampayo M.A.M (2001). Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon*, 39, 893-904.
- [2] Vale P., Sampayo M.A.M. (2001). Another vector for domoic acid transfer in the marine food web in Portugal: the sardine. Workshop em Produtos da Pesca: Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica, 11 e 12 de Outubro, Lisboa.
- [3] Sampayo, M.A., Rodrigues, S., Botelho M.J., Vale P. (2001). Human toxication by marine biotoxins in Portugal, two confirmed cases. In press in "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algal Blooms", Hobart, Tasmania, Australia, 7-11 February 2000.
- [4] Van Egmond H.P., Aune T., Lassus P., Speijers G.J.A., Waldock M. (1993). Paralytic & Diarrhetic Shellfish poisons: Occurrence in Europe, toxicity, analysis & regulation. *Journal of Natural Toxins*, 2, (1), 41-83.

- [5] P. Vale. (1999) Caracterização de toxinas DSP na costa portuguesa. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Biologia pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- [6] Satake M., Tubaro A., Lee J.S., Yasumoto T. (1997). Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat. Toxins*, **5**, 107-110.
- [7] Terao K., Ito E., Oarada M., Murata M., Yasumoto T. (1990). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patyinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*, **28**, 258-259.
- [8] Ofuji K., Satake M., McMahon T., Silke J., James K.J., Naoki H., Oshima Y., Yasumoto T. (2001). Structures of azaspiracid analogs, AZA4 e AZA5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 740-742.
- [9] Quilliam, M.A. et al (1989). High performance liquid chromatography, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *International Journal Environmental Analytical Chemistry*, **36** 139-154.
- [10] Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K., Clardy, J. (1984) *Seafood Toxins*, ACS Symp. Series Amer. Chem. Soc., **262**, 207-214.
- [11] Suzuki, T., Yasumoto, T. (2000). Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *J. Chromatogr. A*, **874**, 199-206.
- [12] M.J. Botelho, S. Rodrigues, P.R. Costa, M.A.M. Sampayo (2001). Introdução do ensaio de inibição da proteína fosfatase 2A na detecção de toxinas diarreicas em moluscos bivalves. In: Actas 5º Encontro de Química dos Alimentos, pp. 61-63.



## AUTENTICIDADE DE PRODUTOS DA PESCA

Rogério Mendes

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

---

### RESUMO

O incremento das trocas comerciais dos produtos da pesca e o acréscimo do consumo de pescado processado na forma de postas, filetes, polpas e *surimi* veio tornar particularmente importante o problema da correcta identificação das espécies comercializadas. Quando o pescado é transaccionado inteiro, a sua espécie é facilmente identificada pela análise das características morfológicas externas. Todavia, importantes problemas ao nível da garantia da autenticidade têm vindo a surgir com o progresso tecnológico da indústria de transformação e a divulgação da aquisição de pescado e produtos derivados. em que aqueles caracteres não estão presentes ou em que este não é mais do que um ingrediente.

Os indivíduos de uma mesma espécie são caracterizados pela sua composição genética, a qual determina a existência de um conjunto característico de proteínas. Este facto levou a que a maioria dos métodos utilizados na diferenciação e identificação de espécies de pescado em alimentos recorra a vários tipos de análise e separação de proteínas. No entanto, como os ácidos nucleicos são responsáveis pela informação genética, a identificação de espécies também pode ser efectuada por análise de DNA.

Neste trabalho são apresentadas as técnicas mais utilizadas para este fim e alguns dos resultados obtidos durante o desenvolvimento de projectos de investigação nesta área. Referem-se ainda alguns dos principais problemas a ultrapassar, bem como a localização de bases de dados na Internet com informações sobre estas questões.

## INTRODUÇÃO

### Peixes, moluscos e crustáceos com BI

O desenvolvimento das trocas comerciais dos produtos da pesca e o aumento do consumo de pescado processado na forma de postas, filetes, polpas e *surimi* veio tornar particularmente importante o problema da correcta identificação das espécies comercializadas. Em geral, a espécie é facilmente identificada pela análise das características morfológicas externas quando o pescado é transaccionado inteiro. Todavia, o progresso tecnológico no processamento e a divulgação da aquisição de pescado e produtos derivados em que aqueles caracteres não estão presentes ou em que este não é mais do que um ingrediente têm colocado importantes problemas ao nível da garantia da autenticidade. A título de exemplo cita-se, no caso dos cefalópodes, a distinção entre lulas (género *Loligo*) e potas (género *Illex*) cuja identificação não oferece dificuldades, quando os exemplares se encontram inteiros, mas que se torna impossível nos produtos transformados (argolas, mantos ou conservas).

Idênticas questões se levantam também quando o pescado é sujeito a diferentes formas de processamento, como sejam a filetagem, salga, fumagem, esterilização, pasteurização e outras. Tal situação decorre, em particular, da alteração durante o processamento dos caracteres morfológicos externos utilizados na identificação, o que possibilita a substituição de espécies mais valiosas por outras de menor valor comercial e, portanto, a ocorrência de práticas comerciais fraudulentas. A importação de espécies pouco conhecidas de áreas longínquas e a sua comercialização com a mesma designação das tradicionalmente comercializadas ocorre com alguma frequência e, apesar de poderem ser comparáveis em termos nutritivos e organolépticos e do seu consumo poder não envolver quaisquer riscos, levanta sempre dúvidas junto de importadores e consumidores. Assim, podem referir-se, como exemplos, as possíveis substituições de espadarte (*Xiphias gladius*), de tamboril (*Lophius sp.*) e de linguado (*Solea vulgaris*) por espécies muito semelhantes importadas do Pacífico e ainda as trocas que ocorrem com tunídeos e crustáceos. Por estas razões e em virtude do facto das diferentes espécies de pescado, mesmo as

filogeneticamente relacionadas, poderem ter diferentes valores de mercado, é do interesse do industrial, que compra a matéria prima para posteriormente processar e do consumidor, saberem que produto estão a comprar.

Para além dos aspectos acima referidos, a identificação de espécies e o controlo da sua autenticidade, pode ser também encarada como uma questão de controlo de qualidade, em particular, no caso de produtos embalados em que há obrigatoriedade de designação da espécie no rótulo da embalagem. O controlo da concordância entre o indicado no rótulo e a composição real é, no entanto, muito complexo em virtude do elevado número de espécies usadas no consumo humano.

Um dos pré-requisitos para o cumprimento das normas regulamentares é, contudo, a existência de diferentes técnicas que permitam a identificação de diferentes espécies e que possam ser utilizadas em diversos produtos derivados do pescado. O principal problema para o desenvolvimento e aplicação de qualquer técnica analítica é neste caso, o elevado número de espécies de peixe, moluscos e crustáceos que são consumidas em todo o mundo e a variedade de produtos nos quais são transformados, o que torna difícil a utilização de uma só técnica em todas as situações. Por estas razões, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam uma identificação precisa das espécies de pescado tem-se revelado, sobretudo nos últimos anos, de grande importância no controlo da autenticidade dos produtos transformados preparados à base de pescado.

Os indivíduos de uma mesma espécie são caracterizados pela sua composição genética (genoma), a qual determina a existência de um conjunto característico de proteínas. Este facto levou a que a maioria dos métodos utilizados na diferenciação e identificação de espécies de pescado em alimentos recorram a vários tipos de análise de proteínas. No entanto, os ácidos nucleicos e em particular o DNA, ao serem responsáveis pela informação genética, têm também sido utilizados na identificação de espécies.

Assim, para ultrapassar as dificuldades da identificação e permitir um adequado controlo da autenticidade tem-se recorrido, especificamente, a dois tipos de métodos químicos: a electroforese das proteínas e a análise de DNA. Para a identificação de filetes ou músculo de pescado os métodos que assentam na

electroforese clássica revelam-se fiáveis, fáceis de aplicar pelos laboratórios de controlo e, até ao presente, muito mais baratos do que os métodos de análise do DNA, apesar de serem estes os métodos que representam o futuro neste domínio.

Nesta medida, as técnicas electroforéticas constituem, provavelmente, os métodos mais frequentemente usados na análise de proteínas para identificação de espécies. Dentro destas, a técnica a usar depende do tipo de produto a analisar, pois o pescado pode ser submetido a diferentes tipos de processamento, o qual pode alterar a estrutura nativa das proteínas. A electroforese (SDS-PAGE) e focagem isoelectrica (IEF) são as técnicas de identificação de espécies mais utilizadas em pescado fresco e congelado e baseiam-se na especificidade das proteínas de cada espécie. Na focagem isoelectrica estas proteínas, ao serem submetidas a um campo eléctrico num gradiente de pH, migram até ao seu ponto isoelectrico onde se imobilizam, permitindo assim uma separação das proteínas, isto é, perfis proteicos com grande resolução e característicos de cada espécie (Shaklee e Keenan, 1986; Mackie, 1980, 1990). No que se refere à electroforese as proteínas migram numa solução tampão a pH e força iónica constantes e a separação é função, basicamente, da massa molecular destas. No caso particular dos produtos que foram sujeitos a processamento térmico, a identificação torna-se especialmente difícil em virtude das proteínas terem sofrido uma desnaturação e precipitarem como resultado da formação de ligações químicas não covalentes, hidrofóbicas e por pontes de hidrogénio, interacções electrostáticas e possível formação de ligações disulfureto (Mackie, 1990). Neste caso tem de se recorrer a extracções com soluções desnaturantes (sódio dodecil sulfato ou ureia) em conjunto com agentes reductores (2β-mercaptoetanol) para ruptura das ligações disulfureto. O mesmo se passa quando o pescado é sujeito a um processo de esterilização, como é o verificado durante a apertização das conservas, em que as proteínas sofrem uma desnaturação mais acentuada com formação de mais ligações disulfureto e possível desenvolvimento de ligações hidrogenadas, hidrofóbicas e ligações carboxílicas (Carvajal e Gallo, 1984; Mackie, 1990). Quando a autoclavagem é muito drástica, a única forma de solubilização das proteínas é a extracção com uma solução de ácido fórmico e brometo de cianogénio, que provoca a formação de pequenos peptídeos através da ruptura das proteínas ao nível dos resíduos de

metionina (Mackie, 1980; Carvajal, 1984, Mackie *et al.*, 1992). Nestes casos as técnicas mais utilizadas são a electroforese com Excel-Gels (Amersham Biosciences) e a focagem isoelectrica com Clean-Gels (Amersham Biosciences).

A identificação de espécies a partir da análise do extracto aquoso do músculo pode ser efectuada por comparação directa com fotografias de géis de IEF de amostras de referência. Contudo, uma identificação rigorosa requer a comparação da amostra desconhecida com amostras de referência analisadas no mesmo gel. Estas amostras de referência deverão ser constituídas por exemplares inteiros, previamente identificados por um especialista pelos seus caracteres morfológicos externos. Este material certificado pode servir como referência durante pelo menos um ano em congelado sem perda significativa de bandas proteicas fundamentais para a identificação da espécie.

A actividade desenvolvida nesta área no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca inscreve-se no âmbito do controlo de qualidade do pescado e tem em vista prestar apoio aos industriais do sector de transformação e comercialização e às actividades de inspecção, bem como contribuir para melhorar e padronizar as técnicas analíticas. Neste sentido e no âmbito de projectos internos e de projectos europeus de investigação, foram desenvolvidas metodologias específicas para o pescado fresco e congelado e igualmente para os diferentes tipos de produtos derivados do pescado, sujeitos a processamento térmico. Todas estas metodologias foram, numa primeira fase objecto, de uma rigorosa avaliação no decurso da realização de exercícios de intercalibração que contaram com a colaboração de laboratórios de 9 países europeus. Numa segunda fase, procedeu-se ao estudo da influência da variação geográfica no perfil electroforético de algumas espécies e ainda ao estudo da identificação de misturas de pescado. Como resultado deste trabalho existe presentemente uma página na Internet ([www.rivo.dlo.nl/mktv/project-advancedmethods/home.htm](http://www.rivo.dlo.nl/mktv/project-advancedmethods/home.htm)) onde foi sumariada a informação disponível sobre as metodologias de análise e os parâmetros físicos (ponto isoelectrico e/ou peso molecular) das proteínas usadas na identificação de espécies. Esta base de dados de referência e outras existentes na Internet ([www.cfsan.fda.gov/~frf/rfe0.html](http://www.cfsan.fda.gov/~frf/rfe0.html)) contém informação sobre pescado fresco e congelado e ainda sobre pescado processado termicamente e produtos derivados, de

modo a permitir a rápida identificação de amostras desconhecidas sem a necessidade de obter e empregar amostras de referência.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- CARVAJAL, G., 1984. Identificación de escombridos de interés industrial en fresco y en conservas por isoelectrofocalización. *Bol. Inv. Inst. Tec. Pesc.*, 2 (1): 37-43.
- CARVAJAL, G.; GALLO, J., 1984. Electroforegramas de las proteínas de pescado peruanos. *Bol. Inv. Inst. Tec. Pesc.*, 2(1): 25-35.
- MACKIE, I., 1980. A review of some recent applications of electrophoresis and isoelectric focusing in the identification of species of fish in fish and fish products. *In: Advances in Fish Science and Technology*, Ed. Connell, J.J. Fishing News Books, London, 444-451.
- MACKIE, I., 1990. Identifying species of fish. *Analytical proceedings*, 27, 89-92.
- MACKIE, I.; REECE, P.; PEREZ-MARTIN, R.I., 1992. An investigation into methods of identifying species of canned fish. Western European Fish Technologists' Association Meeting, September 8-12th, Lisboa, Portugal, 1-11.
- SHAKLEE, B.J.; KEENAN, C.P., 1986. A practical laboratory guide to the techniques and methodology of electrophoresis and its application to fish fillet identification. CSIRO Marine Laboratories, Report 177, Hobart, 59p.

# Autenticidade de Produtos da Pesca

Rogério Mendes  
Laboratório de Bioquímica  
DITVPP

Slide 1

# Porquê identificar?

Slide 2

# Proteínas do músculo dos peixes

- 20-30% Proteínas Sarcoplásmicas
- 65-75% Proteínas Miofibrilares
- <5% Proteínas dos Tecidos de Ligação

Slide 3

# Migração de proteínas num gradiente de pH

Slide 4

# Electroforese Focagem Isoelétrica

- Separação baseada na carga, peso molecular, forma e tempo
- Aplicação da amostra em zona específica
- Separação continua inace finalmente

Slide 5

# Equipamento de Electroforese e Focagem Isoelétrica

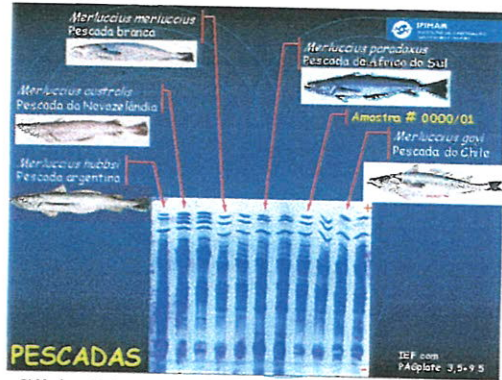
Manual      Automática

Slide 6





Slide 13



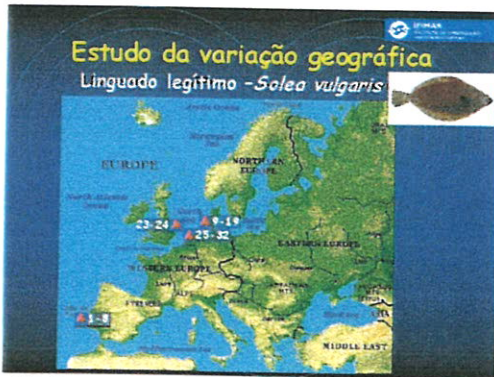
Slide 14



Slide 15



Slide 16



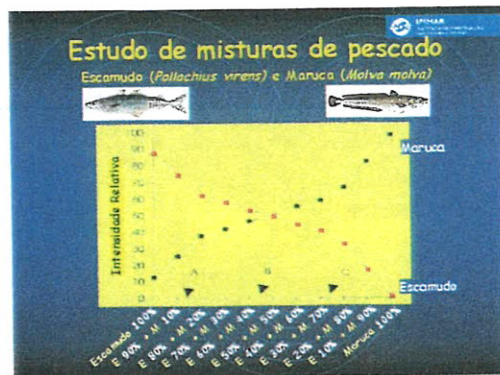
Slide 17



Slide 18



Slide 13



Slide 14

Slide 15

Slide 16

Slide 17

# ROTULAGEM E RASTREABILIDADE DE PRODUTOS DA PESCA

Paulo Vaz-Pires

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Largo Prof. Abel Salazar, 2 4099-003  
Porto

---

## INTRODUÇÃO

Em primeiro lugar, convém analisar a definição de rastreio, por vezes referido, até mesmo em documentos oficiais, como rastreabilidade, embora este termo não exista em português e corresponda a tentativas de tradução da expressão inglesa *traceability*, palavra composta pelos elementos *trace* (to trace=rastrear) + *ability* (capacidade).

O rastreio pode ser definido como "a capacidade de identificar a história, a utilização ou a localização de uma entidade através de registos apropriados" (tradução e adaptação do autor a partir de "the ability to trace the history, application or location of an entity by means of recorded identifications" (ISO 8402).

Assim, são 3 os objectivos gerais do rastreio: se há um problema numa determinada cadeia de produção, neste caso alimentar, pretende-se:

1) identificar os destinos e recolher o produto para evitar o avolumar do problema no destino; pretende-se também 2) identificar a origem e descobrir as causas para evitar o avolumar do problema na fonte e evitar que ocorra no futuro. Se não há nenhum problema, então o rastreio pode 3) reduzir a probabilidade da sua ocorrência, ou seja, tem uma acção preventiva continuada.

O rastreio pode ser interno, ou seja, ser efectuado dentro de uma empresa, desde a recepção de matérias-primas até ao produto final, ou ser efectuado entre empresas, sendo designado como rastreio de percurso ou cadeia; para poder ser efectuado, o rastreio utiliza mecanismos de controlo (instrumentos, ferramentas e métodos para recolher, registar, verificar e transmitir dados).

O rastreio depende, portanto, de registos que podem ser mantidos num determinado local (por exemplo, registar peso em base de dados), podem ser transmitidos ao longo

do percurso, directamente sobre o produto ou mesmo fora dele (por exemplo: etiqueta com peso, guia de marcha), ou podem ainda ser criados de novo durante o percurso (por exemplo: data de descongelação).

O rótulo ou etiqueta é apenas o meio físico que suporta a informação que acompanha directamente o produto, sendo comuns nos produtos alimentares o papel impresso (autocolante), a impressão directa na embalagem ou produto e placas de plástico penduradas ou espetadas, entre muitos outros tipos. É, portanto, frequente a confusão entre rastreio e etiquetagem, embora a etiquetagem seja apenas uma das formas possíveis de tornar visível determinada informação referente ao rastreio. De facto, provavelmente no futuro, apenas uma pequena parte da informação referente ao rastreio será transmitida ou registada em etiquetas visíveis para o consumidor.

As informações que, habitualmente, estão contidas nas embalagens de pescado são bastante diversas e dependem muito do tipo de produto a que se referem, sendo habituais os seguintes tipos de informação, entre outros:

- Nome vulgar e científico
- País e região de origem
- Data e hora de pesca/abate/morte
- Peso, tamanho, calibre
- Tipo de processamento físico/químico
- Importador, exportador
- Transportador
- Informação ambiental
- Informação sanitária (licenças, alvarás, registos)
- Informação promocional
- Informação sobre conservação e preparação, etc.

Em Portugal (como em todos os países da UE) é já comum a utilização de uma etiqueta para produtos de aquacultura, para colocação nas caixas do pescado, que obedece ao seguinte formato geral:

|                                    |  |  |  |
|------------------------------------|--|--|--|
| Pais de origem:<br><b>PORTUGAL</b> | Calibre:<br><b>3 (200-299 g)</b>         | Frescura: <b>3</b><br>Categoria: <b>EXTRA</b><br>Data: <b>27/JAN/2000</b><br>E<br>A<br>B     |  |
| Produto: <b>TRUTA</b>              |  | Nome científico: <b><i>Oncorhynchus mykiss</i></b><br>Nome comercial: <b>TRUTA ARCO-ÍRIS</b> |  |
| Peso líquido:<br><b>5 kg</b>       | Forma de obtenção:<br><b>AQUACULTURA</b> | Modo de apresentação:<br><b>INTEIRA, BRANCA</b><br>Tratamento:<br><b>GELO</b>                | Expedidor:<br><b>TRUTAS DO NORTE</b><br>Nº RSL: <b>12.9435/O</b><br>Morada: <b>ESTR. NAC.</b><br><b>Nº 12 - 4890 LAVRA</b> |

Esta etiqueta, embora seja obviamente útil e possa contribuir para o rastreio, é no entanto geralmente perdida quando o pescado é transferido, por exemplo, da caixa do aquacultor para o expositor da peixaria; assim, o rastreio não é conseguido com a simples criação e utilização de etiquetas, mas sim através da escolha da informação importante e da definição exacta da sua localização e acesso em qualquer dos elos da cadeia produtiva.

Cientes deste facto, as autoridades da UE e dos países membros publicaram legislação comunitária recente (Reg. CE n.º 2065/2001, de 22 de Outubro de 2001), cuja leitura e cumprimento são absolutamente indispensáveis para que o rastreio possa existir neste sector de actividade. Este regulamento estabelece as regras de execução do Reg. (CE) n.º 104/2000 do Conselho, respeitante à informação ao consumidor no sector dos produtos da pesca e da aquicultura.

As etiquetas de desenvolvimento recente conhecidas como TTI (*time-temperature integrators* ou *indicators*, ou seja, integradores tempo/temperatura) merecem aqui referência, por serem uma forma prática de revelar dados sobre a história de temperatura do produto, certamente uma das informações mais importantes num produto alimentar altamente perecível como é o pescado. São também um excelente exemplo de informação que é contínua e automaticamente modificada durante a vida útil do produto.



#### INTEGRADOR TEMPO/TEMPERATURA VITSAB® "CHECK-POINT"

Esta embalagem contém um produto perecível, por natureza a sua qualidade tem uma vida limitada. O tempo de duração da sua qualidade original depende muito do tratamento térmico a que o produto foi sujeito.

**A baixas temperaturas => mais tempo e A altas temperaturas => menos tempo.**

Para melhores resultados à mesa com este produto, é essencial que o mesmo seja conservado sob apropriadas condições de refrigeração durante toda a sua vida: desde o produtor, passando pelo distribuidor e retalhista, até ao consumidor.

O "CHECK-POINT" é desenhado para representar a elevada qualidade deste produto, reagindo às exposições tempo/temperatura exactamente da mesma forma como o produto reage. Indica, via sinais de cor, se o estado qualitativo do produto no momento da leitura é bom ou não para consumo.

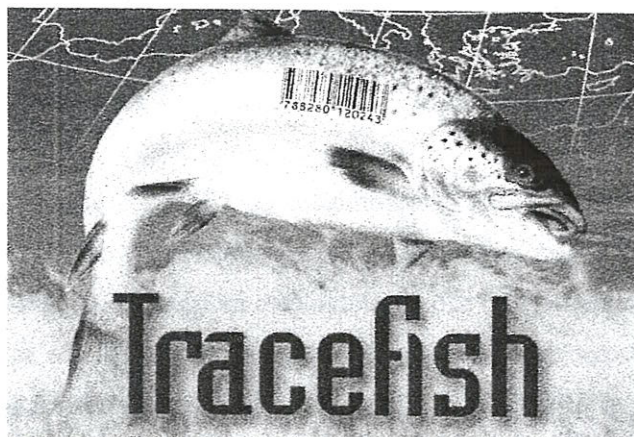
**VERDE para BOM e AMARELO para DUVIDOSO.**

Como o "CHECK-POINT" é integrado na embalagem, no processo de embalamento, ele percorre com o produto toda a cadeia de distribuição e não pode ser dissociado do mesmo.

Mais, como informa sobre a verdadeira e completa história térmica do produto, funciona como um autêntico selo de qualidade e segurança, tornando assim possível evitar que produtos de qualidade duvidosa sejam aceites.

VITSAB® *The sign of freshness™*

## O PROJECTO TRACEFISH (Traceability of Fish Products)



A acção concertada TRACEFISH (abreviatura de Traceability of Fish Products) é um projecto de iniciativa e coordenação norueguesas, que teve início em Dezembro de 2000 e terminará em Novembro de 2002. Participam 20 países, estando representadas, por 48 pessoas, 24 entidades diferentes.

Este projecto tem como objectivo, apenas, o estudo do rastreio do percurso ou cadeia, sendo o objectivo geral e principal a criação de normas de adesão voluntária para uso na indústria do pescado (considerando indústria toda a cadeia de produção

envolvida). As tarefas a desenvolver incluem a escolha da informação relevante, a decisão sobre onde e como a recolher e manter e, ainda, o desenvolvimento do suporte físico e/ou informático conveniente para esses fins. O projecto foi dividido desde o seu início em 3 grupos de trabalho, um dedicado ao pescado selvagem, outro ao pescado de aquacultura e um terceiro dedicado às questões técnicas (suportes electrónicos, etc.).

Entre as primeiras tarefas dos grupos de trabalho, foram esquematizados os percursos do pescado desde a sua origem até ao consumidor; o caso dos moluscos, considerado bastante particular, foi considerado separadamente, já que o rastreio deste produto assume também algumas particularidades especiais.

A informação a tratar foi dividida em 3 grandes tipos diferentes: a chamada informação básica, fundamental ou mínima (por exemplo, a espécie, o peso total), a informação relacionada com a segurança ou crítica (microbiologia, uso de organismos geneticamente modificados) e a considerada informação comercial, adicional ou benéfica (como a cor dos salmonídeos, informação ambiental, etc.). Pretende-se com esta divisão conseguir um escalonamento e uma melhor percepção, em primeiro lugar, da importância da informação a tratar, mas também distinguir melhor quais os níveis de acesso e utilizadores de cada tipo de dados.

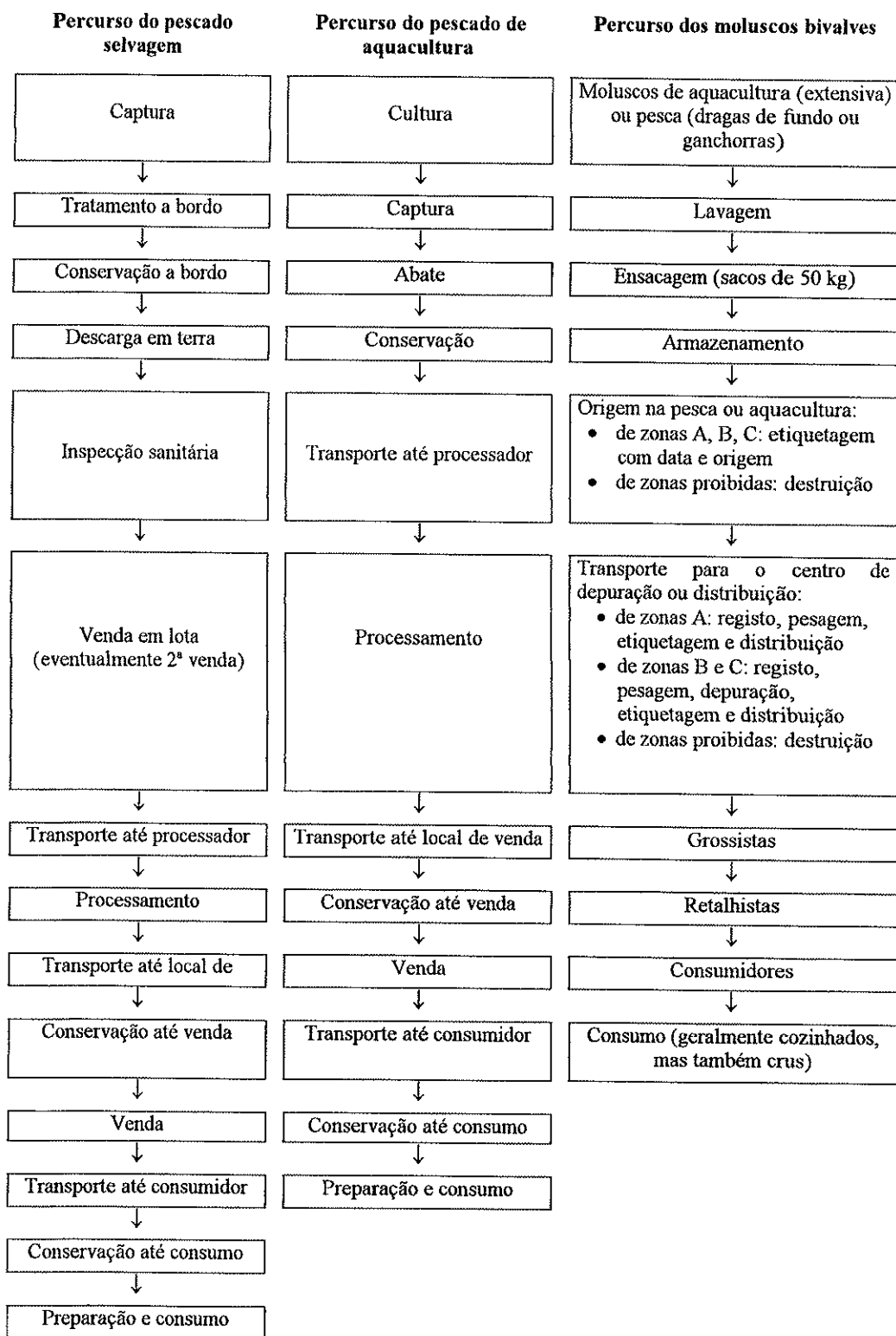
O projecto tem tido, desde a sua criação, a preocupação de ter um âmbito muito alargado a todos os que pretendam participar; para isso, foram criadas várias formas:

- visitar a página do projecto na internet: [www.tracefish.org](http://www.tracefish.org);
- juntar-se à *mailing list*, bastando enviar um *e-mail* para Petter Olsen (coordenador do projecto): [petter.olsen@fiskforsk.norut.no](mailto:petter.olsen@fiskforsk.norut.no), ou para Marianne Midtsand Jensen, (secretária do projecto): [marianne-midtsand.jensen@fiskforsk.norut.no](mailto:marianne-midtsand.jensen@fiskforsk.norut.no);

- assistir às conferências:

Nantes, Setembro de 2001

Amsterdão, 7 e 8 Março de 2002



Barcelona, Outono de 2002

- sugerir conferencistas a convidar;
- participar num dos 3 grupos de normalização: pescas, aquacultura e assuntos técnicos

## **FUTURO E PERSPECTIVAS**

Em relação ao futuro após o projecto, prevêem-se as seguintes fases graduais de aplicação do rastreio no sector do pescado, já que se trata de um sector com muitas tradições e pouco receptivo a mudanças de hábitos antigos:

- avaliação de necessidades
- normalização de informações e suportes
- publicação das normas de rastreio de adesão voluntária
- obrigação legal em unidades novas
- obrigação em algumas unidades (a definir)
- obrigação em todas as unidades

Espera-se assim, com o projecto e, no futuro, com a aplicação do rastreio ao sector do pescado, conseguir uma melhor segurança e uma maior capacidade de resposta, especialmente antes de surgirem no pescado problemas graves de saúde pública, como infelizmente aconteceu já noutros sectores da indústria alimentar, com os prejuízos e custos que são do conhecimento público.

## **BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA**

- Howgate, P.; Johnston, A.; Whittle, K. J., 1992. Multilingual Guide to EC Freshness Grades for Fishery Products. Torry Research Station, Food Safety Directorate, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Aberdeen, UK.
- Huss, H. H., 1988. Fresh Fish Quality and Quality Changes. FAO Fisheries Series No. 29, Roma (disponível grátis em [www.fao.org/docrep/V7180E/V7180E00.htm](http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180E00.htm)).

- Huss, H. H., 1993. Assurance of Seafood Quality. FAO Fisheries Technical Paper No. 334, Roma.
- Ólafsdóttir, G.; Lutén, J.; Dalgaard, P.; Careche, M.; Verrez-Bagnis, V.; Martinsdóttir, E.; Heia, K. (Eds.), 1998. In: Methods to determine the freshness of fish in research and industry. *International Institute of Refrigeration*, Paris, França, 396 p.
- Pedrosa-Menabrito, A.; Regenstein, J. M., 1988. Shelf-life extension of fresh fish - a review. Part I - Spoilage of fish. *Journal of Food Quality* 11, p. 117-127.
- Pedrosa-Menabrito, A.; Regenstein, J. M., 1990. Shelf-life extension of fresh fish - a review. Part II - Preservation of fish. *Journal of Food Quality*, 13: 129-146.
- Pedrosa-Menabrito, A.; Regenstein, J. M. (1990). Shelf-life extension of fresh fish - a review. Part III - Fish quality and methods of assessment. *Journal of Food Quality*, 13: 209-223.

## PÁGINAS DA INTERNET SOBRE PESCADO

| TEMA  | ENDEREÇO  |
|---|---|
| CIIMAR (Centro Interdisc. Inv. Marinha e Amb.) da UP                    | <a href="http://www.cimar.org">http://www.cimar.org</a>   |
| Conversor/dicionário para as línguas da UE                              | <a href="http://eurodic.echo.lu/cgi-bin/dicbin/EuroDicWWW.pl">http://eurodic.echo.lu/cgi-bin/dicbin/EuroDicWWW.pl</a> |
| Deptº Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca (IPIMAR) | <a href="http://www.ipimar.pt">http://www.ipimar.pt</a>   |
| Deptº Tecnologia de los Productos Pesqueros (Univ. Santiago de Comp.)   | <a href="http://www.usc.es/banim/doc/tpp.htm">http://www.usc.es/banim/doc/tpp.htm</a>                                 |
| DG Pescas e Aquicultura (MADRP)   | <a href="http://www.dg-pescas.pt">http://www.dg-pescas.pt</a>   |
| DG XIV (Comissão Europeia-Pescas)                                       | <a href="http://www.europa.eu.int/comm/dg14/dg14.html">http://www.europa.eu.int/comm/dg14/dg14.html</a>               |
| Food and Agriculture Organization (UN)                                  | <a href="http://www.fao.org">http://www.fao.org</a>   |
| Food and Drug Administration (USA)                                      | <a href="http://www.fda.gov">http://www.fda.gov</a>   |
| Grupo de Trabalho do Pescado (ESB/UCP)                                  | <a href="http://www.esb.ucp.pt/pescado">http://www.esb.ucp.pt/pescado</a>   |
| Identificação de peixes   | <a href="http://members.xoom.com/Tautog639/ICHTY_LIST.htm">http://members.xoom.com/Tautog639/ICHTY_LIST.htm</a>       |
| Lota de pescado on-line   | <a href="http://www.eurofishsales.com/frames.htm">http://www.eurofishsales.com/frames.htm</a>                         |
| Mín. Agricult., Pescas e Alimentação                                    | <a href="http://www.min-agricultura.pt">http://www.min-agricultura.pt</a>   |
| Projecto europeu sobre Frescura de Peixe                                | <a href="http://info.rfisk.is/verkefni/1139">http://info.rfisk.is/verkefni/1139</a>                                   |
| Quality Index Method  | <a href="http://qimit.rfisk.is">http://qimit.rfisk.is</a>   |
| Seafish Industry Authority (UK)   | <a href="http://www.seafish.co.uk">http://www.seafish.co.uk</a>   |
| Seafood Network Information Center (USA)                                | <a href="http://seafood/ucdavis.edu/home.htm">http://seafood/ucdavis.edu/home.htm</a>                                 |

## LEGISLAÇÃO E NORMALIZAÇÃO NO SECTOR DA PESCA

M. Abreu Dias  
Alicontrol Lda.

---

A abordagem do tema Legislação e Normalização num seminário sobre Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica visa, por um lado, caracterizar o quadro normativo legal que rege a instalação e funcionamento dos navios e estabelecimentos em que decorrem as actividades do sector das pescas, avaliando a sua clareza, facilidade de aplicação e nível de eficácia e, por outro lado, referenciar aquela legislação que especificamente estabelece normas que visam a higiene e segurança.

Seis diplomas legais enquadram praticamente todos os aspectos fundamentais do ponto de vista legal, para garantia da segurança dos produtos da pesca. São eles:

- O Decreto Regulamentar 61/91, de 27 de Novembro que institui o Regulamento do Exercício da Actividade da Indústria Transformadora da Pesca em Terra – RAIP.

- O Decreto Lei 293/98, de 18 de Setembro, que aprova as normas sanitárias relativas à produção e colocação no mercado de moluscos bivalves vivos.

- O Decreto Lei 375/98, de 24 de Novembro, que fixa as normas mínimas de higiene aplicáveis aos produtos da pesca obtidos a bordo de determinados navios e as normas sanitárias relativas à produção e colocação no mercado dos produtos da pesca destinados ao consumo humano.

- O Decreto-Lei 67/ 98, de 18 de Março, que estabelece as normas gerais de higiene a que devem estar sujeitos os géneros alimentícios, bem como as modalidades de verificação do cumprimento dessas normas.

- O Decreto Regulamentar 14/ 2000, de 21 de Setembro, que define os requisitos e condições relativos à instalação e exploração dos estabelecimentos de culturas marinhas e conexos, à atribuição de autorizações e licenças e as condições da sua transmissão e cessação.

- O regulamento (CE) n° 2406/96 do Conselho, de 26 de Novembro, relativo à fixação de normas comuns de comercialização para certos produtos da pesca, que inclui tabelas de cotação de frescura do pescado.

Para além destes diplomas, que são de cumprimento obrigatório, há uma série de documentos normativos, de que se destacam os Códigos de Boas Práticas para Pescado Fresco, para Pescado Congelado e para Pescado Picado, editados pela Comissão Técnica de Normalização CT-25 e ainda várias normas com recomendações tecnológicas, higiénicas e de interesse comercial.

Pode dizer-se que este arsenal normativo contém tudo o que as empresas do sector do pescado devem conhecer e praticar para assegurarem a legalidade dos seus estabelecimentos e garantirem a salubridade dos seus produtos.

## **LICENCIAMENTO DE ESTABELECEMENTOS DO SECTOR DAS PESCAS**

A primeira medida em termos de higiene e segurança dos produtos da pesca é ter os estabelecimentos e navios licenciados e dotados do respectivo número de controlo veterinário.

O licenciamento e a concessão de licença de laboração dos navios e estabelecimentos de pescado é da competência da Direcção Geral das Pescas e Aquicultura, sendo o respectivo número de controlo veterinário atribuído pela Direcção Geral de Veterinária. É este número que identifica os estabelecimentos que reúnem as condições técnico-funcionais e hígio-sanitárias necessárias para assegurar a salubridade dos produtos. Constitui pois um aval de confiança para os agentes económicos, permite a circulação dos produtos no espaço intracomunitário e é o elemento de referência para efeitos de controlo e fiscalização pelos organismos oficiais nacionais e comunitários.

O processo de licenciamento de navios de pesca é omissa na legislação, embora estejam definidas no Decreto-Lei 375/98, as condições, estruturais, funcionais e higiénicas a que devem obedecer.

O licenciamento de estabelecimentos em terra é regulamentado pelo RAIP. Curiosamente, todas as actividades industriais, quer extractivas quer de transformação,

incluindo as restantes indústrias alimentares, são regidas por um outro regulamento, o Regulamento do Exercício da Actividade Industrial (REAI), posto em vigor em 15 de Março de 1991, pelo Decreto Regulamentar 10/91, que foi depois alterado pelo Decreto Regulamentar 25/93, de 17 de Agosto.

Sendo o objectivo do legislador simplificar o processo de licenciamento industrial, não se compreende porque razão o pescado dispõe de um regulamento específico, feito à semelhança do REAI, apenas com pequenas diferenças que não justificam a necessidade de um regulamento exclusivo, nomeadamente as peças para instrução do processo, as classes e o critério de classificação das indústrias, que é de A a D para todas as indústrias do REAI e I e II classe, para as das pescas.

Em contrapartida não há qualquer diploma legal que estabeleça os procedimentos a seguir por quem pretender licenciar um navio de pesca. À falta de regulamento específico está a utilizar-se o RAIP.

O RAIP estabelece as regras hígio-sanitárias, técnico-funcionais e de segurança, a que devem obedecer os estabelecimentos de preparação, congelação, transformação e acondicionamento e embalagem de produtos da pesca e da aquicultura em terra, bem como a sua armazenagem e transporte.

Não sendo a armazenagem nem o transporte actividades industriais, mas sim comerciais, o seu enquadramento aqui não é claro e choca com o disposto em legislação mais recente, o Decreto-Lei 370/99, de 18 de Setembro, que estabelece o regime a que está sujeito a instalação dos estabelecimentos de comércio ou armazenagem de produtos alimentares.

Os estabelecimentos abrangidos por este diploma constam da Portaria 33/2000, de 28 de Janeiro, na qual se encontram incluídos os estabelecimentos de Comércio por Grosso de Peixe, Crustáceos e Moluscos (CAE 51381) e os Armazéns Frigoríficos (CAE 63121). As entidades que coordenam e centralizam o processo de licenciamento destes estabelecimentos, são as câmaras municipais, que seguem para esse efeito o regime de licenciamento municipal de obras particulares.

Na mesma situação de eventual sobreposição de competências se encontra a actividade de recepção e comercialização de crustáceos vivos, cuja importância económica é cada vez maior. O processo de licenciamento e as condições a que devem

obedecer os estabelecimentos para essa actividade encontram-se definidas no Decreto Regulamentar 14/200.

Contudo os Depósitos de crustáceos vivos, tal como se encontram definidos no citado decreto regulamentar, enquadram-se na CAE 51381 – Comércio por Grosso de Peixe , Crustáceos e Moluscos, constante da Portaria 33/2000 e cujo processo de licenciamento é regido pelo Decreto-Lei 370/99.

Finalmente, a competência para apreciação dos projectos e licenciamento dos estabelecimentos de indústrias alimentares, está ainda dividida entre a Direcção Geral de Veterinária e a Direcção Geral de Fiscalização e Controlo da Qualidade dos Alimentos, consoante se trate de produtos frescos ou transformados. Este facto que levou à necessidade de definir a fronteira entre produtos frescos e produtos transformados e obrigou ao estabelecimento de protocolos entre aquelas Direcções Gerais e a Direcção Geral das Pescas e Aquicultura, para definir o âmbito de intervenção de cada uma, cria situações complexas para a indústria, sempre que no mesmo estabelecimento se pratiquem tecnologias diversificadas, abrangendo tanto produtos transformados como frescos. Na prática leva a atrasos, vistorias diferenciadas e grandes perdas de tempo.

Conforme se verifica, o processo de licenciamento é complexo, carecendo de uma revisão para simplificação e uniformização processual, com eliminação das competências sobrepostas que se identificaram. No que se refere ao fim do desdobramento entre produtos frescos e transformados pensamos que a situação se resolve com a entrada em funções da Agência para a Qualidade e Segurança Alimentar, uma vez que esta absorverá todas as competências nesta matéria.

## **LEGISLAÇÃO HÍGIO-SANITÁRIA DO SECTOR**

Os diplomas já citados (Dec.Reg. 61/91; Dec.Lei 293/98 e Dec.Lei 375/98), integram no seu texto ou nos seus anexos, todos os aspectos de natureza estrutural, funcional e higiénica que devem ser aplicados e cumpridos pelos agentes económicos do sector das pescas, responsáveis pelo projecto, construção e funcionamento dos estabelecimentos.

Não cabe no âmbito desta exposição referir em detalhe, todos esses aspectos claramente definidos nesses diplomas, os quais em nosso entender, salvo dois ou três pequenos pontos de interesse discutível ou até inconveniente, são de aplicação e cumprimento possível em qualquer estabelecimento, de pequena ou de grande dimensão.

Merece contudo alguma reflexão o ponto nº 5 do Anexo do Decreto Lei 375/98, que se transcreve:

*5.1 – Os responsáveis pelos estabelecimentos devem tomar todas as medidas necessárias para que em todos os estádios da produção dos produtos da pesca sejam observadas as prescrições do presente diploma.*

*5.2 – Para efeitos do disposto no ponto 2.1, os responsáveis pelos estabelecimentos devem efectuar autocontrolos baseados nos seguintes princípios:*

- a) Identificação dos pontos críticos dos seus estabelecimentos, em função dos processos de fabrico utilizados;*
- b) estabelecimento e aplicação de métodos de vigilância e de controlo desses pontos críticos;*
- c) colheita de amostras para exame num laboratório aprovado pela DGV, para efeitos de controlo dos métodos de limpeza e de desinfeção e verificação das normas estabelecidas pelo presente diploma;*
- d) Conservação de um vestígio escrito ou registado de forma indelével dos pontos anteriores, por um período de dois anos.*

A obrigatoriedade do estabelecimento de um plano de autocontrolo aqui exclusivamente reportada aos produtos da pesca, é reforçada pelo Decreto- Lei 67/98, que a torna extensiva a todos os produtos alimentares.

Os princípios enunciados em que se deve basear o plano de autocontrolo, são os do método de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos, habitualmente designado pela sigla inglesa HACCP. Assim, embora a legislação não obrigue à implementação do referido método, na prática verifica-se que para satisfazer o definido nas quatro alíneas do ponto 5.2, é necessário aplicar os passos correntes do método HACCP.

Importa sublinhar que a legislação citada, representa a introdução no ordenamento jurídico nacional, de Directivas Comunitárias do sector veterinário, as quais vão ser substituídas a curto prazo por um regulamento que uniformiza critérios, que as directivas não uniformizavam. Neste novo regulamento, que se encontra presentemente em apreciação no Parlamento Europeu e que se espera que entre em vigor durante o próximo ano, a implementação do método HACCP, passa a ser obrigatória.

Torna-se pois necessário que as empresas encarem seriamente a necessidade da implementação dos seus Planos de Autocontrolo, para cuja eficácia é imprescindível a formação do pessoal e o empenhamento das Direcções das empresas. A sua implementação poderá apresentar dificuldades em empresas de pequena dimensão, por falta de quadros com formação adequada, mas o recurso a empresas de consultoria e o apoio das entidades de tutela e controlo do sector permitirão ultrapassar essas dificuldades.

Constitui uma dificuldade acrescida, senão mesmo uma impossibilidade de estabelecimento correcto de um Plano de Autocontrolo, o facto do pescado ser exposto nas lotas, sem gelo, à temperatura ambiente ( independentemente do tempo de exposição), em caixas assentes directamente no chão, que depois vão ser empilhadas umas sobre as outras, contrariando normas higiénicas básicas e a própria legislação, que determina que o pescado fresco deve ser mantido à temperatura do gelo fundente.

Verificando-se este tipo de situação em estabelecimentos com controlo oficial, como podem os agentes que se situam a juzante das lotas aplicar criteriosamente o seu próprio plano de autocontrolo?

É este pois o quadro legal e operacional, em que se desenvolvem as actividades da pesca no que se refere a legalização das empresas e segurança dos produtos.

As normas disponíveis, que com carácter de recomendação, informação ou de obrigatoriedade, abordam procedimentos tecnológicos e higiénicos e critérios de classificação de interesse comercial, permitirão aos agentes económicos nos diferentes níveis da cadeia de produção e comercialização de pescado, assegurar o correcto

funcionamento das suas empresas e garantir a salubridade dos seus produtos, desde que sejam melhoradas as condições actuais ao nível da primeira venda e se simplifiquem os processos administrativos de licenciamento dos estabelecimentos.



**PAINÉIS**



**EFFECT OF TEMPERATURE ON MODIFIED ATMOSPHERE  
PACKED SARDINE MINCE**

López, M.E., Silva, H., Vicente, S. and Nunes, M.L.

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

Avenida de Brasília 1449-006 Lisboa

---

**INTRODUCTION**

Modified atmosphere packaging (MAP) in combination with chilled temperatures has been shown to extend the shelf-life of fish products. Due to the fluctuations of temperature suffered by these products from packaging to consumption, specially during summer time, the aim of this study was to determine the effect of the temperature storage on packed sardine mince under a gas mixture containing 40%CO<sub>2</sub>/30%O<sub>2</sub>/30%N<sub>2</sub>.

**MATERIAL AND METHODS**

Sardine (*Sardina pilchardus*) muscle was minced and packed in adequated bags. The assayed mixture was 40%CO<sub>2</sub> / 30%O<sub>2</sub> / 30%N<sub>2</sub> (mince sardine/gas ratio 1:2). Control mince sardine was packed in air. Packages were stored both at 0 and 10°C for 6 and 12 days. The following analyses were carried out: pH (surface electrode), histamine (Ritchie, 1991) and enterobacteria (VRBG) incubated at 30°C/48 h.

**RESULTS AND DISCUSSION**

The pH values seemed to be unaffected by storage conditions (Fig. 1). At chilled temperatures (0°C), the gas mixture assayed prevents the growth of enterobacteria on sardine mince, and therefore the production of histamine by microbial decarboxylation of free histidine, especially at the end of the storage period (Figs. 2 and 3).

However, this effect was not clearly observed on packed sardine mince stored at abusive temperature (10°C). The beneficial effect of CO<sub>2</sub> (i.e. extending the latency phase and decreasing the exponential growth of microorganisms) is reduced with higher storage temperature (Statham, 1984, Farber, 1991) or even barely shown.

## CONCLUSION

Modified atmosphere packaging could extend the shelf-life of fish product due to the inhibitory effect of the CO<sub>2</sub> on microbial growth, and therefore the decrease of compounds resulting from the microbial metabolism, but this effect depends on the storage temperature.

## REFERENCES

- Farber, J.M., 1991. Microbiological aspects of modified-atmospheres packaging technology – A review. *J Food Prot.* 54: 58-70.
- Ritchie, A.H., 1991. The Torry Station method for biogenic amines by HPLC. Torry Research Station, Aberdeen, Scotland, pp 14.
- Statham, J.A., 1984. Modified atmosphere storage of fisheries product: the state of the art. *Food Technol.* 36(5): 233-239.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by EU Grant QLK5-CT-1999-51468.

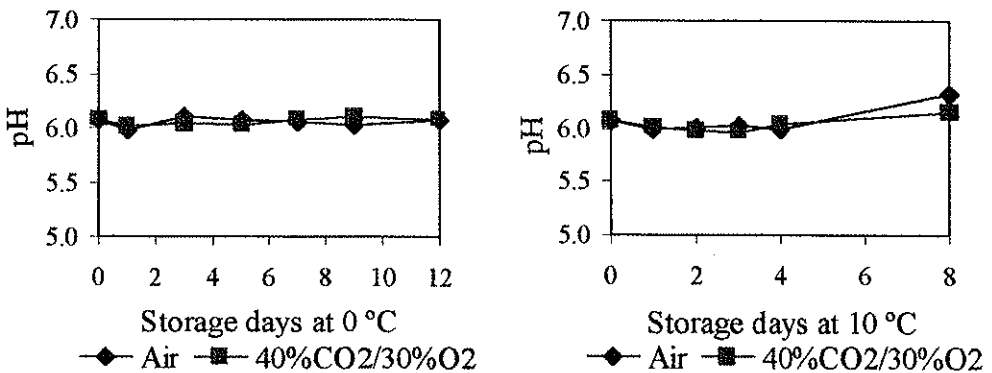


Fig. 1. pH evolution during storage of sardine mince at 0° and 10 °C.

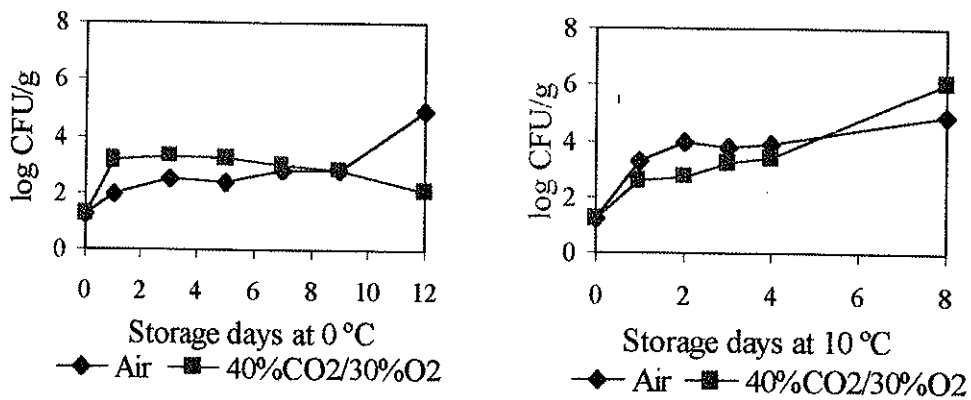


Fig. 2. Counts of enterobacteria in sardine mince stored at 0 ° and 10 °C.

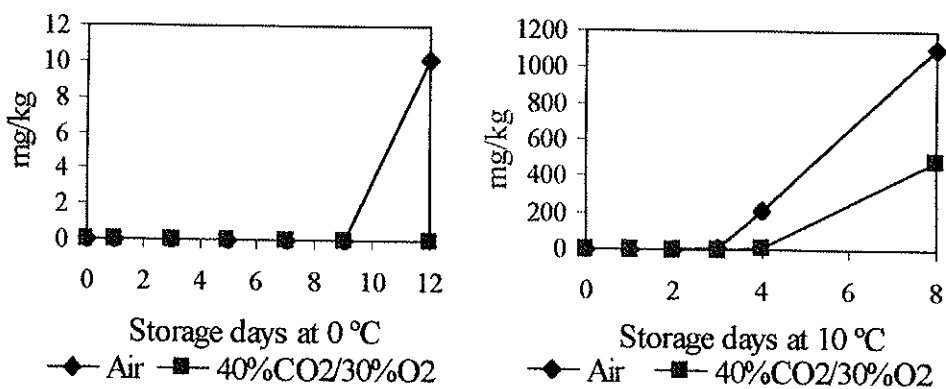


Fig. 3. Histamine production during storage of sardine mince at 0 ° and 10 °C.



**COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLOGIA DO LAGOSTIM  
*NEPHROPS NORVEGICUS* (CRUSTACEA: DECAPODA) DA COSTA  
SUL PORTUGUESA**

Rui Afonso Rosa e Maria Leonor Nunes

Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa; e-mail: rrosa@ipimar.pt

---

**RESUMO**

O objectivo deste estudo foi conhecer de que forma a composição bioquímica do lagostim, *Nephrops norvegicus* (L.), é influenciada pela maturação sexual e reprodução. Os lípidos totais e respectivas classes, o perfil de ácidos gordos e os teores de colesterol e glicogénio foram determinados no hepatopâncreas (HP) e nas gónadas. O teor lipídico dos ovários aumentou durante o processo de maturação, mas não se verificou um decréscimo concomitante do teor lipídico no hepatopâncreas. Nas gónadas e no HP foi obtida uma elevada percentagem de triacilgliceróis (TAG). Dado que, tanto nos ovários como no HP, o teor em colesterol aumentou com a maturação, não se verificou uma mobilização do colesterol do HP para os ovários. Por outro lado, os teores em proteína e glicogénio nos ovários e HP não revelaram variações significativas nos diferentes estados de maturação. Tanto nos ovários como no HP os ácidos gordos dominantes foram: 16:0, 18:1(n-7), 18:1(n-9), 20:5(n-3) e 22:6(n-3), e um aumento significativo da fracção monoinsaturada e polinsaturada parece indicar que estes compostos são as principais fontes energéticas durante o desenvolvimento embrionário e pré-larvar.

Palavras-chave: Composição bioquímica, *Nephrops norvegicus*, reprodução.

## INTRODUÇÃO

O lagostim, *Nephrops norvegicus* (L.), é um dos recursos haliêuticos mais valiosos no Nordeste Atlântico, sendo explorado desde a Islândia até Marrocos, incluindo o mar Mediterrâneo (Maynou e Sardà, 1997). Embora haja um vasto conhecimento da sua biologia e pesca, os estudos bioquímicos relacionados com a biologia reprodutiva deste recurso haliêutico são escassos.

A acumulação e mobilização das reservas lipídicas constituem um dos processos metabólicos mais importantes na fisiologia reprodutiva dos crustáceos. Os compostos azotados desempenham um papel fundamental na síntese proteica durante a vitelogénese e na síntese de ácidos nucleicos durante espermatogénese (Jeckel *et al.*, 1989). Os hidratos de carbono são metabolicamente importantes no ciclo de Krebs, armazenamento de glicogénio, síntese de quitina e formação de esteróides e ácidos gordos (New, 1976). Uma vez que a reprodução destes invertebrados é regulada por hormonas esteróides, um aspecto importante na esteroidogénese é o estudo da mobilização das reservas do precursor esteróide colesterol (Teshima e Kanazawa, 1971).

Neste sentido, o objectivo deste estudo foi conhecer de que forma a composição bioquímica do lagostim, *Nephrops norvegicus* (L.), é influenciada pela maturação sexual e reprodução.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimens de *N. norvegicus* foram capturados por embarcações comerciais, com uma periodicidade mensal, entre Outubro 2000 e Setembro 2001, na costa sul portuguesa. Para cada espécimen foi registado o peso total, sexo e o estado de maturação (apenas nas fêmeas). A classificação dos estados de desenvolvimento dos ovários foi baseada no estudo de Farmer (1974). As fêmeas foram classificadas de imaturas (Estado 1 – ovário branco), em maturação (E2 e E3 - ovário creme e verde pálido, respectivamente) e maduras (E4 – ovário verde escuro).

A determinação dos teores de humidade, gordura, proteína e cinza foi baseada nos métodos descritos no AOAC (1998). As concentrações de glicogénio foram determinadas de acordo com o método descrito por Viles e Silverman (1949).

A determinação do perfil de ácidos gordos seguiu o protocolo experimental descrito por Lepage e Roy (1986) e modificado por Cohen *et al.* (1988). A quantificação do teor em colesterol foi baseada no protocolo experimental descrito por Naemmi *et al.* (1995) e modificado por Oehlenschläger (1998).

O tratamento estatístico dos dados foi feito através da análise de variância (ANOVA paramétrica simples e ANOVA não paramétrica – Kruskal-Wallis), usando o programa STATISTICA 4,5©.

## **RESULTADOS**

### *Variações da composição bioquímica em função dos diferentes estados de maturação*

A determinação do teor proteico no ovário e hepatopâncreas (HP) das fêmeas em função do estado de maturação (Tabela 2) não revelou diferenças significativas, variando entre 41,8 e 48,3% no ovário e entre 8,5 e 9,4% no HP. No que diz respeito ao teor de colesterol no ovário e HP (Tabela 2), verificou-se um aumento significativo de E1 a E4 em ambos os tecidos (Ovário: 58,4 to 80,1 mg/100g; HP: 112,5 to 180,2 mg/100g). Em oposição, o teor de glicogénio não apresentou variações significativas nos tecidos analisados durante o processo de maturação.

O teor lipídico aumentou significativamente durante o processo de maturação, sobretudo entre E2 e E4 (Ovário: 21,3-36,5 mg/100mg; HP: 28,3-45,8 mg/100mg). Os lípidos não polares dominaram nestes dois tecidos, principalmente os triacilgliceróis (TAG) em fêmeas maduras (Ovário: 67,4%; HP: 73,9%). Os diacilgliceróis e monoacilgliceróis revelaram uma progressão irregular.

### *Variações no perfil de ácidos gordos em função dos diferentes estados de maturação*

A composição em ácidos gordos dos lípidos totais dos ovários e HP em função dos diferentes estados de maturação encontra-se descrita na Tabela 4. A fracção saturada não variou significativamente ao longo do processo de maturação, mas atingiu o valor mais baixo em fêmeas E4 (Ovário: 19,6%; HP: 21,7%). Uma evolução idêntica foi registada para o ácido gordo maioritário (16:0). Em ambos os casos, as percentagens

obtidas no HP foram sempre superiores às dos ovários. Os valores mais elevados da fracção monoinsaturada foram sempre registados nos ovários e, mais concretamente, em fêmeas E4 (55,2%). Os ácidos gordos maioritários (>1%) foram: 16:1(n-7), 18:1(n-9), 18:1(n-7), 20:1(n-9), 20:1(n-7) e 22:1(n-11). É de salientar que o aumento significativo destes compostos fez com que a respectiva fracção fosse maioritária, representando, aproximadamente, cerca de metade dos lípidos totais. Consequentemente, os ácidos gordos polinsaturados representaram apenas 21,0-25,6 % nos ovários e 25,5-33,3 % no HP. Os ácidos gordos maioritários foram o EPA(20:5n-3) e o DHA(22:6n-3), sendo as percentagens mais elevadas obtidas em fêmeas maduras (EPA: ovário - 6,3 %, HP - 11,5 %; DHA: ovário - 12,1 %, HP - 15,9 %).

## DISCUSSÃO

O aumento do teor lipídico verificado nos ovários foi consequência do processo de maturação sexual. De facto, os lípidos dos ovários fornecem energia nos processos biosintéticos da oogénese e vitelogénese e são acumulados pelos oócitos em desenvolvimento (Harrison, 1990). Esta mobilização e acumulação das reservas lipídicas foi documentada em diversas espécies de crustáceos (Teshima *et al.*, 1988) e alguns destes autores descrevem que o aumento dos teores lipídicos nos ovários é acompanhado por um decréscimo nos teores lipídicos do HP. Todavia, neste estudo, este concomitante decréscimo não foi verificado. Nestas circunstâncias, as necessidades lipídicas dos ovários em desenvolvimento parecem ser mais dependentes da ingestão de lípidos oriundos da dieta, do que das reservas do HP.

Uma elevada percentagem de triacilgliceróis (TAG) foi obtida nas gónadas e no HP. De facto, estes lípidos não polares são a forma de armazenamento de energia predominante nos crustáceos adultos, ovos e primeiras fases larvares e são principalmente constituídos por 16:0 e ácidos gordos da família omega-9 (Teshima *et al.*, 1988).

O perfil de ácidos gordos nos ovários de *Nephrops norvegicus* é um reflexo das necessidades deste tecido nestes compostos ou o que é necessário ser transferido para os futuros embriões em desenvolvimento. Cahu *et al.* (1995) demonstraram o papel

benéfico da dieta rica em elevados teores de ácidos gordos polinsaturados em alguns parâmetros reprodutores e na qualidade da descendência de *Penaeus indicus*. O facto do ácido araquidónico (20: 4 $\omega$ 6 e EPA serem precursores das prostaglandinas e leucotrienos nos animais marinhos (Sargent, 1995) pode explicar os valores mais elevados obtidos em fêmeas maduras. A grande proporção da fracção monoinsaturada nos ovários e HP parece indicar que estes compostos são a maior fonte energética durante o desenvolvimento embrionário e pré-larvar, tal como foi verificado por Roustaian et al. (1999) em *Macrobrachium rosenbergii*. O aumento dos teores de colesterol dos ovários ao longo do processo de maturação era esperado, uma vez que este composto é precursor de hormonas esteróides, e a sua conversão *in vivo* na hormona esteróide foi demonstrada por Kanazawa e Teshima (1971) em *Panulirus japonicus*. O facto do teor em colesterol no HP ter tido a mesma evolução durante a maturação dos ovários difere dos resultados obtidos por outros autores (Adiyodi e Adiyodi, 1970), que sugerem uma mobilização do colesterol do HP para o ovário. Uma vez que o colesterol existente nos diferentes tecidos provém da dieta, que os crustáceos não possuem a capacidade de sintetizar *de novo* o anel esteróide e ainda dado que existe uma mobilização do colesterol do HP para os ovários, então neste estudo, as reservas do HP parecem ser compensadas pela dieta.

O teor de glicogénio não variou com o desenvolvimento dos ovários, ao contrário do que foi verificado por Kulkarni e Nagabhushanam (1979). Estes autores verificaram um decréscimo deste teor no HP e um aumento simultâneo nos ovários e testículos de *Parapenaeopsis hardwickii*. De facto, os hidratos de carbono têm um papel específico na produção dos ácidos nucleicos, são precursores de intermediários metabólicos na produção de energia e de aminoácidos não essenciais e são componentes dos pigmentos dos ovários (Harrison, 1990).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiyodi KG, Adiyodi RG (1970). *Biol Rev* 46: 121-165.
- AOAC (1998) Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup> Ed. Association of Official Analytical Chemistry. Washington, D.C.
- Cahu C, Cuzan G, Quazuguel P (1995) *Comp Biochem Physiol* 112B: 417-424.

- Cohen Z, Von Shak A, Richmond A (1988) *J Phycol* 24: 328-332.
- Farmer ASD (1974) *J Zool* 174: 161-183.
- Harrison KE (1990) *J Shell Res* 9: 1-28.
- Jeckel WH, Moreno JE, Moreno, VJ (1989). *Comp Biochem Physiol* 92B: 271-276.
- Kanazawa A, Teshima S-I (1971) *Bull Jap Soc Sci Fish* 37: 891-897.
- Kulkarni GK, Nagabhushanam R (1979) *Aquaculture* 18: 373-377.
- Lepage G, Roy CC (1986) *J Lipid Res* 27: 114-119.
- Maynou F, Sardà F (1997) *Fish Res* 30: 139-149.
- Middleditch BS, Missler SR, Ward DG, Lawrence AL (1979). *Proc World Maricult Soc* 10: 472-476.
- Middleditch BS, Missler SR, Hines HB, Lawrence AL (1980) *J Chromatogr* 195: 359-368.
- Naemmi ED, Ahmad N, Al-sharrah TK, Behbahani M (1995) *JAOAC Inter* 78: 1522-1525.
- New MB (1976) A review of dietary studies with shrimps and prawns. *Aquaculture* 9: 101-144.
- Oehlenschläger J (1998) 28<sup>th</sup> Annual Meeting of WEFTA. Tromsø, Norway, October 4-7.
- Roustaian P, Kamarudin MS, Omar H, Saad CR, Ahmad MH (1999) *Aquacult Res* 30: 815-824.
- Sargent JR (1995) In: Bromage NR, Roberts RJ (eds) *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford, pp 353-372.
- Teshima S-I, Kanazawa A (1971) *Comp Biochem Physiol* 38B: 597-602.
- Teshima S-I, Kanazawa A, Koshio S, Horinouchi K (1988) *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1123-1129.
- Viles P, Silverman J (1949) *J Anal Chem* 21: 950-953.

Tabela 1

Variações nos teores de proteína (%), glicogênio (mg/100mg), colesterol (mg/100g), lípidos totais (mg/100mg) e das classes de lípidos (% dos lípidos totais) no ovário e hepatopâncreas das fêmeas de *N. norvegicus* em diferentes estados de desenvolvimento do ovário. Os valores são médias de três amostras compostas  $\pm$  DP. Diferentes letras em cada linha representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

|                       | Estado 1                     |                              | Estado 2                    |                              | Estado 3                    |                              | Estado 4                     |                              |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                       | Ovário                       | HP                           | Ovário                      | HP                           | Ovário                      | HP                           | Ovário                       | HP                           |
| Proteína              | 42,1 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>  | 8,9 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>   | 45,6 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup> | 8,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>   | 42,4 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup> | 9,4 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>   | 48,7 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>  | 8,7 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>   |
| Glicogênio            | 2,8 $\pm$ 0,3                | 2,9 $\pm$ 0,4                | 2,5 $\pm$ 0,5               | 2,8 $\pm$ 0,3                | 2,6 $\pm$ 0,6               | 2,7 $\pm$ 0,3                | 2,4 $\pm$ 0,2                | 3,0 $\pm$ 0,5                |
| Colesterol            | 65,3 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>  | 112,5 $\pm$ 6,7 <sup>b</sup> | 58,4 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup> | 140,1 $\pm$ 5,8 <sup>c</sup> | 60,5 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup> | 130,9 $\pm$ 5,3 <sup>c</sup> | 80,1 $\pm$ 4,4 <sup>d</sup>  | 180,2 $\pm$ 7,8 <sup>e</sup> |
| Lípidos totais        | 21,9 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>  | 29,9 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>  | 21,3 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup> | 28,3 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>  | 34,8 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup> | 32,8 $\pm$ 6,0 <sup>b</sup>  | 36,5 $\pm$ 6,7 <sup>bc</sup> | 45,8 $\pm$ 5,9 <sup>c</sup>  |
| Triacilgliceróis      | 42,5 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>  | 62,9 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>  | 44,8 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup> | 65,0 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>  | 52,3 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup> | 63,2 $\pm$ 5,5 <sup>b</sup>  | 67,4 $\pm$ 7,6 <sup>bc</sup> | 73,9 $\pm$ 3,7 <sup>c</sup>  |
| Fosfolípidos          | 13,1 $\pm$ 3,2 <sup>ac</sup> | 5,2 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>   | 17,5 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup> | 3,5 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>   | 8,7 $\pm$ 3,6 <sup>c</sup>  | 2,9 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>   | 7,7 $\pm$ 3,1 <sup>c</sup>   | 2,2 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>   |
| Diacilgliceróis       | 5,6 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>   | 2,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>   | 4,3 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>  | 2,6 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>   | 5,9 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>  | 2,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>   | 4,1 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>   | 2,9 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>   |
| Monoaçilgliceróis     | 2,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>   | 1,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>   | 1,4 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>  | 1,9 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>  | 2,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>  | 2,4 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>  | 0,8 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>   | 0,3 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>   |
| Ácidos gordos livres  | 7,3 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>   | 2,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>   | 3,0 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>  | 3,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>   | 1,8 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>  | 6,7 $\pm$ 1,3 <sup>d</sup>   | 2,5 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>   | 1,5 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>   |
| Colesterol livre      | 7,1 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>   | 4,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>   | 9,9 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>  | 5,5 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>   | 11,3 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup> | 3,4 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>   | 8,9 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>   | 1,9 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>   |
| Ésteres de Colesterol | 11,6 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>  | 3,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>   | 5,2 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>  | 7,9 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>   | 7,3 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>  | 13,4 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>  | 4,5 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>   | 8,5 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>   |
| Hidrocarbonetos       | 3,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>   | 16,9 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup>  | 4,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>  | 10,0 $\pm$ 3,5 <sup>c</sup>  | 4,6 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>  | 5,1 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>   | 3,7 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>   | 8,9 $\pm$ 2,2 <sup>c</sup>   |

Tabela 2

Perfil de ácidos gordos (% lípidos totais) no ovário e hepatopâncreas das fêmeas de *N. norvegicus* em diferentes estados de desenvolvimento do ovário. Os valores são médias de três amostras compostas  $\pm$  DP. Diferentes letras em cada linha representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

| Ác. gordos     | Estado 1                    |                             | Estado 2                    |                             | Estado 3                    |                              | Estado 4                    |                             |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                | Ovário                      | HP                          | Ovário                      | HP                          | Ovário                      | HP                           | Ovário                      | HP                          |
| 14:0           | 1,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>  | 1,9 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>  | 1,4 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>  | 1,6 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>  | 1,5 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>  | 1,66 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>  | 1,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>  | 1,9 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>  |
| 16:0           | 15,0 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup> | 17,2 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup> | 13,9 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup> | 16,5 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup> | 14,1 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup> | 16,06 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup> | 13,6 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup> | 15,6 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup> |
| 18:0           | 3,9 $\pm$ 0,4               | 3,1 $\pm$ 0,9               | 3,9 $\pm$ 0,7               | 3,3 $\pm$ 0,5               | 3,9 $\pm$ 0,0               | 3,61 $\pm$ 0,1               | 3,9 $\pm$ 0,1               | 3,7 $\pm$ 0,4               |
| $\Sigma$ Sat.  | 21,1 $\pm$ 2,5              | 23,6 $\pm$ 2,6              | 20,8 $\pm$ 1,5              | 23,1 $\pm$ 1,9              | 20,5 $\pm$ 2,4              | 21,96 $\pm$ 1,4              | 19,6 $\pm$ 1,6              | 21,7 $\pm$ 2,5              |
| 16:1(n-7)      | 6,6 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>  | 8,8 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>  | 6,5 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>  | 7,1 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>  | 6,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>  | 7,4 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>   | 6,4 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>  | 7,5 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>  |
| 18:1(n-9)      | 28,1 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup> | 23,8 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup> | 27,3 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup> | 23,1 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup> | 30,8 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup> | 20,8 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>  | 30,4 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup> | 17,3 $\pm$ 3,6 <sup>c</sup> |
| 18:1(n-7)      | 7,7 $\pm$ 0,5               | 7,3 $\pm$ 0,7               | 7,7 $\pm$ 1,3               | 6,9 $\pm$ 0,5               | 7,7 $\pm$ 1,2               | 7,6 $\pm$ 0,8                | 7,7 $\pm$ 1,0               | 8,5 $\pm$ 0,8               |
| 20:1(n-9)      | 7,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>  | 3,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>  | 7,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>  | 3,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>  | 7,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>  | 2,9 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>   | 7,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>  | 2,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>  |
| 20:1(n-7)      | 1,6 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 0,8 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>  | 1,6 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 0,8 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>  | 1,5 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 0,8 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>   | 1,6 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 1,1 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>  |
| 22:1(n-11)     | 1,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 1,5 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>  | 1,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 1,4 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>  | 1,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 1,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>   | 1,8 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>  | 1,5 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>  |
| $\Sigma$ Mono. | 54,5 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup> | 47,0 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup> | 54,6 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup> | 43,9 $\pm$ 2,3 <sup>c</sup> | 54,7 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup> | 41,8 $\pm$ 2,1 <sup>c</sup>  | 55,2 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup> | 39,7 $\pm$ 1,2 <sup>c</sup> |
| 18:2(n-6)      | 0,9 $\pm$ 0,1               | 0,9 $\pm$ 0,1               | 0,9 $\pm$ 0,1               | 1,0 $\pm$ 0,1               | 0,9 $\pm$ 0,1               | 1,4 $\pm$ 0,2                | 0,9 $\pm$ 0,1               | 1,3 $\pm$ 0,1               |
| 20:4(n-6)      | 1,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>  | 1,8 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>  | 1,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>  | 2,3 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>  | 1,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>  | 2,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>   | 1,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>  | 2,7 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>  |
| 20:3(n-3)      | 5,4 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>  | 7,9 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>  | 4,4 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>  | 7,2 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>  | 4,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>  | 10,4 $\pm$ 1,6 <sup>c</sup>  | 6,3 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>  | 11,5 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup> |
| 22:6(n-3)      | 9,4 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>  | 12,2 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup> | 9,2 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>  | 11,2 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup> | 10,3 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup> | 14,3 $\pm$ 1,2 <sup>c</sup>  | 12,1 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup> | 16,0 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup> |
| $\Sigma$ Poli. | 21,8 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup> | 26,6 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup> | 21,4 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup> | 25,5 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup> | 21,0 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup> | 32,1 $\pm$ 2,8 <sup>c</sup>  | 25,6 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup> | 33,3 $\pm$ 4,7 <sup>c</sup> |

## **INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE POLPA DE SARDINHA E DE ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU NO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS DE SALSICHAS TIPO *FRANKFURT***

Ribeiro, A. T. <sup>(1)</sup>; Bandarra, N.M. <sup>(2)</sup>; Mendes, R. <sup>(2)</sup>; Nunes, M. L. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> – Escola Superior Agrária de Santarém (ESAS). Tecnologia da Carne, Apartado 310, 2004 Santarém Codex.

<sup>(2)</sup> – Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR). Av. de Brasília, 1449-006 Lisboa.

---

### **INTRODUÇÃO**

Com o novo estilo de vida de algumas sociedades industrializadas, vários aspectos são descurados, entre os quais, a alimentação. Paralelamente, o consumo excessivo de carne tem de sido criticado por médicos e nutricionistas devido ao elevado teor em gordura, sobretudo gordura saturada (Shackelford *et al.*, 1990). Por seu lado, o consumo de produtos da pesca tem sido recomendado uma vez que estes, para além de constituírem uma excelente fonte de proteínas de alto valor nutritivo, possuem, em regra, um teor apreciável de gordura polinsaturada associado a baixos níveis de colesterol. Assim, no sentido de contribuir para a diversificação da oferta de produtos alimentares, estudou-se o efeito da substituição parcial de carne de porco e de toucinho, em salsichas tipo *Frankfurt*, por polpa de sardinha e óleo de fígado de bacalhau (OFB) no perfil de ácidos gordos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios foram programados de acordo com o modelo de “Desenho composto central rotativo”, de que resultaram 13 combinações onde se fez variar dois factores - polpa de sardinha (de 25% a 75%) e OFB (de 0% a 7,5%) (Quadro 1). Também se efectuou um ensaio sem polpa de sardinha e OFB designado por ensaio controlo (EC). O tratamento estatístico dos dados foi feito através da análise de variância (ANOVA

paramétrica simples e ANOVA não paramétrica – Kruskal-Wallis), no programa Statsoft, Inc. (1997), STATISTICA for Windows. A polpa de sardinha foi obtida de acordo com a técnica descrita por Mendes *et al.* (1997) e o OFB adquirido num supermercado. As salsichas foram preparadas de acordo com a formulação indicada no Quadro 2. Para a mistura das matérias primas e ingredientes utilizou-se um homogeneizador STEPHAN tipo UM12 e o enchimento em tripa celulósica (20 mmØ) foi efectuado numa enchedora MAINCA EB-12. O tratamento térmico das salsichas consistiu numa cozedura em banho de água (75 °C, durante 15 min), seguido de pasteurização (85 °C, durante 5 min) e finalmente arrefecimento rápido a cerca de 0 °C (água e gelo). Entre a cozedura e a pasteurização, as salsichas foram arrefecidas, peladas e embaladas a vácuo em embalagens impermeáveis ao ar. A conservação teve lugar em refrigerado (cerca de 5 °C) até posterior análise. O aspecto das salsichas dos diferentes ensaios pode ser observado na figura 1. Na determinação do perfil de ácidos gordos usaram-se as condições e a metodologia descrita por Bandarra *et al.* (1999).

Quadro 1 – Condições usadas no ‘design’ experimental dos ensaios (%) e ensaios realizados.

| Ensaio | Polpa de sardinha | Óleo fígado de bacalhau | Polpa de sardinha (%) | Óleo fígado de bacalhau (%) |
|--------|-------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 1      | -1,000            | -1,000                  | 32,30                 | 2,65                        |
| 2      | 1,000             | -1,000                  | 67,70                 | 2,65                        |
| 3      | -1,000            | 1,000                   | 32,30                 | 6,40                        |
| 4      | 1,000             | 1,000                   | 67,70                 | 6,40                        |
| 5      | -1,414            | 0,000                   | 25,00                 | 3,75                        |
| 6      | 1,414             | 0,000                   | 75,00                 | 3,75                        |
| 7      | 0,000             | -1,414                  | 50,00                 | 0,00                        |
| 8      | 0,000             | 1,414                   | 50,00                 | 7,50                        |
| 9      | 0,000             | 0,000                   | 50,00                 | 3,75                        |
| 10     | 0,000             | 0,000                   | 50,00                 | 3,75                        |
| 11     | 0,000             | 0,000                   | 50,00                 | 3,75                        |
| 12     | 0,000             | 0,000                   | 50,00                 | 3,75                        |
| 13     | 0,000             | 0,000                   | 50,00                 | 3,75                        |

Quadro 2 – Fórmula utilizada no fabrico das salsichas

| Ingredientes                    | Quantidade (g) | Proporção (%) |
|---------------------------------|----------------|---------------|
| Carne magra de porco            | 1040           | 52,0          |
| Toucinho                        | 300            | 15,0          |
| Gelo                            | 480            | 24,0          |
| Fécula de batata                | 60             | 3,0           |
| Sal refinado                    | 44             | 2,2           |
| Caseinato de sódio              | 24             | 1,2           |
| Concentrado de proteína de soja | 20             | 1,0           |
| Condimento de salsicha          | 8              | 0,4           |
| Glucose                         | 8              | 0,4           |
| Polifosfatos                    | 6              | 0,3           |
| Sal nitrificante                | 6              | 0,3           |
| Ácido ascórbico                 | 2              | 0,1           |
| Aroma de fumo                   | 2              | 0,1           |
| Total                           | 2000           | 100           |

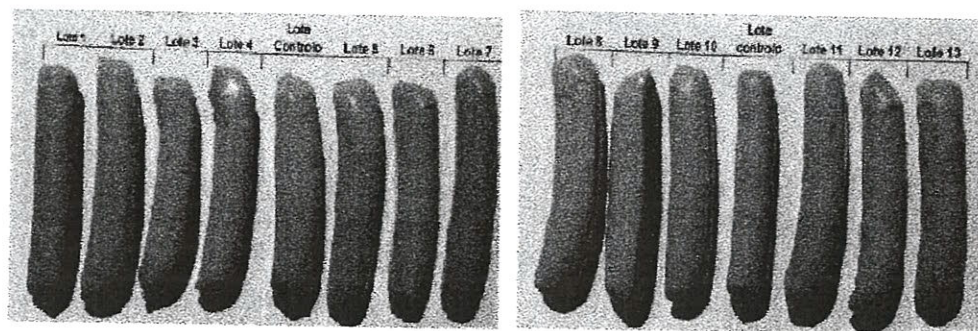


Figura 1 – Aspecto das salsichas dos diferentes ensaios

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média dos resultados obtidos nos cinco ensaios com proporções iguais é aqui apresentada como sendo o ensaio 9, tendo sido estes resultados usados na determinação do nível de significância do modelo experimental. Sob o ponto de vista sensorial é de referir que as salsichas dos vários ensaios mereceram a aceitação de um painel de provadores (resultados não apresentados). Ao nível dos ácidos gordos

saturados, monoinsaturados, polinsaturados, relação  $\omega 3/\omega 6$  e  $22:6\omega 3/18:2\omega 6$  e presença de ácidos gordos trans, verificaram-se diferenças significativas entre os vários ensaios ( $p \leq 0,05$ ). De acordo com os resultados da figura 2 constata-se que a diminuição da percentagem de ácidos gordos saturados, nas salsichas, se deve à incorporação de OFB e de polpa de sardinha, sendo mais pronunciada em função do OFB. Por outro lado, a adição de polpa de sardinha e de OFB provocou uma diminuição da percentagem dos monoinsaturados nas salsichas dos vários ensaios (Fig. 3) e um aumento dos níveis de polinsaturados  $\omega 3$ , como pode ser observado na figura 4.

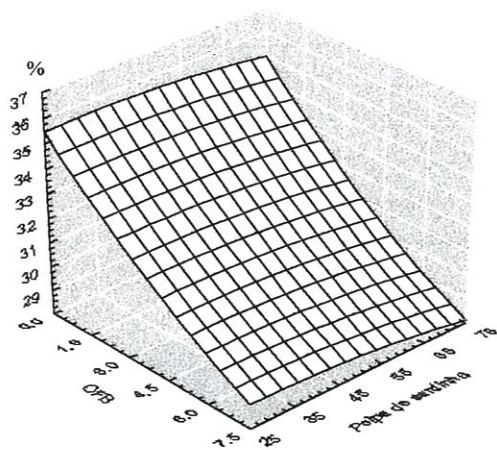


Figura 2 – Influência da polpa de sardinha e do OFB sobre a percentagem em ácidos gordos saturados.

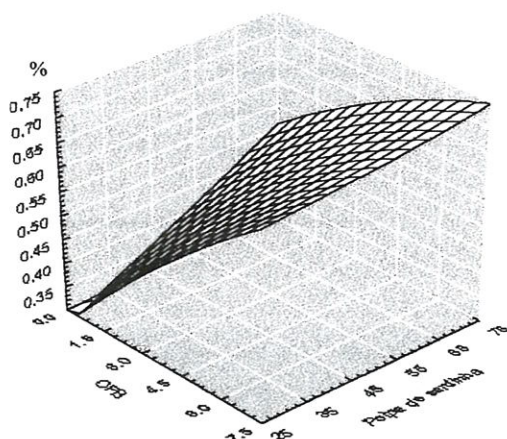


Figura 3 – Influência da polpa de sardinha e do OFB sobre a percentagem em ácidos gordos monoinsaturados.

As relação  $\omega 3/\omega 6$  e  $22:6\omega 3/18:2\omega 6$  (Figs. 5 e 6), foram igualmente beneficiadas com a adição de polpa de sardinha e do OFB, verificando-se em relação à primeira que o OFB foi o principal responsável. No que diz respeito à presença de ácidos gordos *trans* (apenas o ácido gordo 18:1 $\omega 9$ -t foi detectado), é de destacar a sua redução em função do aumento da percentagem do OFB (Fig.7).

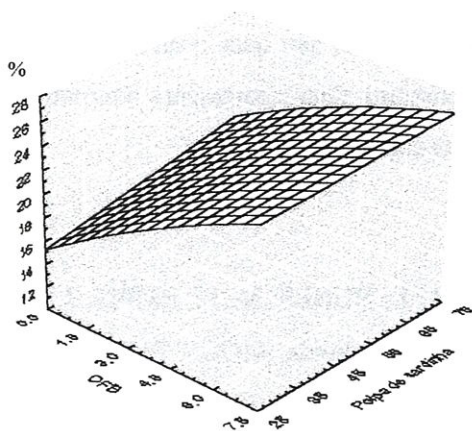


Fig. 4 – Influência da polpa de sardinha e do OFB sobre a percentagem em ácidos gordos polinsaturados.

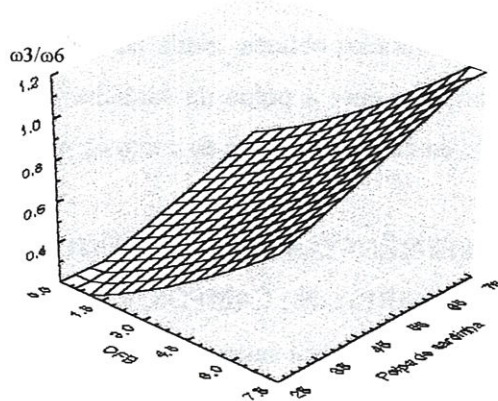


Figura 5 – Influência da polpa de sardinha e do OFB sobre a relação  $\omega3/\omega6$ .

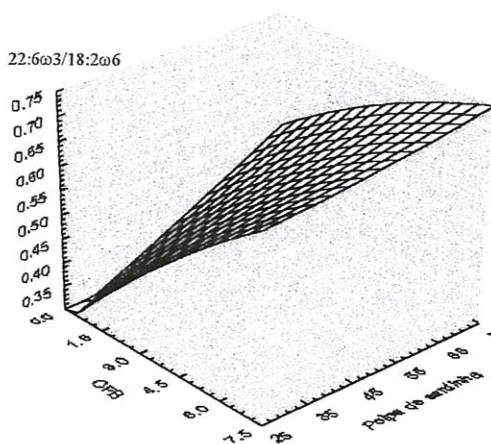


Figura 6 – Influência da polpa de sardinha e do OFB sobre a relação  $22:6\omega3/18:2\omega6$ .

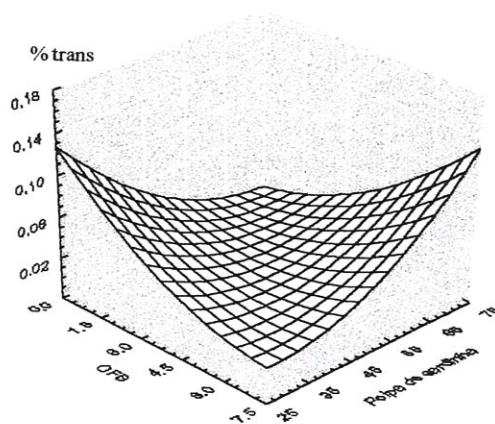


Figura 7 – Influência da polpa de sardinha e do OFB sobre os ácidos gordos trans.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, ainda que preliminares, sugerem que quer o óleo de fígado de bacalhau quer a polpa de sardinha podem constituir uma interessante alternativa ao uso da carne e toucinho de porco na produção de salsichas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDARRA, N.; CAMPOS, R. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; EMPIS, J., 1999. Antioxidant synergy of  $\alpha$ -tocopherol and phospholipids. *JAACS*, 76(8), 905-913.
- MENDES, R.; GÓMEZ-GUILLÉN, C.; MONTERO, P., 1997. Effect of a new vacuum leaching technology on the textural characteristics of sardine mince. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 204: 113-120.
- SHACKELFORD, S.; MILLER, M.; HAYDON, K.; REAGAN, J., 1990. Evaluation of the physical, chemical and sensory properties of fermented summer sausage made from high-oleate pork. *J. Food Sci.* 55(4): 937-941.

## DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE TAMBORIL EM PRODUTOS TRANSFORMADOS DA PESCA, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE SSCP

Ricardo Quinta, Laurentina Gomes, Rafael Duarte, Carla Rosa, Marta Sebastião, Ana Teia dos Santos

IPIMAR - Instituto de Investigação das Pescas e do Mar. Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

---

**INTRODUÇÃO** O tamboril-branco (*Lophius piscatorius*) e o tamboril-sovaco-preto (*Lophius budegassa*) são duas espécies importantes sob o ponto de vista comercial, capturadas por arrasto e pesca tradicional. Ao longo da costa portuguesa, o tamboril-branco é mais abundante ao norte de Lisboa, enquanto que o tamboril-sovaco-preto é mais abundante no sul. O seu valor comercial, na maior parte dos mercados, é muito similar pelo os valores dos desembarcados dizem respeito ao conjunto das espécies. Em mercados que as distinguem comercialmente, o tamboril-sovaco-preto atinge preços de venda superiores aos obtidos pelo tamboril-branco. As duas espécies são muito similares e distinguem-se apenas pelo número de riscas da segunda barbatana dorsal e pela cor do peritoneu.

Dada a preocupação cada vez maior, por parte do público, em saber que produtos consome e a possibilidade de incorrecta identificação para a obtenção de maiores lucros, a investigação no ramo alimentar tem sido direccionada para o desenvolvimento de novas técnicas para a identificação de espécies em produtos da pesca transformados.

Neste trabalho pretendeu-se fazer a identificação de tamboril através da técnica de SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), utilizando 'primers' universais que amplificam uma zona do DNA mitocondrial (mtDNA).

## MATERIAL E MÉTODOS

O DNA das amostras foi extraído com CTAB (Brometo de tetradecil-trimetil-amônio). Foi usado o 'primer' universal Taberlet, que amplifica um fragmento, de aproximadamente 411 pb, do citocromo b [1]. As condições de PCR foram: 1) passo de pré aquecimento a 95°C durante 3 min; 2) ciclo em três etapas (desnaturação a 93°C durante 1 min, ligação do 'primer' a 55°C durante 90 s, alongamento da cadeia a 72°C durante 2 min) repetido 40 vezes; 3) passo de extensão final a 72°C durante 10 min; 4) passo de manutenção a 4°C indefinidamente.

Os produtos de PCR obtidos foram desnaturados a 95°C durante 5 minutos e colocados num GeneGelExecel (Pharmacia), procedendo-se, posteriormente, à SSCP [2].

Usaram-se como marcadores indivíduos identificados através de parâmetros biológicos e, como amostras desconhecidas, cubos de tamboril ultracongelados, adquiridos comercialmente e vários espécimes de tamboril, adquiridos em lota, que foram liofilizados posteriormente.

## RESULTADOS E CONCLUSÕES

A técnica de SSCP demonstrou ser capaz de identificar amostras cujo tecido sofreu uma grande degradação (liofilização) bem como produtos que não evidenciavam nenhuma característica morfológica visível que permitisse a sua identificação (cubos ultracongelados). Como se ilustra na figura 1, as amostras 1 a 4 (cubos de tamboril ultracongelado) foram identificadas como *Lophius budegassa*. Das amostras liofilizadas, 6, 9, 10 e 11, também foram identificadas como *Lophius budegassa* e as restantes (5, 7 e 8) identificadas como *Lophius piscatorius*. A técnica de SSCP permite identificar e distinguir fácil e rapidamente duas espécies de tamboril, em produtos ultracongelados e em amostras que foram submetidas a um tratamento como a liofilização.

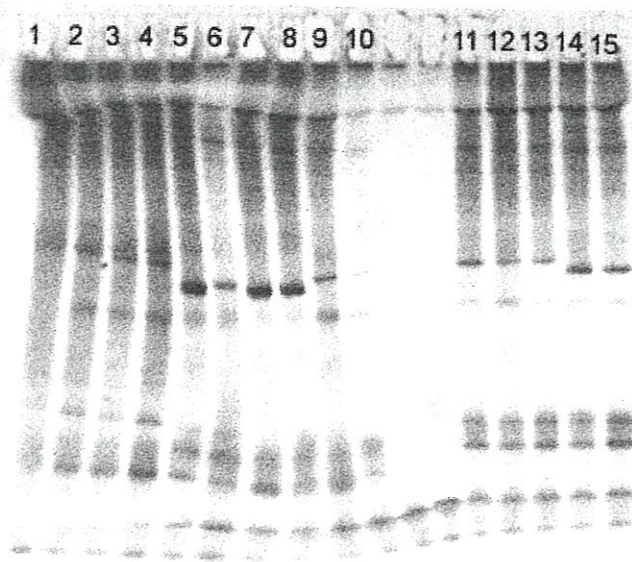


Figura 1 – SSCP de várias amostras de tamboril.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Green, A.; Hoelzel, A. R., 1998. *In: Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*, A. R. Hoelzel (Eds), 159-187.
- [2] Rehbein, H.; Gonzalez-Sotelo, C.; Perez-Martin, R.; Quinteiro, J.; Rey-Mendez, M.; Pryde, S.; Mackie, I.M.; Santos, A.T., 1999. Differentiation of sturgeon caviar by single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 50: 13-17.



## TWO CONFIRMED CASES OF HUMAN INTOXICATION BY MARINE BIOTOXINS IN PORTUGAL

M. A. de M. Sampayo, S. Rodrigues, M. J. Botelho and P. Vale

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar. Av. Brasília 1449-006 Lisboa

---

### INTRODUCTION

Mollusc bivalves are filtering organisms, which concentrate marine biotoxins, without being visibly affected and, in this way they can become a menace to human consumers. To prevent human illness, monitoring of exploited areas is mandatory both for potentially toxic microalgae and accumulation of toxins by bivalves. In Portugal this monitoring is carried out along the coast by IPIMAR, the National Institute for Fisheries Research [1]. In order to avoid unnecessary closures and make bans as short as possible, preventive closures seldom take place. Nevertheless tourists or private consumers may harvest bivalves, even when the area is closed, risking their health. This happened in the present cases, again calling attention to the necessity for a better alert, when suspicion of contamination arises, in order to prevent health hazards. The first case, paralytic shellfish poisoning (PSP), occurred on 19<sup>th</sup> October 1994, when the whole Portuguese coast was preventively closed, due to the detection of relative abundant *Gymnodinium catenatum* Graham, since the beginning of October. A red tide of *G. catenatum* was recorded in November, with a maximum of  $6.1 \times 10^5$  cells L<sup>-1</sup> [2]. At Ericeira, a beach 35 km north from Lisbon, several people after eating blue mussels (*Mytilus edulis*) collected by them became ill with neurological symptoms dominating other manifestations. Nine of them were so ill that they had to be transferred from the local hospital to Santa Maria hospital in Lisbon. The second case presented diarrhetic shellfish poisoning (DSP) occurred on the 12<sup>th</sup> February 1998, with donax clams from Fuzeta/Olhão, Algarve coast [3], just after a storm that

prevented monitoring sampling. *Dinophysis acuminata* Claparède & Lachmann, the responsible species, had been found at the end of January, but without toxin detection in the bivalves.

## **MATERIAL AND METHODS**

PSP 1994: The leftovers of the responsible mussels were frozen and sent to IPIMAR for biotoxin analysis. For PSP detection and quantification, in blue mussels, the mouse bioassay [4] was used both during the monitoring [1] and on the shellfish leftovers. *G. catenatum* quantification was made with a Palmer-Maloney chamber after water concentration through centrifugation. The affected people's symptomatology was kindly provided by Dr Mamede Carvalho and his team from Santa Maria Hospital.

DSP 1998: Regular monitoring of ASP, DSP and PSP as well as phytoplankton is carried out for the Portuguese coast all the year around [3]. Water and bivalve samples are sent weekly to IPIMAR from all shellfish culturing areas, except when weather conditions do not allow for the sampling. DSP analyses are done both by mouse bioassay and HPLC [5,6]. On 17<sup>th</sup> February Dr Tavares de Sousa, Director of Loulé Health Care Centre, informed us that 18 employees and relatives from the Centre, who had eaten donax clams picked by one of them at Fuzeta/Olhão, were ill with vomiting and diarrhoea. The leftovers of the donax clams were sent to IPIMAR for toxin analysis.

## **RESULTS**

PSP 1994: Data on PSP concentrations in the leftovers of blue mussels confirmed the presence of PSP toxins (364 µg sxt eq/100g). This was not as high as we expected from the described symptomatology, which could have been due to the loss of toxins during thawing. The highest value obtained for the area was in a sample arriving directly to IPIMAR during monitoring (3677 µg sxt eq/100g) in November (Fig. 1). Data on the occurrence of *G. catenatum* in the area are also shown in Fig. 1. The symptomatology of the nine patients which had to be transferred to the Lisbon Hospital included paresthesia (sensation of itching or prickling of the skin) on tips, or

facially and scattered, unsteadiness to total walking disability, but no digestive complains. The neurological examination showed: walking ataxia in all, dizziness in 3, defective articulation of sounds in 3, distal hypostasis in 6. Hospital internment varied between one and three days, with one patient having to stay one whole week. Total recuperation took 2-3 days for the less affected and 3 months for the most affected, which was the eldest patient. We think that deficient information on the ban and health possible hazards associated with PSP were the main reasons for this case.

DSP 1998 Data of DSP in donax clams from the area and occurrence of *Dinophysis acuminata* show that the dinoflagellate started to be detected on 29<sup>th</sup> January and at that time okadaic acid (OA) was not detected (Fig. 2). As monitoring is normally weekly we expected to have samples on the 5<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> February, but bad weather prevented sampling and new monitoring samples were only received on the 17<sup>th</sup>. The donax clams responsible for the toxication were collected from the beach on the 12<sup>th</sup> and they contained 130 µg/100g, the highest detected value of OA in the area (Fig. 2).

All affected people had eaten donax clams collected in Fuzeta/Olhão on the 12<sup>th</sup> February. Dr Tavares de Sousa described symptomatology, as including diarrhoea, vomiting, epigastric pains, muscular weakness and headaches. The symptoms started 6 hours after ingestion. Severity was proportional to the amount ingested and not related to the cooking procedure, illustrating the temperature stability of DSP toxins. These symptoms developed over 4 days and only one person had to go to the hospital emergency service. From Fig. 2 we can see that the highest detected number of *D. acuminata* ( $39.3 \times 10^3$  cells L<sup>-1</sup>) was on the 17<sup>th</sup> February. The highest detected value for total OA [3] was on the 12<sup>th</sup>, meaning that, with the lack of sampling due to bad weather, we may have missed the responsible species peak, and that we should have closed the area cautiously on the 29<sup>th</sup> January.

## CONCLUSIONS

In both cases (PSP-1994 and DSP-1998) the described symptomatology accords with the literature [7, 8]. In order to prevent health hazards, these two confirmed cases of human toxication with marine biotoxins have called attention to: i) importance of a

strict monitoring, ii) sampling frequency, which must be weekly, at least at our latitude, iii) necessity for an alert that reaches all potential shellfish harvesters and consumers (via TV, Internet, radio and newspapers), and iv) preventive closures based on potentially toxic microalgae must be made often, especially when sampling is prevented by bad weather.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Dr Mamede Carvalho (Santa Maria Hospital) and his team, as well as to Dr. V. Tavares de Sousa (Loulé Health Care Centre) for having facilitate reports on patient's symptomatology and recover. This research was partially supported by Programme PROPESCAS/Sanity and salubrity of Bivalve Molluscs and PRAXIS XXI with contract n°2/2.1/MAR/1718/95.

## REFERENCES

- [1]. M.A.M. Sampayo, S. Franca, I. Sousa, P. Alvito, P. Vale, M.J. Botelho, S. Rodrigues, and A. Vieira. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*, 23, 181-188 (1997).
- [2]. M.T. Moita, M.G. Vilarinho and A.S. Palma, in: *Harmful Algae*, B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernandez, and T. Wyatt, eds. (Xunta de Galicia and IOC of UNESCO), pp.118-121 (1998).
- [3]. P. Vale and M.A.M. Sampayo. *Toxicon*, 37,1109-1121 (1999).
- [4]. *Official Methods of Analysis*, 14th Ed., AOAC, Arlington, VA, secs. 18.086-18.092 (1984).
- [5]. T. Yasumoto, Y. Oshima, and M. Yamaguchi. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44, 1249-1255 (1978).
- [6]. J. S. Lee, Y. Yanagi, R. Kenma, and T. Yasumoto. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 877-881 (1987).
- [7]. T. Aune and M. Yndestad. *In: Algal toxins in seafood and drinking water*, I.R. Falconer, eds. (Academic Press, London), pp.87-104 (1993).
- [8]. C.Y. Kao. *In Algal toxins in seafood and drinking water*, I.R. Falconer, eds. (Academic Press, London), pp.75-86 (1993).

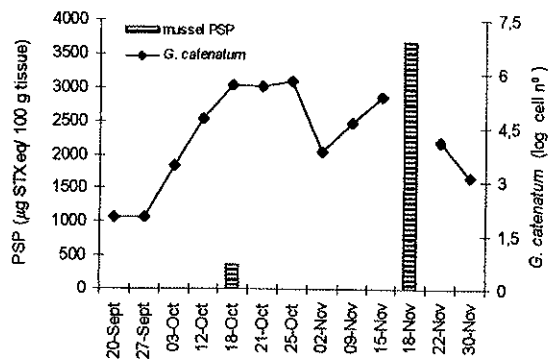


Fig. 1. Development of a *Gymnodinium catenatum* bloom at Ericeira coast, 1994, and resultant blue mussel toxicity data.

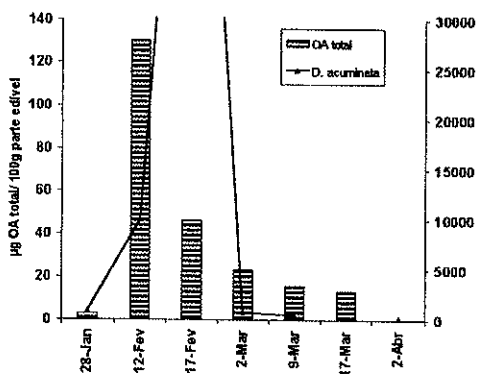


Fig. 2. Development of a *Dinophysis acuminata* bloom at Olhão coast 1998, and total Okadaic acid concentration in donax clams.



**BETTER CONSUMER PROTECTION FROM DSP TOXINS**

P. Vale, M.A.M Sampayo, S. Rodrigues, M.J Botelho, P.R. Costa

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

---

**INTRODUCTION**

In bivalve molluscs other toxins derived from okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX-1) and dinophysistoxin-2 (DTX-2), are also found and globally designated as “dinophysistoxin-3” (DTX-3). Originally DTX-3 is referred to the complex mixture of 7-O-acyl derivatives of DTX-1 and it was the main diarrhetic toxin found in scallops in Japan, while DTX-1 was the main toxin detected in mussels (Yasumoto et al., 1985). Later it was demonstrated that OA, DTX-1 or DTX-2 might be acylated to produce “DTX-3” (Marr *et al.*, 1992). Research on these toxins has led to their identification in Portuguese mussels (*Mytilus edulis* Linné) back in 1995 (Vale and Sampayo, 1996). Later we found they made a major contribution to a human outbreak of diarrhoea in early 1998 (Vale and Sampayo, 1999a) leading to the necessity of studying them for monitoring purposes. As chemical analysis with the alkaline hydrolyse step have shown a marked increase in total okadaic acid content it was interesting to examine the method of sample preparation for mouse bioassay. The introduction of this step in the preparation for mouse bioassay provides new data on total toxicity and increases the related effects in the bioassay.

**MATERIAL AND METHODS**

Mouse bioassays: A modified version of the method by Lee *et al.* (1987) was used. Briefly: 100g edible parts were extracted with acetone, filtered and solvent removed under reduced pressure. The dried residue was re-suspended with aqueous 80% methanol, washed with hexane, and partitioned onto dichloromethane. The latter layer

was removed under reduced pressure, re-dissolved with 4 ml 1% Tween-60. Three 18-20 g albino mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1 ml of the extract. Alkaline hydrolyses were also carried out on methanol and dried hexane layers, for 1 hour at ambient temperature with 1M NaOH, acidified with 2M HCl, and extracted into dichloromethane. The dried residue was injected in mice as above.

HPLC: Okadaic acid and analogues analyses were carried out according to Lee et al. (1987) with minor modifications. Alkaline hydrolysis was used for transformation of okadaic acid esters into the parent toxin and determined indirectly as the parent toxin (details in Vale and Sampayo, 1999).

## RESULTS

The chromatograms of an extract of mussel digestive glands harvested back in 1995, before and after alkaline hydrolysis, demonstrated clearly the presence of esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2, as shown in Fig 1. Chromatograms of extracts of whole meat of donax clams (*Donax trunculus*) harvested in 1998 and 1999, respectively, before and after alkaline hydrolysis, are depicted in Figures 2-3, and provide evidence of the presence of okadaic acid and dinophysistoxin-2 esters. The results obtained by mouse bioassay, before and after an alkaline hydrolysis treatment, both on methanol and dried hexane layers are summarised in Table 1. The results show an increase in toxicity of the hexane fraction after alkaline treatment. This increase was expected, since the parent toxins have a higher i.p. toxicity.

## DISCUSSION

The presence of esters has been a recurrent event since their first detection in Portuguese bivalves. Their presence is widespread throughout the entire Portuguese coast, as the examples show, and is not confined to a single species or a localised geographical area. The concentration of esters is many times higher than that of the respective parent toxins. Toxicity by mouse bioassay with hydrolysed fractions was even higher than expected, taking into account HPLC results, showing how important is the introduction of this step to prevent human toxications. From the results obtained, we strongly recommend that analysis specifically for okadaic acid and analogues (by

HPLC-FLU, ELISA, LC-MS and/or PP2A assays) always be carried out with an alkaline hydrolysis step. Recently, this has been implemented successfully with preparation of samples screened with an ELISA test (Vale and Sampayo, 1999b).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by the Programme PROPESCAS/Sanity and Salubrity of Bivalve Molluscs and PRAXIS XXI with contract n°2/2.1/MAR/1718/95.

## REFERENCES

- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R. and Yasumoto, T. (1987) Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **51** (3), 877-881.
- Marr, J.C., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M.A. and Wright, J.L.C. (1992) Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*, **30** (12), 1621-1630.
- Vale, P. and Sampayo, M.A.M., 1996. Recent findings on marine toxins occurring in Portugal. In: IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rome, 27-31/May/96. Abstract Book. pp. 274.
- Vale, P. and Sampayo, M.A.M., 1999a. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, **37** (8), 1109-1121.
- Vale, P. and Sampayo, M.A.M., 1999b. Comparison between HPLC and a commercial immunoassay kit for detection of okadaic acid and esters in Portuguese bivalves. *Toxicon*, **37** (11), 1565-1577.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K. and Clardy, J. (1985) Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, **41** (6), 1019-1025.

Table 1. Comparison between results of donax clams analysed by mouse bioassay with chemical analysis results, before and after an alkaline hydrolysis treatment.

| Sample Identification* | Analysis Method | Results units                    | MeOH | MeOH +NaOH | Hexane | Hexane + NaOH |
|------------------------|-----------------|----------------------------------|------|------------|--------|---------------|
| 493/99                 | MBA             | Median survival time (hrs)       | 7    | 2          | 24     | 2             |
|                        | HPLC            | OA ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | 10   | 12         | nd**   | 10            |
| 546/99                 | MBA             | Median survival time (hrs)       | 48   | alive      | alive  | 6             |
|                        | HPLC            | OA ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | 0    | --         | nd**   | 4             |

\* 493/99 and 549/99 - Donax clams harvested in July 1999, at Costa da Caparica

\*\* nd = non determinable by Lee's method.

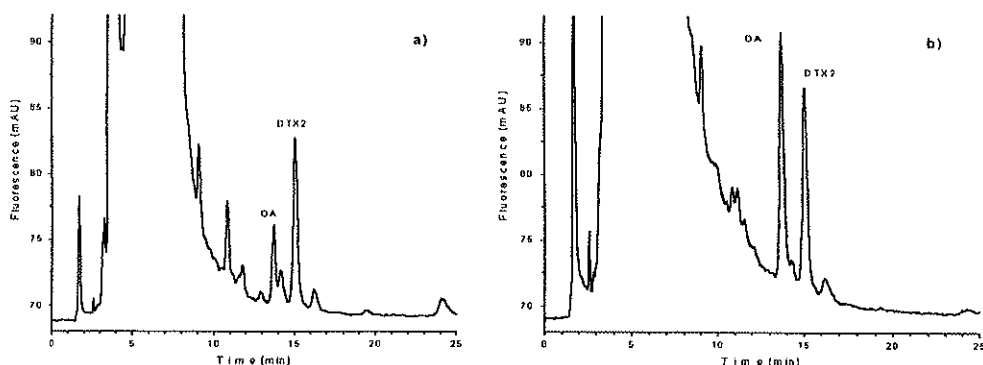


Figure 1 - Chromatograms of the BAP esters of DSP toxins from *Mytilus edulis* contaminated during a *Dinophysis acuta* bloom (Aveiro, 1995/10/25): a) sample extracted according to the conditions of Lee's method (OA: 1.7  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; DTX2 4.3  $\mu\text{g}/\text{g}$ ); b) total methanolic fraction after NaOH treatment (total OA: 5.5  $\mu\text{g}/\text{g}$ ; total DTX2: 4.9  $\mu\text{g}/\text{g}$ ).

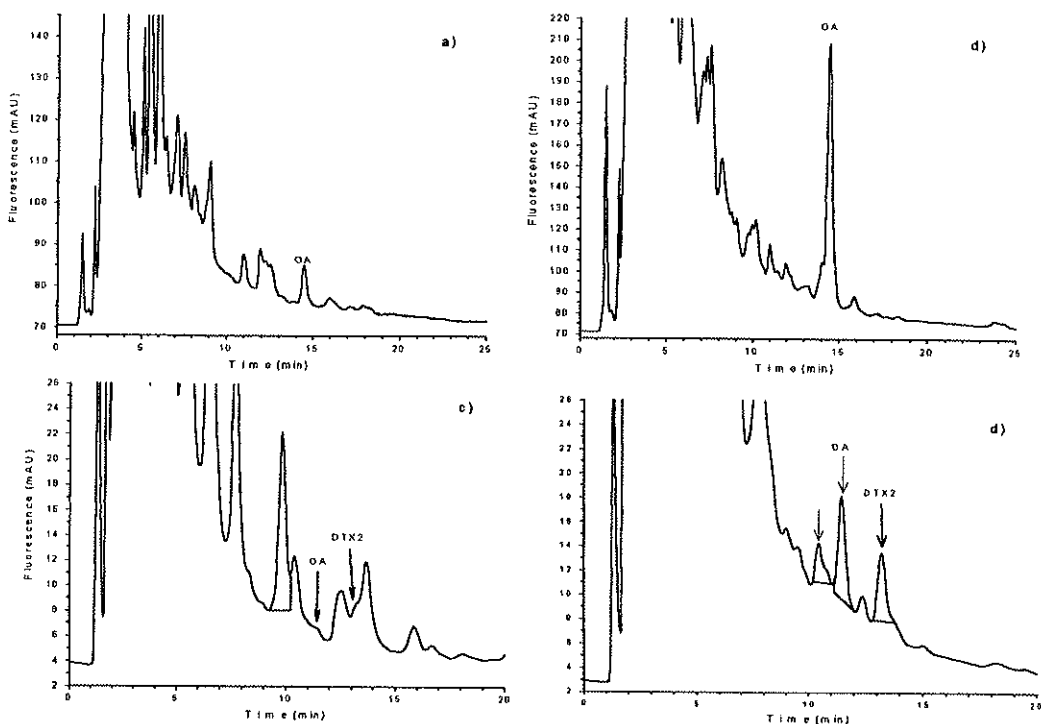


Figure 2 - Chromatograms of the ADAM esters of DSP toxins from *Donax trunculus* contaminated during:

- A *Dinophysis acuminata* bloom (Olhão, 1998/2/12), responsible for registered human intoxications in Loulé: a) Sample extracted according to the conditions of Lee's method (OA: 9  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ); b) Total methanolic fraction after NaOH treatment (total OA: 130  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ).

- A *Dinophysis acuta* bloom (Olhão, 1998/2/12): c) Sample extracted according to the conditions of Lee's method; d) Total methanolic fraction after NaOH treatment (total OA: 64  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ; total DTX2: 49  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ).

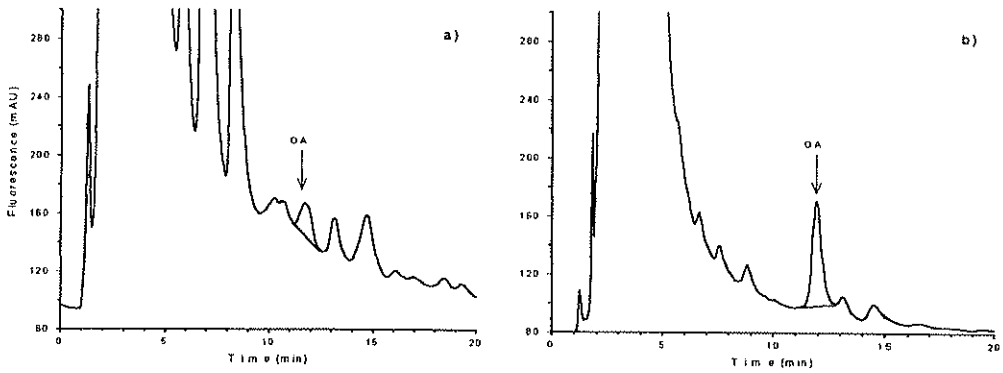


Figure 3 - Chromatograms of the ADAM esters of DSP toxins from *Donax trunculus* contaminated during a bloom of *Dinophysis acuminata* at Costa da Caparica (1999/7/15): a) Sample extracted according to the conditions of Lee's method (OA: 20  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ); b) Hexanic fraction after NaOH treatment (total OA: 92  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ).

## **INTRODUÇÃO DO ENSAIO DE INIBIÇÃO DA PROTEÍNA FOSFATASE 2A NA DETECÇÃO DE TOXINAS DIARREICAS EM MOLUSCOS BIVALVES**

M. J. Botelho, S. M. Rodrigues, P. R. Costa e M. A. M. Sampayo

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal

---

### **INTRODUÇÃO**

A intoxicação diarreica por moluscos bivalves (“Diarrhetic Shellfish Poisoning”-DSP) deve-se ao consumo de bivalves contaminados com elevados níveis de toxinas provenientes de dinoflagelados marinhos. O ácido ocadáico (AO) é a toxina diarreica que ocorre com maior frequência na Europa, sendo possível a sua quantificação e a dos seus análogos (dinofisistoxinas-1 e -3) por métodos enzimáticos devido à sua capacidade de inibição, potente e específica, da fosfatase 2A [1]. Actualmente, no plano de monitorização da DSP em bivalves é usado o bioensaio em ratinhos como método oficial, realizando-se também a detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) [2,3]. O doseamento desta biotoxina recorrendo à inibição da fosfatase 2A (EIPP2A) apresenta vantagens sobre os métodos anteriores, proporcionando maior sensibilidade, especificidade e rapidez no processamento de elevado número de amostras. Assim, foi objectivo do presente trabalho comparar os resultados obtidos pelo método de doseamento enzimático com os do ensaio biológico e da cromatografia.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

A preparação dos extractos de hepatopâncreas (HP) para o doseamento do ácido ocadáico pelo ensaio de inibição da actividade da fosfatase (EIPP2A) e por LC-MS realizou-se, seguindo o método de Lee *et al.* [4]. EIPP2A: O ensaio realizou-se

segundo o método descrito em [1] com pequenas modificações, nomeadamente a utilização do substrato 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP).

**LC-MS:** Os extractos de bivalves foram analisados para toxinas do grupo do AO, utilizando um cromatógrafo HP-1100 com detecção por espectrometria de massa e uma interface LC-MS de “ionspray”, operando em modo iónico negativo. A separação foi efectuada numa coluna de fase reversa em que a fase móvel era CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>COOH (0,05%) 65:35 (v/v).

**Bioensaio:** No bioensaio com ratinhos seguiu-se uma versão modificada do método de Yasumoto *et al.* [5], substituindo-se o éter dietílico por diclorometano. O ensaio é considerado positivo, se morrerem nas primeiras 5 horas, 2 dos 3 ratinhos injectados com o extracto ou os 3 ratinhos até às 24 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação dos resultados obtidos no EIPP2A com os do bioensaio (Fig.1) revela uma boa concordância, uma vez que as amostras com elevada actividade inibidora de PP2A apresentam também resultados positivos no bioensaio, considerando-se, por conseguinte, este novo método seguro, sem oferecer risco de falsos negativos. Alguma discrepância observada nestes resultados pode dever-se à variabilidade própria de um teste com animais vivos e à maior especificidade e sensibilidade do EIPP2A. Relativamente aos resultados obtidos por LC-MS (Fig. 2), verificou-se que, em geral, o EIPP2A produz resultados mais elevados, deduzindo-se que nas amostras analisadas existem outras substâncias inibidoras da PP2A para além do AO, podendo algumas delas apresentarem estruturas afins, mas que não são detectadas pelo sistema cromatográfico usado.

Utilizando o EIPP2A para a detecção de toxinas DSP obtêm-se resultados satisfatórios relativamente ao bioensaio e ao LC-MS, pelo que a sua introdução no programa de monitorização de biotoxinas pode revelar-se muito favorável, no que se refere à rapidez na obtenção dos resultados e ao facto do equipamento ser menos dispendioso. O método oficial utilizado detecta níveis mínimos de 0,8 µg AO/g HP,

correspondendo a um tempo médio de sobrevivência de 24 horas [6], enquanto que este estudo permitiu detectar níveis compreendidos entre 0,16 e 3,30  $\mu\text{g}$  AO/g HP.

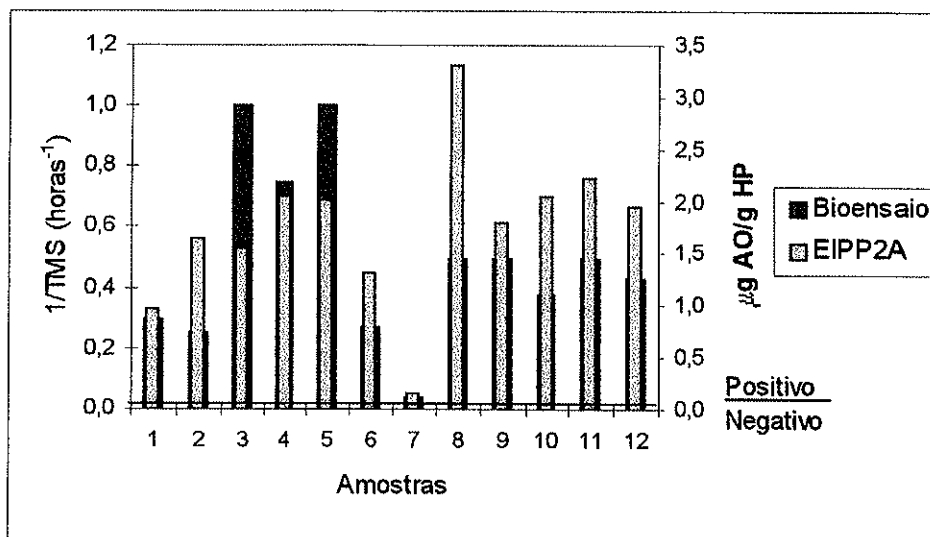


Figura 1 - Resultados obtidos por bioensaio e por EIPP2A, em que TMS é o tempo médio de sobrevivência dos ratinhos e os resultados do EIPP2A são médias de três análises. A linha assinalada refere-se ao valor mínimo do inverso de TMS (0,04) a partir do qual se considera o ensaio positivo, correspondendo a um tempo médio de sobrevivência de 24 horas.

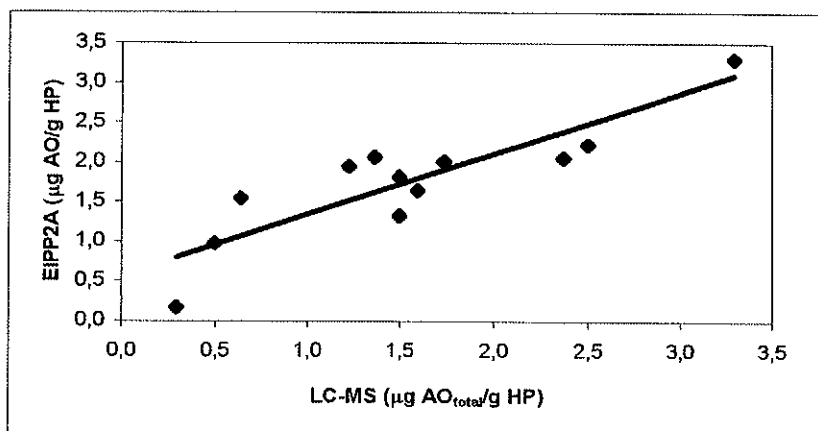


Figura 2 - Correlação entre as concentrações obtidas de AO através do EIPP2A e LC-MS, com um coeficiente de correlação de 0,77 a que corresponde um nível de significância menor que 0,01.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Vieytes, M. R.; Fontal, O. I.; Leira, F.; Baptista de Sousa, J. M. V.; Botana, L. M., 1997. A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal. Biochem.* 248 (2): 258-264.
- [2] Sampayo, M. A. M.; Franca, S.; Sousa, I.; Alvito, P.; Vale, P.; Botelho, M. J.; Rodrigues, S.; Vieira, A., 1997. Dez anos de monitorização de biotoxinas marinhas em Portugal (1986-1996). *Arq. INSA*, 23: 181-188.
- [3] Vale, P.; Sampayo, M. A. M., 1999. Esters of okadaic and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37 (8): 1109-1121
- [4] Lee, J. S.; Yanagi, T.; Kenma, R.; Yasumoto, T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51 (3): 877-81.
- [5] Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Matsumoto, G.K.; Clardy, J., 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In: E. P. RAGELIS (Ed.), *Seafood Toxins*, ACS Symposium Series, 262, 207-214. American Chemical Society, Washington, D.C.
- [6] Miguéz, A.; Fernández, M. L.; Cacho, E.; Martínez, A., 1998. Mouse survival time as a DSP toxicity criterion. In: B. REGUERA; J. BLANCO; M. L. FERNÁNDEZ; T. WYATT (Eds.) *Harmful algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Spain, 239-240.

## OUTRO VECTOR PARA A TRANSFERÊNCIA DE ÁCIDO DOMÓICO NA CADEIA ALIMENTAR MARINHA: A SARDINHA

Paulo Vale e Maria Antónia de M. Sampayo

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

---

### INTRODUÇÃO

A contaminação de moluscos bivalves na costa portuguesa com ácido domóico (DA) é um fenómeno recorrente que afecta várias vezes por ano os recursos explorados, principalmente na Primavera. O ácido domóico é a principal toxina amnésica, responsável pelo síndrome humano designado por Amnesic Shellfish Poisoning (ASP). A contaminação é devida à proliferação de microalgas produtoras da toxina do grupo das diatomáceas, género *Pseudo-nitzschia* (Vale e Sampayo, 2001).

Embora o síndrome humano não tenha sido novamente descrito no homem desde a sua descoberta no Canadá em 1987, diversos episódios de mortalidades maciças de aves e mamíferos marinhos foram atribuídos ao consumo de peixe contendo *Pseudo-nitzschia* tóxicas. O ácido domóico foi responsabilizado pela morte de pelicanos castanhos e corvos marinhos em Santa Cruz, Califórnia, em 1991 (Work *et al.*, 1993), pelicanos no Cabo San Lucas, México, em 1996 (Sierra Beltran *et al.*, 1987), e leões marinhos ao longo da costa central da Califórnia, em 1998 (Lefebvre *et al.*, 1999). Estudos recentes apontam ainda para um efeito comportamental do DA nos peixes. Lefebvre *et al.* (2000) verificaram que injeções de DA em anchovas causavam neuroexcitotoxicidade.

No início da Primavera de 2000, em simultâneo com a detecção de ácido domóico em bivalves, pesquisou-se pela primeira vez a presença de DA em peixes. A sardinha (*Sardina pilchardus*), sendo uma espécie planctívora, foi neste trabalho o principal alvo para pesquisa de contaminação. Testou-se espécimens provenientes de um

cruzeiro destinado ao estudo da distribuição de sardinha através de acústica que cobriu a totalidade da costa portuguesa.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras provenientes do Cruzeiro SAR00MAR foram colhidas entre 14 de Março e 1 de Abril de 2000 e eram constituídas por 15 indivíduos.

Para a determinação de DA na sardinha inteira, 6 indivíduos foram triturados numa picadora doméstica. Uma alíquota de 6 g foi extraída com 24 ml de metanol:água (4:1, v/v) e homogeneizada num ultraturrax, centrifugada e filtrada. Para a determinação de DA em tecidos da sardinha, 6 indivíduos foram dissecados, separadamente, em massa visceral, músculo e cérebro. Alíquotas de 4-5 g de músculo de cada indivíduo foram processadas como acima. A massa visceral de cada indivíduo foi extraída na totalidade, bem como o cérebro.

Os extractos foram analisados por cromatografia líquida de alta-precisão (HPLC) com separação em coluna de fase reversa e detecção com detector de varrimento de díodos (DAD) a 242 nm, de acordo com o descrito detalhadamente por Vale e Sampayo (2001).

## **RESULTADOS**

Na sardinha inteira o DA foi detectado, excedendo, por vezes, o limite regulamentar empregue para moluscos bivalves, de 20  $\mu\text{g DA g}^{-1}$  (Decreto-Lei n° 293/98), até ao máximo de 68  $\mu\text{g DA g}^{-1}$  encontrado numa estação da costa norte (Fig. 1).

A toxicidade está restringida ao conteúdo visceral e não se acumula no tecido muscular. A concentração máxima encontrada na massa visceral de um indivíduo foi de 637  $\mu\text{g DA g}^{-1}$ . Em contraste, o valor médio encontrado para o tecido muscular dos indivíduos amostrados na mesma estação foi de  $3,2 \pm 2,1 \mu\text{g DA g}^{-1}$ . No tecido cerebral os níveis foram geralmente inferiores a 1  $\mu\text{g DA g}^{-1}$  (Tabela 1).

O ácido isodomóico D estava presente na sardinha inteira numa percentagem média de 2,6% da concentração de DA, enquanto que nas vísceras este valor atingia os 4,8%.

A contaminação com DA foi confirmada por espectro de ultravioleta obtido com um detector de díodos. A amostra mais tóxica foi confirmada, recorrendo a cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (Fig. 2).

As amostras tóxicas foram encontradas somente na costa norte, coincidentes com a contaminação dos bivalves (Fig. 1). A observação microscópica do conteúdo visceral das sardinhas mais tóxicas mostrou a presença de numerosas frústulas de diatomáceas do grupo *Pseudo-nitzschia* spp.

## CONCLUSÕES

O ácido domóico foi a principal toxina amnésica encontrada na sardinha. Esta espécie, ao contrário dos bivalves, não parece constituir uma ameaça para a saúde pública dos consumidores, pois na parte edível mais usual – o tecido muscular – foram encontrados, somente, baixos níveis de ácido domóico, mesmo em exemplares fortemente contaminados.

No entanto, algumas pessoas consomem os juvenis de sardinha (o limite mínimo de captura é de 11 cm) fritos sem evisceração, o que pode constituir um perigo para este grupo de consumidores.

Como a toxicidade ASP na sardinha parece ser coincidente com a contaminação dos bivalves (ambos são colhidos relativamente próximo da costa), a monitorização destes últimos pode fornecer um indicador para a contaminação de outros recursos marinhos da faixa costeira. Quando níveis anormalmente elevados de ácido domóico forem encontrados em bivalves, a sardinha capturada na área respectiva deveria ser analisada para prevenir riscos para a saúde humana.

O DA é uma neurotoxina que pode atingir níveis elevados na cadeia trófica marinha em Portugal, através de peixes e até aves ou mamíferos marinhos, na eventualidade de um futuro aumento de proliferações destas microalgas tóxicas. Os baixos níveis de DA encontrados no cérebro da sardinha não sugerem que esta espécie possa sofrer facilmente efeitos comportamentais devido à ingestão de diatomáceas produtoras desta neurotoxina.

## AGRADECIMENTOS

Os projectos “Sanidade e Salubridade de moluscos bivalves” do Programa “PROPESCA” (QCAII/med.4) e FCT/PRAXIS 2/2.1/MAR/1718/95 “Modernização da detecção e quantificação de ficotoxinas marinhas” suportaram as análises laboratoriais. Agradecimentos são também devidos ao Programa PELASSES, que financiou o Cruzeiro SAR00MAR, que nos facultou as amostras de sardinha.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Decreto-Lei nº 293/98, 1998. Prescrições relativas aos moluscos bivalves vivos. *Diário da República*, Série I, nº 216, pp. 4828-4838.
- Lefebvre, K. A.; Steele, M.E.; Marshall, C.M.; Dovel, S.; Silver, M.W., 2000. Outward excitotoxic effects and tissue distribution of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy (*Engraulis mordax*). In: IX International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Australia, 7-11/February/2000. Abstract book pp. 31.
- Lefebvre, K.A.; Powell, C.L.; Busman, M.; Doucette, G.J.; Moeller, P.D.R.; Silver, J.B.; Miller, P.E.; Hughes, M.P.; Singaram, S.; Silver, M.W.; Tjeerdema, R.S., 1999. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Nat. Toxins*, 7: 85-92.
- Sierra Beltrán, A.; Palafox-Uribe, M.; Grajales-Montiel, J.; Cruz-Villacorta, A.; Ochoa J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon*, 35: 447-453.
- Vale, P.; Sampayo, M.A.M., 2001. Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon*, 39 (6): 893-904.
- Work, T.M.; Beale, A.M.; Fritz, L.; Quilliam, M.A.; Silver, M.; Buck, K.; Wright, J.L.C., 1993. Domoic acid intoxication of brown pelicans and cormorants in Santa Cruz, California. In: T. J. SMAYDA and Y. SHIMIZU (Eds.), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam. pp. 643-650.

Tabela 1 - Concentração de ácido domóico em tecidos de sardinha. Os resultados são a média de seis espécimens analisados individualmente.

| nº estação do cruzeiro | data da colheita | peso corporal (g ± sd) | visceras (µg DA/g±sd) | músculo (µg DA/g±sd) | cérebro (µg DA/g±sd) |
|------------------------|------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Ericeira*              | 10-Mar           | 30,8 ± 5,4             | 53,0 ± 11,8           | 2,9 ± 1,9            | 1,7 ± 1,4            |
| 1                      | 14-Mar           | 40,8 ± 10,3            | 225,9 ± 80,9          | 0,6 ± 0,4            | 0,6 ± 0,3            |
| 4                      | 17-Mar           | 21,1 ± 1,8             | 492,4 ± 199,9         | 3,2 ± 2,1            | 0,2 ± 0,2            |
| 5                      | 18-Mar           | 14,2 ± 1,5             | 297,4 ± 45,7          | 3,5 ± 1,7            | 0,5**                |

\* comprados no mercado da Ericeira.

\*\* analisados em conjunto.

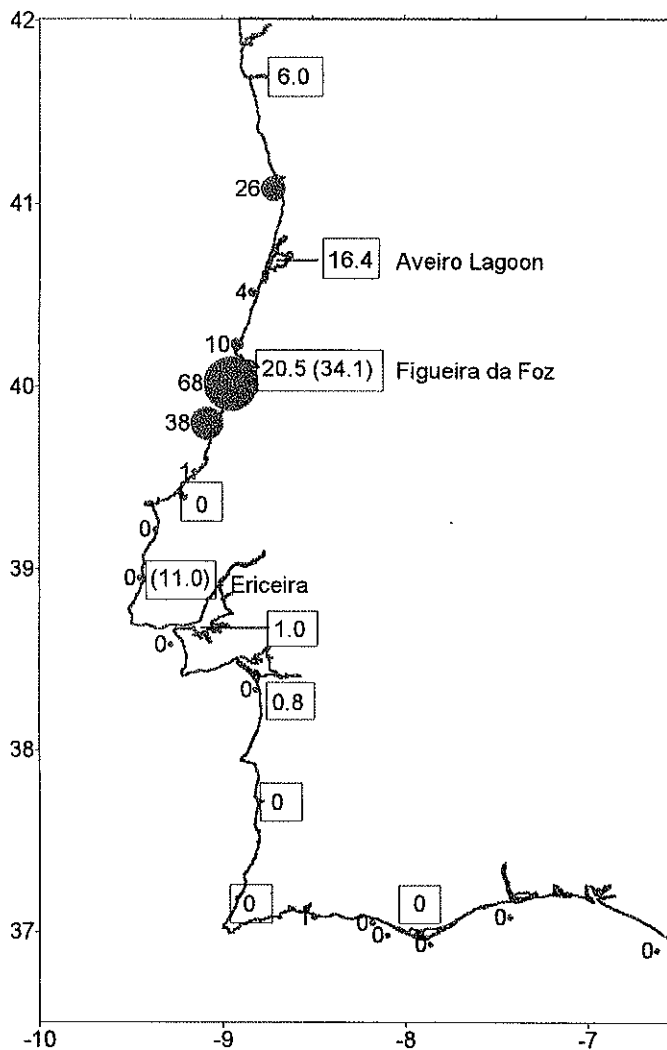


Figura 1 - Toxicidade ( $\mu\text{g DA/g}$ ) determinada em exemplares inteiros de sardinha. Os números dentro de quadrados representam as concentrações máximas de DA encontradas em diferentes espécies de bivalves colhidos entre 20 e 27 de Março de 2000 (os números entre parêntesis referem-se à semana anterior a este período).

**CARACTERIZAÇÃO MINERAL DE ALGUNS PRODUTOS DA PESCA  
CONSUMIDOS EM PORTUGAL**

S. Santiago\*; H.M. Lourenço\*; M.L. Nunes\*; M.L. Carvalho\*\*; C. Sousa Reis\*\*\*

\*Instituto de Investigação das Pescas e do Mar – Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

\*\*Centro de Física Atómica, da UL – Av. Prof. Gama Pinto, 2, 1649-003 Lisboa

\*\*\*Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Campo Grande, Edifício C2, 1749-016

---

**INTRODUÇÃO**

A preocupação com a saúde, a boa forma física e um aspecto saudável são prioridades que têm vindo a ganhar crescente importância na maior parte dos países. É, por isso, fundamental a ingestão, em quantidade e qualidade, dos nutrientes necessários a um bom funcionamento do organismo.

O pescado e seus derivados são produtos alimentares saudáveis e muito nutritivos, indispensáveis numa dieta equilibrada por serem, não só, uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico, de gordura, constituída por ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, e vitaminas liposolúveis (1), mas também devido à diversidade de substâncias minerais que comportam, algumas das quais consideradas únicas.

Nesta medida, tendo em conta que não existem estudos detalhados sobre a concentração mineral em espécies de pescado com interesse comercial em Portugal, foi objectivo deste estudo determinar a composição mineral aproximada e a concentração de alguns macro e microelementos considerados essenciais e outros com funções ainda desconhecidas. Pretendeu-se ainda aprofundar o conhecimento sobre a influência de alguns parâmetros bio-ecológicos na concentração desses minerais.

## METODOLOGIA

O estudo incidiu nas espécies: *Phycis phycis* (Ab-abrótea), *Pagellus acarne* (Be-besugo), *Argyrosomus regius* (Co-corvina), *Pagellus bogaraveo* (Gz-goraz), *Solea vulgaris* (L-linguado), *Pagrus pagrus* (Pa-pargo), *Diplodus sargus* (Sg-sargo), *Lophius piscatorius* (Ta-tamboril) e *Octopus vulgaris* (Pol-polvo).

Após chegada ao laboratório, todos os exemplares foram eviscerados, aproveitando-se apenas a parte edível para análise. Foram feitas amostras compostas sempre que a massa de um único exemplar não era suficiente. As amostras foram homogeneizadas, congeladas, liofilizadas e posteriormente, utilizadas na determinação dos elementos. A cinza foi determinada segundo a Norma Portuguesa NP 2030 (2). Os teores de cobre (Cu), crómio (Cr) e níquel (Ni) foram doseados de acordo com os métodos descritos no AOAC (3), por espectrofotometria de absorção atômica com chama. Os teores de potássio (K), enxofre (S), cloro (Cl), cálcio (Ca), ferro (Fe), zinco (Zn), selénio (Se), bromo (Br), estrôncio (Sr) e rubídio (Rb) foram determinados por espectroscopia por fluorescência de raios-X.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo mineral total médio (Fig.1) foi de 1,3 %, tendo variado entre 1,1 % (abrótea) e 1,4 % (linguado).

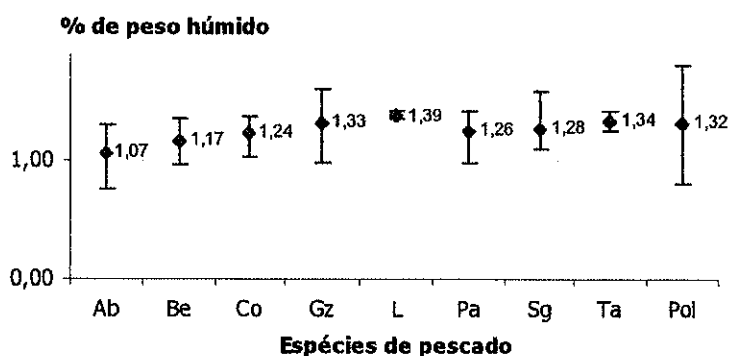


Figura 1 – Teor mineral total médio na parte edível de algumas espécies.

A ordem de concentração dos elementos analisados, numa escala decrescente, encontra-se na tabela 1. De um modo geral, todas as espécies apresentavam uma série

com ordem semelhante, sugerindo que um determinado elemento tem a mesma importância em qualquer organismo. O tamboril apresentava algumas diferenças em relação a este padrão comum e a grande exceção era o polvo, em que os diferentes elementos apresentavam uma ordem consideravelmente diferente.

A concentração de alguns microelementos analisados encontra-se descrita na tabela 2 e na figura 2, merecendo destaque as variações interespecíficas nos teores de Se, Br, Sr e Rb, por serem elementos de que se dispõe pouca informação no pescado.

Tabela 1 – Ordem decrescente da concentração dos elementos analisados.

| Espécie                    | N* | Ordem decrescente de concentração    |
|----------------------------|----|--------------------------------------|
| <i>Pagrus pagrus</i>       | 6  | K>S>Cl>Ca>Br>Zn>Fe>Sr>Se>Rb>Cu>Cr>Ni |
| <i>Pagellus acarne</i>     | 6  | K>S>Cl>Ca>Br>Zn>Fe>Sr>Se>Rb>Cu>Cr>Ni |
| <i>Phycis phycis</i>       | 6  | K>S>Cl>Ca>Br>Zn>Fe>Sr>Se>Cu>Cr>Ni>Rb |
| <i>Lophius piscatorius</i> | 9  | K>Cl>S>Ca>Br>Zn>Fe>Sr>Se>Rb>Cr>Cu>Ni |
| <i>Pagellus bogaraveo</i>  | 5  | K>S>Cl>Ca>Br>Zn>Fe>Sr>Se>Rb>Cr>Cu>Ni |
| <i>Diplodus sargus</i>     | 7  | K>S>Cl>Ca>Br>Zn>Fe>Sr>Se>Rb>Cu>Cr>Ni |
| <i>Solea vulgaris</i>      | 6  | K>S>Cl>Ca>Br>Zn>Fe>Sr>Se>Rb>Cr>Cu>Ni |
| <i>Argyrosomus regius</i>  | 6  | K>S>Cl>Ca>Br>Zn>Fe>Rb>Se>Sr>Cu>Cr>Ni |
| <i>Octopus vulgaris</i>    | 8  | Cl>S>K>Ca>Fe>Br>Zn>Sr>Cu>Rb>Cr>Ni>Se |

\* Número de amostras.

Considerando que o *habitat* pode influenciar a concentração dos vários elementos, foram efectuadas análises estatísticas entre grupos ecológicos de espécies, recorrendo a métodos apropriados. A comparação efectuada entre os grupos de espécies pelágicas, de fundos rochosos, de fundos móveis (areia/vasa) e de vários fundos, indicou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os quatro habitats estabelecidos para o Cl, Fe, Zn, Br e Sr. Paralelamente, encontraram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na concentração de S, K, Fe, Sr e Rb entre espécies neríticas (residentes dentro da plataforma continental) e oceânicas (residentes fora da plataforma continental).

Tabela 2 – Concentração de alguns microelementos em algumas espécies, expresso em mg/kg de peso seco (valor médio, máximo e mínimo).

|  | N<br>* | Fe                             | Cu                           | Zn                            | Cr                         | Ni                         |
|--|--------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Abrótea (Ab)</b><br><i>Phycis phycis</i>              | 6      | <b>6,43</b><br>(5,57-7,34)     | <b>0,97</b><br>(0,61-1,61)   | <b>15,92</b><br>(14,44-17,11) | <b>0,94</b><br>(0,72-1,30) | <b>0,11</b><br>(0,08-0,14) |
| <b>Besugo (Be)</b><br><i>Pagellus acarne</i>             | 6      | <b>16,00</b><br>(12,14-22,67)  | <b>1,07</b><br>(0,92-1,33)   | <b>19,75</b><br>(14,86-24,76) | <b>0,66</b><br>(0,16-0,99) | <b>0,14</b><br>(0,08-0,25) |
| <b>Corvina (Co)</b><br><i>Argyrosomus regius</i>         | 6      | <b>9,39</b><br>(7,16-14,80)    | <b>0,96</b><br>(0,63-1,25)   | <b>15,34</b><br>(14,85-16,10) | <b>0,81</b><br>(0,78-0,97) | <b>0,25</b><br>(0,09-0,32) |
| <b>Goraz (Gz)</b><br><i>Pagellus bogaraveo</i>           | 5      | <b>8,59</b><br>(6,66-9,74)     | <b>0,86</b><br>(0,56-1,26)   | <b>16,92</b><br>(14,62-20,31) | <b>1,26</b><br>(0,61-1,66) | <b>0,15</b><br>(0,09-0,25) |
| <b>Linguado (L)</b><br><i>Solea vulgaris</i>             | 6      | <b>8,97</b><br>(6,63-10,78)    | <b>0,92</b><br>(0,53-1,22)   | <b>22,39</b><br>(19,51-24,51) | <b>1,11</b><br>(0,86-1,30) | <b>0,15</b><br>(0,05-0,30) |
| <b>Pargo (Pa)</b><br><i>Pagrus pagrus</i>                | 6      | <b>8,86</b><br>(6,75-10,88)    | <b>1,31</b><br>(0,71-2,99)   | <b>14,30</b><br>(12,15-20,39) | <b>0,79</b><br>(0,58-1,07) | <b>0,14</b><br>(0,09-0,26) |
| <b>Sargo (Sg)</b><br><i>Diplodus sargus</i>              | 7      | <b>9,80</b><br>(7,89-11,34)    | <b>1,21</b><br>(0,90-1,44)   | <b>16,14</b><br>(13,67-18,89) | <b>0,98</b><br>(0,42-1,30) | <b>0,12</b><br>(0,09-0,16) |
| <b>Tamboril (Ta)</b><br><i>Lopholatilus chamaeleonis</i> | 9      | <b>7,78</b><br>(5,94-10,38)    | <b>1,04</b><br>(0,46-1,89)   | <b>20,81</b><br>(18,99-23,73) | <b>1,11</b><br>(0,00-2,07) | <b>0,16</b><br>(0,08-0,21) |
| <b>Poivo (Pol)</b><br><i>Octopus vulgaris</i>            | 8      | <b>109,48</b><br>(9,60-379,68) | <b>10,33</b><br>(6,58-16,20) | <b>70,85</b><br>(60,73-84,86) | <b>1,45</b><br>(1,14-2,13) | <b>0,24</b><br>(0,15-0,30) |

\* Número de amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Belitz, H.D.; Grosch, W. 1999. *Food Chemistry*. 2nd ed. Springer Ed. Germany, 992 p.
- (2) IPQ, 1988. Determinação do teor de cinza. NP 2032, 4 p.
- (3) AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemistry. Arlington, 684 p.

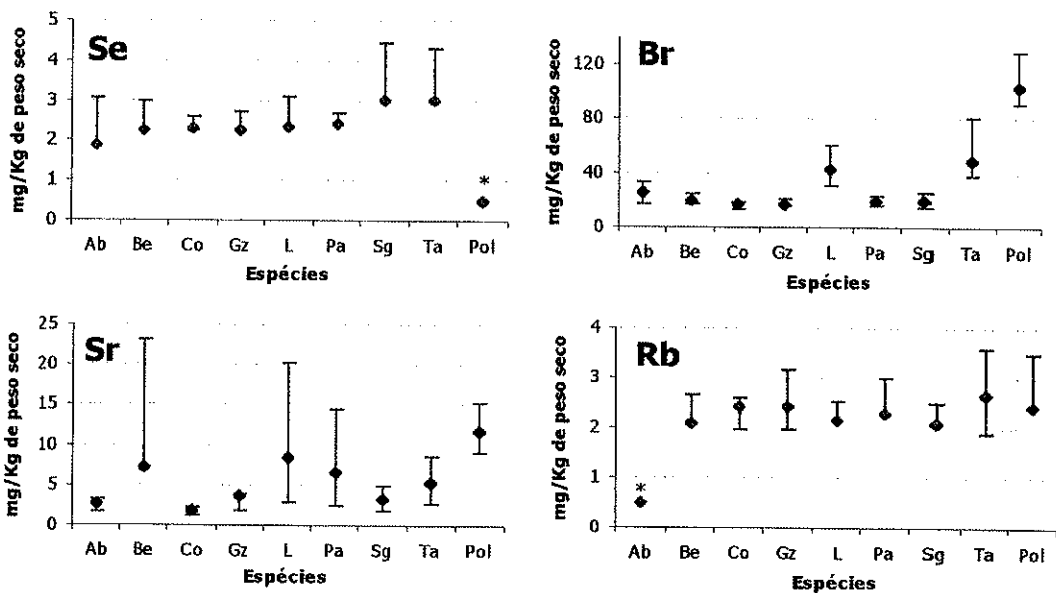


Figura 2 – Concentração média de Se, Br, Sr e Rb (mg/kg de peso seco) presente na parte edível do pescado. (\*Concentração <1,00 mg/kg de peso seco).



## DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PRODUTOS DA PESCA PARA ESTABELECIMENTO DE UMA DIETA APROPRIADA PARA ANIMAIS MARINHOS

\*Barreto, A. S.; \*\*Massei, K.; \*Ferreira, M.C.; \*Fraqueza, M. J.; \*Fernandes, M. J.; \*Ouakinin, J.

\*Faculdade de Medicina Veterinária - R. Prof. Cid dos Santos - Pólo Universitário - Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa

\*\*Zoomarine - Mundo Aquático - Parques Oceanográficos de Entretenimento Educativo, SA. E.N. 125, Km 65, 8200-864 Albufeira

---

### INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da investigação na área da biologia, nomeadamente na medicina veterinária, biotecnologia, zootecnia, etc., tem mostrado que os produtos da pesca são importantes fontes da maior parte dos compostos essenciais aos vertebrados, animais marinhos incluídos, sendo indispensáveis para uma dieta rica e equilibrada.

Alguns estudos efectuados (Saldanha, 1995) mostram que muitos dos problemas que mais frequentemente ocorrem com animais marinhos, estejam em ambiente selvagem ou controlado (cativeiro), podem estar relacionados com a alimentação, seja por deficiente qualidade dos produtos da pesca, seja porque há grandes variações nos valores calóricos de uma mesma espécie (Madrid *et al.*, 1999), leva a que ocorram flutuações no consumo de comida pelos animais o que influencia, conseqüentemente, para além do peso, o seu comportamento. No entanto, com base no valor calórico de um alimento, é possível formular, com alguma segurança, uma dieta correcta para o animal.

A existência de parques com animais marinhos em cativeiro implica que seja absolutamente necessário fornecer-lhes uma dieta equilibrada e adequada ao esforço

que desenvolvem, pelo que se impõe o estudo alargado das necessidades energéticas destes animais, envolvendo indivíduos adultos e em crescimento, de ambos os sexos, bem como fêmeas em diferentes estados de reprodução, na tentativa de obviar alguns problemas de saúde dos animais marinhos, geralmente relacionados com a alimentação.

## **OBJECTIVOS**

Este trabalho tem por finalidade determinar a composição química e o valor calórico de alguns produtos da pesca utilizados na alimentação de animais marinhos mantidos em cativeiro e submetidos a exercício, a fim de se calcular uma dieta equilibrada e adequada às suas necessidades fisiológicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisadas 110 amostras de 8 espécies diferentes de produtos da pesca - *Phycis phycis*, *Clupea harengus*, *Micromesistius poutassou*, *Mallotus villosus*, *Trachurus trachurus*, *Scomber japonicus*, *Loligo vulgaris*, *Sprattus sprattus* (Sanchez, 1989) - para determinação da sua composição química (teor de proteína, matéria gorda, humidade, cinza total e glúcidos) e cálculo dos respectivos conteúdos calóricos.

Todas as determinações foram efectuadas segundo as técnicas indicadas nas respectivas Normas Portuguesas (NP 1612 (1979), NP 1613 (1979), NP 1614 (1979) e NP 1615 (1979)).

## **RESULTADOS**

Os valores obtidos nas determinações analíticas efectuadas para cálculo da composição centesimal e a sua conversão em valor calórico são apresentados na Tabela 1.

Na figura 1 mostra-se a variação do valor calórico das diferentes espécies de produtos da pesca analisados.

Tabela 1 - Composição centesimal das diferentes espécies de produtos de pesca estudados.

| ESPÉCIES DE PEIXE                                   | HUMIDADE % |      | MATÉRIA GORDA % |      | PROTEÍNA % |      | CINZA TOTAL % |      | GLÚCIDOS % |      | VALOR CALÓRICO (Kcal) |      |
|---|------------|------|-----------------|------|------------|------|---------------|------|------------|------|-----------------------|------|
|   | ↳          | D.P. | ↳               | D.P. | ↳          | D.P. | ↳             | D.P. | ↳          | D.P. | ↳                     | D.P. |
| <i>Phycis phycis</i><br>(Abrotoeu; n=4)             | 80,3       | 2,2  | 0,6             | 0,7  | 17,2       | 1,9  | 1,6           | 0,3  | 0,5        | 1,0  | 76,1                  | 11,1 |
| <i>Clupea harengus</i><br>(Arenque; n=24)           | 71,9       | 5,7  | 8,8             | 5,4  | 15,9       | 1,4  | 2,8           | 0,9  | 0,6        | 0,9  | 144,9                 | 50,0 |
| <i>Micromesistius poutassou</i><br>(Pechelim; n=18) | 72,8       | 5,1  | 8,5             | 6,3  | 16,4       | 0,7  | 3,1           | 1,1  | 0,4        | 0,7  | 143,8                 | 56,3 |
| <i>Mallotus villosus</i><br>(Capelim; n=8)          | 71,0       | 4,2  | 11,2            | 5,2  | 15,3       | 2,0  | 2,2           | 0,5  | 0,4        | 0,5  | 164,1                 | 41,8 |
| <i>Trachurus trachurus</i><br>(Carapau; n=11)       | 74,3       | 6,3  | 6,6             | 6,8  | 15,8       | 1,5  | 2,8           | 1,6  | 0,8        | 1,0  | 118,7                 | 57,8 |
| <i>Scomber japonicus</i><br>(Cavala; n=23)          | 72,6       | 5,7  | 8,6             | 5,6  | 16,0       | 1,5  | 2,6           | 0,6  | 0,4        | 0,4  | 142,7                 | 50,9 |
| <i>Loligo vulgaris</i><br>(Lula; n=8)               | 70,6       | 7,0  | 10,3            | 7,1  | 16,2       | 0,5  | 2,3           | 0,7  | 0,8        | 0,7  | 161,0                 | 63,2 |
| <i>Sprattus sprattus</i><br>(Sprat; n=14)           | 72,7       | 5,7  | 7,9             | 6,1  | 16,6       | 1,0  | 2,8           | 0,9  | 0,3        | 0,5  | 139,0                 | 53,2 |

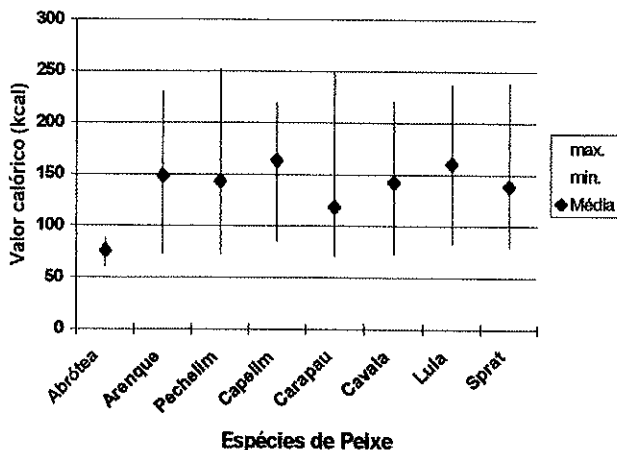


Figura 1 - Valor calórico das diferentes espécies de produtos de pesca estudados.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A grande variação do teor em matéria gorda observada, de um modo geral, dentro de cada espécie de produtos da pesca analisada, revela que as amostras se referem a pescado capturado em diferentes épocas do ano e em diferentes estados fisiológicos.

Os resultados mostram que para a formulação de uma dieta para animais marinhos é fundamental, independentemente da espécie, conhecer a época de captura dos produtos da pesca a utilizar.

Julga-se da maior importância aprofundar o estudo das matérias primas no que se refere ao índice de frescura, para o que é necessário o conhecimento da data de captura das espécies.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

IPQ, 1979. NP 1612 Carnes, Derivados e Produtos Cárneos – “Determinação do teor de azoto total. Método de referência”, Lisboa, 3 p.

IPQ, 1979. NP 1613 Carnes, Derivados e Produtos Cárneos – “Determinação da matéria gorda total. Método de referência”, Lisboa, 2 p.

IPQ, 1979. NP 1614. Carnes, Derivados e Produtos Cárneos – “Determinação da humidade. Processo de referência”, Lisboa, 2 p.

IPQ, 1979. NP 1615 Carnes, Derivados e Produtos Cárneos – “Determinação da cinza total”, Lisboa, 2 p.

Madrid, A.; Vicente, M. J. ; Madrid, R. 1999. El Pescado y sus Productos Derivados. 2ª ed. Amv Ediciones, Mundi-Prensa, pp. 29-44.

Saldanha, L. 1995. Fauna Submarina Atlântica. Ed. Publicações Europa-América, 364 p.

Sanches, J.G. 1989. Nomenclatura Portuguesa de Organismos Aquáticos. I.N.I.P., Lisboa, 322 p.

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO EM VÁRIAS FASES DO PROCESSAMENTO DE SARDINHA ULTRACONGELADA**

L. Pedroso\*, F. Telles\*, A. Louçã\*, M. Chagas\*\*

\* Unidade de Farmacoterapia, Nutrição e Estudos Biofarmacêuticos

Instituto Superior de Ciências da Saúde-Sul, 2829-511 Monte da Caparica

\*\* Gelpinhos- Peixe congelado, Lda, 2525-369 Atouguia da Baleia Peniche

---

**OBJECTIVO**

O presente estudo teve como objectivos a avaliação do perfil microbiológico nas diferentes fases de processamento de sardinha ultracongelada e a avaliação de diferentes métodos de preparação da amostra para análise microbiológica.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisadas 114 amostras de sardinha (57 amostras com pele e músculo e 57 amostras de músculo), para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais, coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*; 60 amostras para pesquisa de *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp.; e 46 amostras para pesquisa de *Salmonella* spp. Foram ainda analisadas amostras da água de salmoura e da água de vidragem para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*.

As amostras analisadas neste estudo foram colhidas entre Julho e Setembro, num total de seis lotes de fabrico de dois fornecedores. As amostras foram retiradas em várias etapas do processamento da sardinha- recepção da matéria prima, armazenagem da matéria prima, estabilização após vidragem e embalamento- e divididas em dois grupos. Num dos grupos (A) a amostra para análise incluiu a pele e o músculo, no

outro grupo (B), a pele foi removida segundo a NP 3006:1985, Pescado- Preparação da amostra para análise microbiológica.

Na preparação da amostra foram removidos, assepticamente, 25 g de músculo ou de pele e músculo. As amostras foram colocadas em saco estéril ao qual se adicionou 225 ml de Triptona Sal (BK014HA) e homogeneizadas em Stomacher (Lab Blender, Seard Med, England), durante 2 minutos. Efectuou-se de seguida as diluições decimais necessárias. As contagens de bactérias mesófilas totais foram obtidas no meio de cultura Plate Count Agar (bioMérieux 51072), incubado a 30°C durante 48 horas. As contagens de coliformes totais e *E. coli* foram obtidas utilizando o meio Chromocult Coliform Agar (Merck 1.10426) incubado a 37°C durante 48 horas. As contagens de *Staphylococcus aureus* foram obtidas utilizando o meio Baird Parker Agar com Rabbit Plasma Fibrogen (bioMérieux 44003) incubado a 37°C durante 48 horas. As contagens foram expressas em log<sub>10</sub> ufc/g para o cálculo de médias e desvio padrão.

Para a pesquisa de *Listeria* spp, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp utilizou-se a técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) no sistema automático (mini Vidas bioMérieux 99090), procedendo à preparação da amostra de acordo com o recomendado pelo fornecedor. A pesquisa de *Vibrio* spp. foi efectuada em meio de cultura TCBS (BK 040), segundo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do perfil microbiológico das diferentes fases do processamento da sardinha ultracongelada, os resultados obtidos para microrganismos mesófilos aeróbios totais, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*, entre as fases de recepção da matéria prima até ao embalamento do produto final (Tabela 1), sugerem que o processamento do produto, está em conformidade com as boas práticas de fabrico e higiene. Nas amostras de matéria prima e produto acabado, nunca foi detectada a presença de bactérias patogénicas: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp.

O aumento de 0,9 log<sub>10</sub> ufc/g para microrganismos mesófilos aeróbios totais, 0,5 log<sub>10</sub> ufc/g para coliformes totais e de 0,7 log<sub>10</sub> ufc/g para *S. aureus*, entre as fases de recepção da matéria prima e o final da ultracongelação (Tabela 1) pode estar

relacionado com o tempo de espera entre estas operações e/ou com a contaminação do produto pela salmoura (Tabela 2).

Tabela 1 - Avaliação microbiológica (média  $\log_{10}$  ufc/g e desvio padrão - dp) dos resultados obtidos nas várias etapas do processo tecnológico da sardinha ultracongelada.

| Etapas do processo tecnológico               | Microrganismos |                   |                |                  |
|--|----------------|-------------------|----------------|------------------|
|  | Mesófilos      | Coliformes totais | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| Recepção da matéria prima<br>n = 36 (dp)     | 2,8 (0,6)      | 1,1 (0,3)         | 1,0 (0,0)      | 1,0 (0,0)        |
| Ultracongelação após salmoura<br>n = 30 (dp) | 3,7 (0,6)      | 1,6 (0,7)         | 1,1 (0,1)      | 1,7 (0,1)        |
| Estabilização após vidragem<br>n = 24 (dp)   | 3,5 (0,6)      | 1,1 (0,3)         | 1,0 (0,0)      | 1,0 (0,1)        |
| Embalamento<br>n = 24 (dp)                   | 3,7 (0,9)      | 1,7 (0,7)         | 1,0 (0,2)      | 1,0 (0,0)        |

n = número de amostras.

Embora nunca se tenham obtido contagens para *E. coli* e *S. aureus* nas águas de salmoura e de vidragem, os resultados obtidos para microrganismos mesófilos aeróbios totais e coliformes totais (Tabela 2), evidenciam a importância do controlo nestes pontos do processo, por forma a garantir a salubridade e a segurança do produto final.

Na avaliação dos dois diferentes métodos de preparação da amostra para análise microbiológica, para um mesmo lote e etapas em estudo, os valores obtidos nas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios totais, em amostras de músculo e sem pele (segundo a NP 3006:1985), foram significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) às amostras analisadas com músculo e pele. Não se verificaram diferenças significativas para os outros microrganismos em estudo (Tabela 3). Os resultados sugerem que, para a verificação do processo de fabrico, as amostras de sardinha com pele e músculo

reflectem, de uma forma mais eficaz, as variações do processo, pelo que nestes casos não será recomendada a preparação da amostra de acordo com a NP 3006:1985.

Tabela 2 - Avaliação microbiológica (média do  $\log_{10}$  ufc/g e desvio padrão - dp) da salmoura (n =10) e da água de vidragem (n = 10) usadas no processamento de sardinha ultracongelada durante o período experimental.

| Microrganismos    | Salmoura   | Água de vidragem |
|-------------------|------------|------------------|
|                   | Média (dp) | Média (dp)       |
| Mesófilos         | 3,7 (0,8)  | 5,0 (1,9)        |
| Coliformes totais | 1,2 (0,2)  | 1,2 (0,5)        |

n = número de amostras.

Tabela 3 - Resultados microbiológicos (média ufc/g, média do  $\log_{10}$  ufc/g e desvio padrão - dp) das amostras preparadas com pele e músculo (A, n = 57) ou músculo (B, n = 57).

| Microrganismos          | A                 |                | B                 |                | <i>t de Student</i> |
|-------------------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|---------------------|
|                         | ufc/g             | log ufc/g (dp) | ufc/g             | log ufc/g (dp) |                     |
| Mesófilos               | $8,9 \times 10^3$ | 3,6 (0,6)      | $5,2 \times 10^3$ | 3,1 (0,8)      | P < 0,05            |
| Coliformes totais       | $1,2 \times 10^2$ | 1,4 (0,6)      | $6,7 \times 10$   | 1,3 (0,5)      | P > 0,05            |
| <i>Escherichia coli</i> | $1,1 \times 10$   | 1,0 (0,1)      | $1,1 \times 10$   | 1,0 (0,1)      | P > 0,05            |
| <i>S. aureus</i>        | $1,1 \times 10$   | 1,0 (0,1)      | $1,0 \times 10$   | 1,0 (0,1)      | P > 0,05            |

n = número de amostras.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois métodos de preparação da amostra para contagens de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* (Tabela 3). O aumento de apenas 0,5  $\log_{10}$  de ufc/g, obtido nas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios totais aquando da preparação da amostra sem remoção da pele,

sugere que este método de preparação da amostra possa substituir, para o produto em estudo, o recomendado na NP 3006:1985, dadas as vantagens em termos de tempo e trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Gelpinhos SA Lda a possibilidade da realização e apoio financeiro ao presente estudo.

Agradecemos à Dr<sup>a</sup> Fátima Loja, Dr<sup>a</sup> Celcidina Gomes, Sr<sup>a</sup> Angelina Moita e restante equipa do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária-Departamento de Higiene Pública, pela colaboração no método laboratorial de *Vibrio* spp; ao Professor Doutor Pedro Marques Vidal do Instituto Superior de Ciências da Saúde-Sul, pela colaboração no tratamento estatístico dos resultados.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

IPQ, 1985. NP-3006, Pescado - Preparação da amostra para análise microbiológica.

ISO 8914:1990 Microbiology- General guidance for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Baumann, P.; Schubert, R. H. W., 1984. Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. *Vibrionaceae*. 516-538. In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol. I. J.G. Holt e N.R. Krieg. Williams & Wilkins, Baltimore.



## **P14**

### **TEOR VITAMÍNICO DE PESCADO CONSUMIDO EM PORTUGAL**

Dias, M.G.; Sánchez, M.V.; Romba, H.; Oliveira, L.

Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – Laboratório de Bromatologia e Nutrição  
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa

#### **OBJECTIVOS**

No âmbito do projecto PRAXIS XXI 1747/95 “Composição e valor nutricional de pescado consumido em Portugal e avaliação dos efeitos biológicos de óleos de peixe” determinaram-se os teores das vitaminas A, E, D, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e folatos em 21 espécies de pescado. Estes valores, que na fase actual do estudo são indicativos pretendem contribuir para colmatar a falta de dados sobre os teores vitamínicos de pescado consumido em Portugal que, na sua maioria, não constam nas Tabelas Internacionais de Composição dos Alimentos.

#### **MATERIAL E MÉTODOS**

Analisou-se a parte edível, em cru, de uma amostra representativa de cada um dos 21 produtos. Foram também analisadas amostras de pescada cozinhada nas formas cozida, frita e em filetes com polme fritos e de sardinha em conserva, em água (sem pele e sem espinhas) e em azeite (com pele e espinhas).

As vitaminas A, E, D, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>6</sub> foram analisadas por Métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) respectivamente, método de Brubacher *et al.* (1985), EN 12822 (1999), EN 12821 (1999) e métodos descritos nos Anexos I, II, III do Journal Officiel de la République Française (4.02.1999). Os folatos foram analisados pelo método microbiológico em microplaca prEN 14131.

diariamente. Relativamente à vitamina D verificou-se que 77% das espécies fornecem entre 120% e 6420% da DDR e que em 23% das espécies estudadas (cação, maruca, raia, choco e polvo) esta vitamina não foi detectada.

Para os produtos da pesca analisados apresentam-se na Tabela 1 os resultados preliminares dos teores das vitaminas A, E, D, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e folatos.

## **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

A Tabela de composição de alimentos portuguesa contém um reduzido número de espécies de peixe e apenas para as vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e PP. É sabido que as espécies consumidas em Portugal são diferentes das dos outros países; por isso os dados das tabelas de composição inglesa, francesa e americana não contêm os teores vitamínicos da grande maioria do pescado consumido em Portugal. A importância do presente trabalho reside portanto em permitir conhecer o teor em algumas vitaminas de pescado consumido em Portugal. Como se pode verificar a partir dos resultados obtidos há uma grande variação do teor vitamínico de espécie para espécie, o que aumenta a necessidade de conhecimento destes valores.

É ainda de salientar a importância da inclusão de cozinhados neste trabalho o que permitirá, por exemplo, aos nutricionistas utilizar dados não obtidos por cálculo.

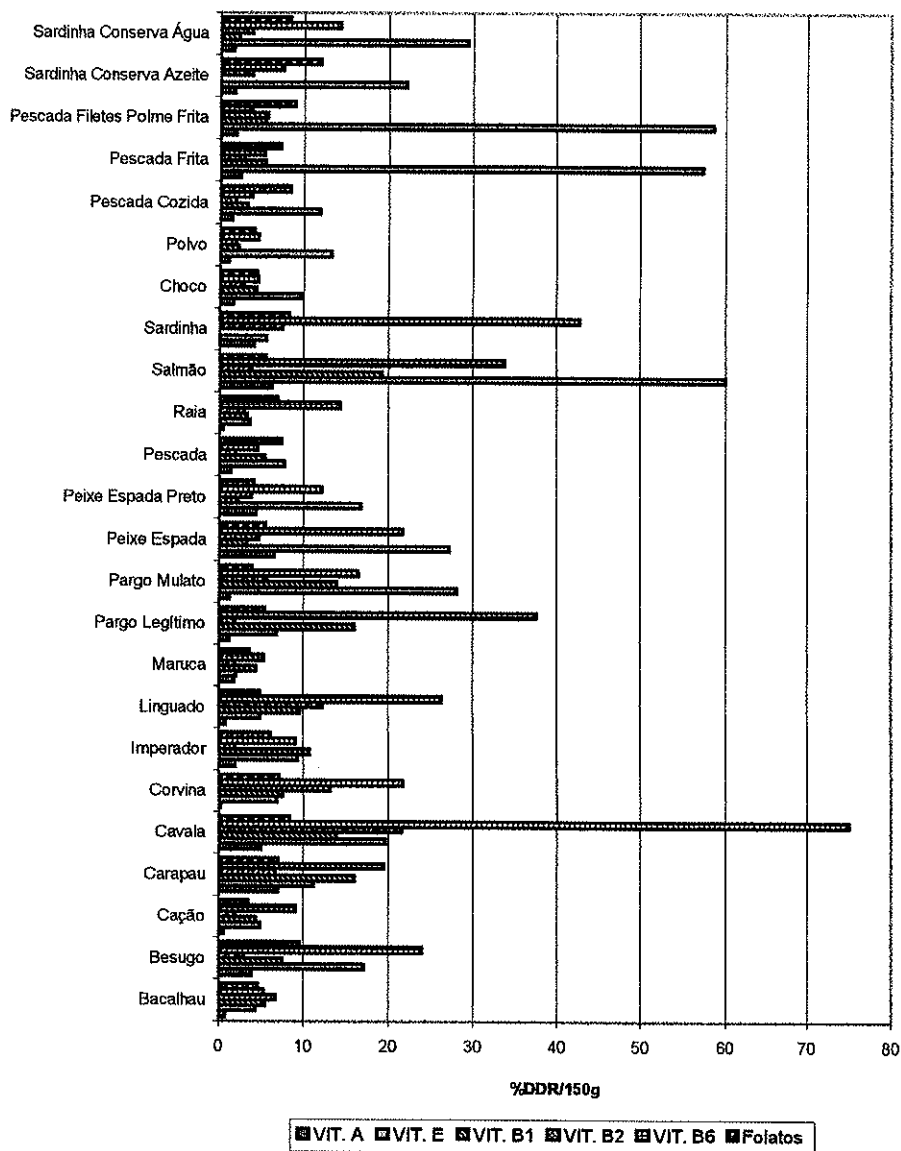


Figura 1 – Teor vitamínico do pescado consumido em Portugal (produto cru).

**DDR (Dose Diária Recomendada)**

|                          |        |                         |        |
|--------------------------|--------|-------------------------|--------|
| Vitamina A               | 800 µg | Vitamina B <sub>1</sub> | 1,4 mg |
| Vitamina D               | 5 µg   | Vitamina B <sub>2</sub> | 1,6 mg |
| Vitamina B <sub>12</sub> | 1 µg   | Vitamina B <sub>6</sub> | 2 mg   |
| Ácido fólico             | 200 µg | Vitamina E              | 10 mg  |

Tabela 1 – Valores preliminares do teor vitamínico de pescado consumido em Portugal.

| Espécies   | Vit. B1<br>(mg/100g) | Vit. B2<br>(mg/100g) | Vit. B6<br>(mg/100g) | A<br>(µg/100g) | E<br>(mg/100g) | D<br>(µg/100g) | Folatos<br>(µg/100g) |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|
| Bacalhau   | 0,05                 | 0,068                | 0,07                 | 4              | 0,28           | 5              | 6                    |
| Besugo     | 0,07                 | 0,031                | 0,316                | 20             | 1,14           | 6              | 13                   |
| Cação      | (0,04)               | 0,018                | 0,12                 | 3              | 0,32           | n.d.           | 4                    |
| Carapau    | 0,15                 | 0,072                | 0,26                 | 37             | 0,74           | 87             | 9                    |
| Cavala     | 0,13                 | 0,231                | 1,00                 | 26             | 1,31           | 24             | 11                   |
| Choco      | (0,04)               | 0,030                | 0,06                 | 8              | 0,65           | n.d.           | 6                    |
| Corvina    | 0,07                 | 0,137                | 0,29                 | 1              | 0,45           | 155            | 9                    |
| Enguia     | 0,28                 | 0,262                | 0,15                 | 887            | 2,37           | 16             | 7                    |
| Imperador  | 0,10                 | 0,015                | 0,12                 | 10             | 0,62           | 27             | 8                    |
| Linguado   | 0,09                 | 0,132                | 0,35                 | 4              | 0,32           | 9              | 6                    |
| Maruca     | (0,04)               | 0,019                | 0,07                 | 9              | 0,13           | n.d.           | 5                    |
| Pargo Leg  | 0,15                 | 0,023                | 0,50                 | 6              | 0,45           | 90             | 7                    |
| Pargo Mul  | 0,13                 | 0,064                | 0,22                 | 6              | 1,87           | 9              | 5                    |
| P Espada   | (0,03)               | 0,053                | 0,29                 | 34             | 1,81           | 73             | 7                    |
| P Esp Pre  | (0,02)               | 0,038                | 0,16                 | 23             | 1,12           | 21             | 6                    |
| Pescada    | 0,05                 | 0,024                | 0,06                 | 7              | 0,51           | 11             | 10                   |
| Pesc Cozi  | (0,03)               | 0,019                | 0,05                 | 7              | 0,79           | 11             | 11                   |
| Pesc Frita | 0,05                 | 0,031                | 0,07                 | 13             | 3,82           | 8              | 10                   |
| Pesc Pol   | 0,05                 | 0,058                | 0,05                 | 10             | 3,90           | n.d.           | 12                   |
| Polvo      | (0,02)               | 0,024                | 0,06                 | 5              | 0,88           | n.d.           | 6                    |
| Raia       | (0,03)               | 0,033                | 0,19                 | 2              | 0,24           | n.d.           | 9                    |
| Salmão     | 0,18                 | 0,041                | 0,45                 | 33             | 4,00           | 110            | 7                    |
| Sarda      | 0,15                 | 0,185                | 0,43                 | 59             | 1,46           | 93             | 11                   |
| Sardinha   | n.d.                 | 0,081                | 0,57                 | 22             | 0,37           | 214            | 11                   |
| S Con Ag   | 0,02                 | 0,039                | 0,19                 | 8              | 1,96           | 10             | 11                   |
| S Con Az   | n.d.                 | 0,036                | 0,10                 | 9              | 1,47           | 9              | 16                   |

n.d. – valor inferior ao limite de detecção;

( ) – valor inferior ao limite de quantificação e superior ao limite de detecção.

Pargo Leg – Pargo legítimo;

Pargo Mul – Pargo mulato;

P Espada – Peixe-espada;

P Esp Pre – Peixe-espada-preto;

Pesc Cozi – Pescada cozida;

Pesc Frita – Pescada frita;

Pesc Pol – Filetes de pescada com polme fritos;

S Con Ag – Sardinha de conserva em água;

S Con Az – Sardinha de conserva em azeite.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ferreira, F.A. G.; Graça, M.E. S., 1977. Tabela da composição dos alimentos portugueses, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 186 p.

Greenfield, H.; Southgate, D.A.T., 1992. Food Composition Data – Production, Management and Use, Elsevier Applied Science.

Documento 390L0496. Eur-Lex – legislação comunitária em vigor.



## VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE DOSEAMENTO DAS VITAMINAS B1, B2, B6 E FOLATOS

Sánchez, M.V.; Dias, M.G.; Romba, H.; Oliveira, L.

Centro de Segurança Alimentar e Nutrição – Laboratório de Bromatologia e Nutrição

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa

---

### INTRODUÇÃO

A validação dos métodos de ensaio utilizados na produção de resultados analíticos é essencial à sua qualidade e ao seu reconhecimento pela comunidade científica. O processo de validação visa evidenciar e permite avaliar as características de desempenho do método de ensaio. Apresentam-se as características das curvas de referência, os limites de detecção e de quantificação (analíticos e na amostra), a precisão e a exactidão dos métodos utilizados na determinação do teor das vitaminas B1 (J.O.R.F., 4/2/99, anexo I), B2 (J.O.R.F., 4/2/99, anexo II), B6 (J.O.R.F., 4/2/99, anexo III) e folatos (prEN14131) em pescado. Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto PRAXIS XXI “Composição e valor nutricional de pescado consumido em Portugal e avaliação dos efeitos biológicos de óleos de peixe”.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Curvas de referência*

As curvas de referência são avaliadas através da representação gráfica da curva de regressão com os correspondentes pontos experimentais e do coeficiente de correlação, para verificação da qualidade do ajuste. O coeficiente de correlação é o valor médio dos coeficientes de correlação de 12-14 curvas de referência realizadas em dias diferentes e respectivo desvio padrão.

Para as vitaminas B1, B2 e B6 o limite de detecção analítico é o valor médio dos limites de detecção obtidos a partir de 12-14 curvas de referência realizadas em dias diferentes, determinados da seguinte forma:  $L.D. = 3,3 \times S_{y/x}/b$ , em que:  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de referência e  $b$  é o declive da mesma. Para os folatos o limite de detecção analítico é o valor médio dos limites de detecção obtidos a partir de 12 microplacas realizadas em dias diferentes, determinados da seguinte forma:  $L.D. = X_0 + 3,3 \times S_0$ , em que:  $X_0$  é a média aritmética do teor medido de uma série de 12 brancos e  $S_0$  é o desvio padrão associado a  $X_0$ .

O limite de detecção na amostra é calculado a partir do limite de detecção analítico e tendo em conta a toma máxima de amostra para análise.

#### *Limites de Quantificação (L.Q.)*

Os limites de quantificação são determinados da mesma forma que os L.D. substituindo o factor 3,3 por 10. *Precisão*

A precisão é expressa em repetibilidade ( $r$ ) e é determinada de acordo com a norma ISO 5725(1986), analisando-se, por dia, 5-6 réplicas de uma amostra homogénea, em 3 dias diferentes.

#### *Exactidão*

A exactidão é avaliada através da participação nos programas internacionais de ensaios interlaboratoriais de aptidão BIPEA - Bureau Interprofessionel d'Études Analytiques - Produits Dietétiques et de Régime - França e FAPAS - Food Analysis Performance Assessment Scheme - Reino Unido. O desempenho do laboratório foi avaliado, utilizando a expressão  $z = (X_{lab} - X_v)/s$ , em que  $X_{lab}$  é o valor obtido experimentalmente pelo Laboratório,  $X_v$  é o valor aceite como verdadeiro e  $s$  o desvio considerado pela entidade organizadora.

Tabela 1 - Características dos métodos de ensaio.

|                                 | Vit. B <sub>1</sub>  | Vit. B <sub>2</sub>  | Vit. B <sub>6</sub>  | Folatos            |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| Coefficiente correlação         | 0,9993<br>(s=0,0003) | 0,9996<br>(s=0,0003) | 0,9995<br>(s=0,0004) | 0,997<br>(s=0,001) |
| L.D. analítico (µg/ml)          | 0,002                | 0,004                | 0,007                | 0,000009           |
| L.Q. analítico (µg/ml)          | 0,005                | 0,013                | 0,021                | 0,00001            |
| L.D. na amostra (mg/100g)       | 0,02                 | 0,004                | 0,01                 | 0,00009            |
| L.Q. na amostra (mg/100g)       | 0,05                 | 0,013                | 0,04                 | 0,0001             |
| Precisão                        |                      |                      |                      |                    |
| Teor médio na amostra (mg/100g) | 0,05                 | 0,017                | 0,09                 | 0,016              |
| Repetibilidade (r) (mg/100g)    | 0,01                 | 0,003                | 0,01                 | 0,006              |

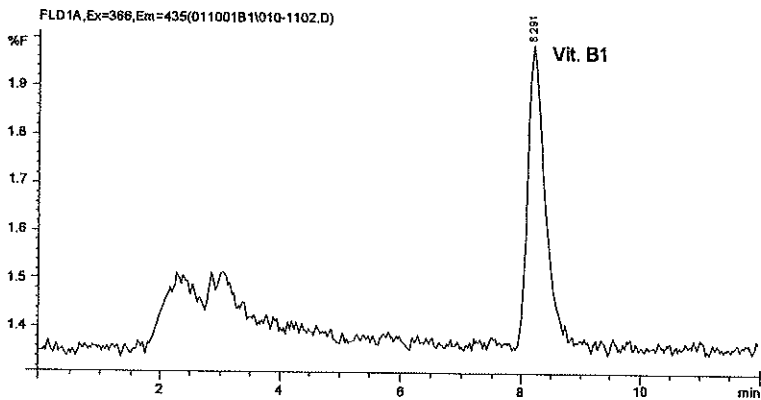


Figura 1 - Cromatograma de doseamento de vitamina. B1 em filetes de pescada fritos com polme.

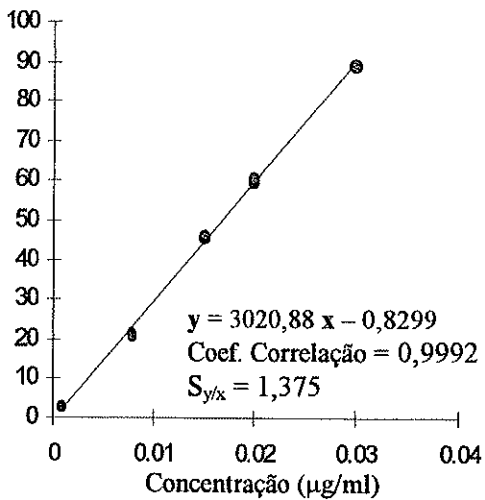


Figura 2 - Exemplo de curva de referência de vitamina B1.

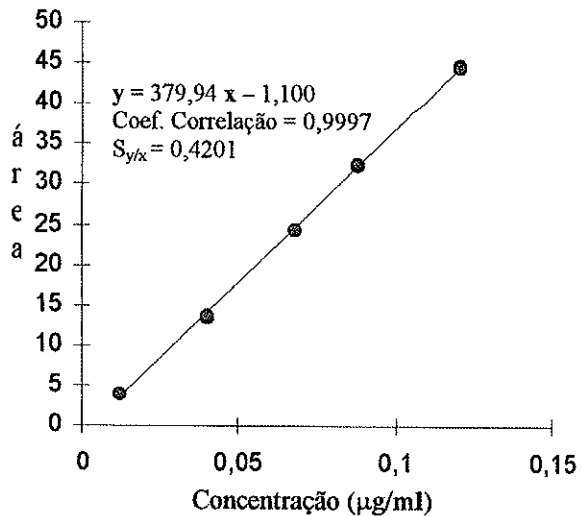


Figura 3 - Exemplo de curva de referência de vitamina B2.

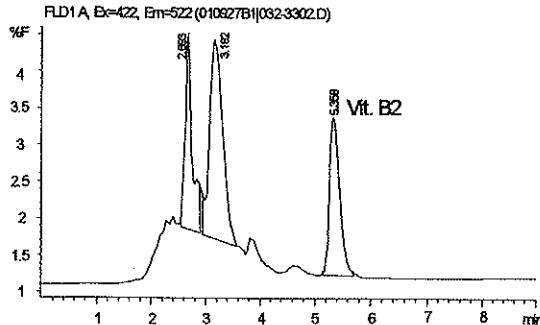


Figura 4 - Cromatograma de doseamento de vitamina B2 em sardinha.

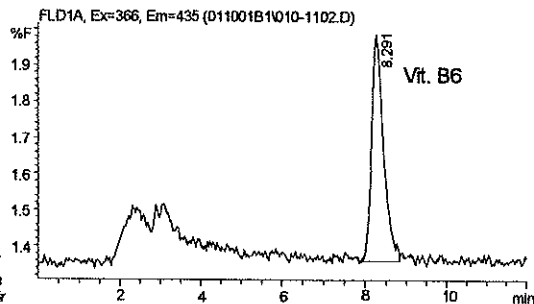


Figura 5 - Cromatograma de doseamento de vitamina B6 em salmão.

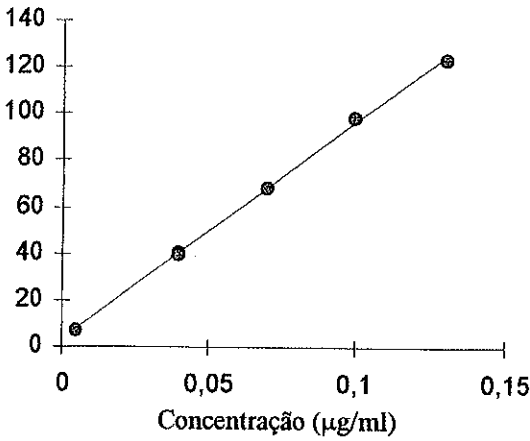


Figura 6 - Exemplo de curva de referência de vitamina B6.

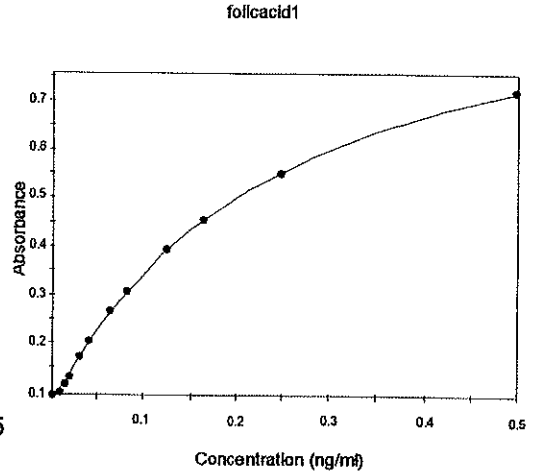


Figura 7 - Exemplo de curva de referência de folatos.

$$y = (A-D) / [1 + (x/C)^B + D]$$

A = 0,0703 B = 1,0000 C = 0,2615  
D = 1,0587, R<sup>2</sup> = 0,9987

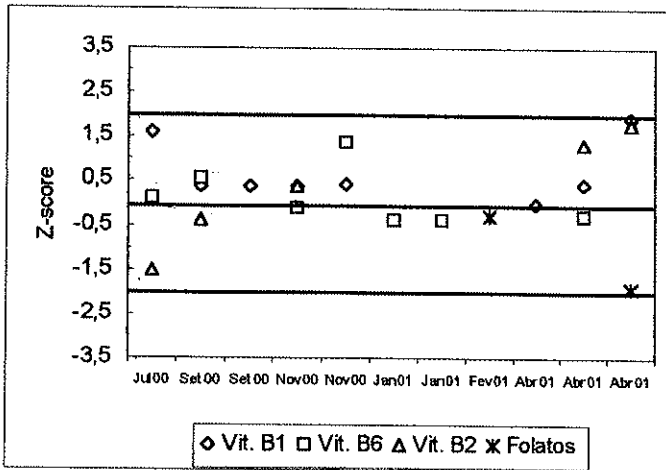


Figura 8 - Exactidão. Resultados da participação nos Ensaios Interlaboratoriais de Aptidão BIPEA e FAPAS.

|Z| ≤ 2 satisfatório;  
2 < |Z| ≤ 3 questionável;  
|Z| > 3 incorrecto.

## **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

Os métodos utilizados para a determinação das vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e folatos em pescado revelaram ser adequados ao fim em vista, permitindo quantificar o teor das vitaminas B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e folatos em todas as amostras analisadas. Quanto ao teor de vitamina B<sub>1</sub> foram quantificadas mais de 60% das amostras e 92% das amostras apresentaram uma concentração superior ao limite de detecção.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- J.O.R.F. – Journal Officiel de la République Française (1999) anexos I, II e II de 4 de Fevereiro.
- Miller, J.C. and Miller, J.N. (1993) *Statistics for Analytical Chemistry*, Great Britain, Ellis Horwood Limited.
- ISO 5725 (1986) “Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests”.
- ISO 8466-1 (1990) “Water quality – calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance. Part 1: Statistical evaluation of linear calibration function”.
- pr EN 14 131 – “Foodstuffs – Determination of folate by microbiological assay”.
- Guia 13 da Relace (Fevereiro de 2002) – “Validaco de métodos internos de ensaio em análise química”.

## DIVERSIDADE E OCORRÊNCIA NATURAL DE *VIBRIO* SPP. ISOLADO DE ALIMENTOS MARINHOS PORTUGUESES

M. F. Pereira<sup>1</sup>, T. Semedo<sup>2</sup>, R. Tenreiro<sup>2</sup> e F. M. Bernardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIISA/FCT/ Laboratório de Inspeção Sanitária – Faculdade de Medicina Veterinária – Rua Prof. Cid dos Santos, Polo Universitário da Ajuda, 1300-477 Lisboa

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Vegetal e Centro de Genética e Biologia Molecular, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa

---

### INTRODUÇÃO

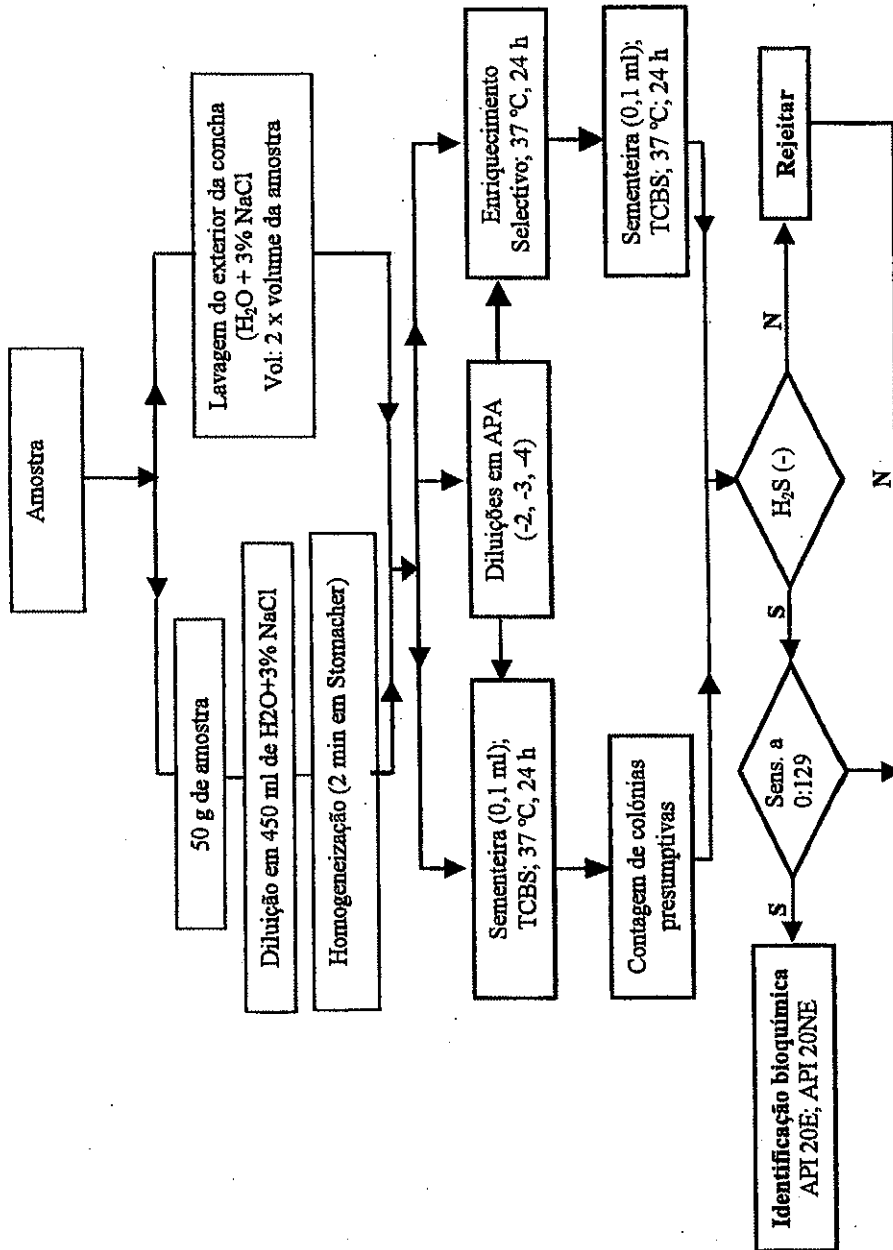
Os alimentos de origem marinha são frequentemente referidos como importantes veículos de doenças provocadas por bactérias indígenas pertencentes à família das *Vibrionaceae*. *Vibrio* não-cólera, Vírus tipo Norwalk e *Vibrio cholerae* são os três principais agentes causadores de doenças transmitidas por este tipo de alimentos (Wittman e Flick, 1995).

*Vibrio* spp. varia sazonalmente (sensibilidade à temperatura) e geograficamente (sensibilidade à salinidade) no ambiente marinho, o que indicia elevados níveis de diversidade. Apesar do consumo de mariscos ter aumentado de forma significativa nos últimos anos em Portugal (4% nos últimos 10 anos), a ocorrência e a diversidade de *Vibrio* spp. são desconhecidas em Portugal.

Objectivos: Estudar a ocorrência e a diversidade de *Vibrio* spp. em 73 amostras de alimentos de origem marinha recolhidas no mercado retalhista durante 18 meses.

### MATERIAL E MÉTODOS

*Isolamento e Identificação de Vibrio spp.*



### “M13 PCR-*fingerprinting*”

As reacções de amplificação ocorreram num volume de 25 µl com 4 U de *Taq* polymerase, 2,5 µl de tampão, 1 µl de amostra de DNA, 1 µl ‘primer’ M13 em 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 400 µM de dNTP.

**PCR** – 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 36 °C durante 2 min e 72 °C durante 1 min, com uma extensão final de 7 min a 72 °C.

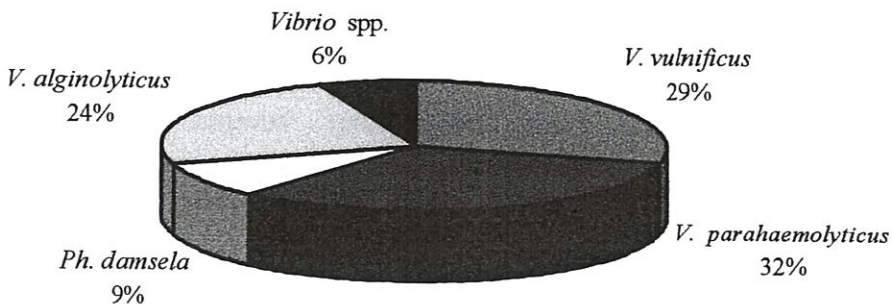
Os produtos de amplificação foram visualizados após electroforese a 90 V durante 3 horas num gel a 1 % de agarose, seguido de coloração com brometo de etídio.

## RESULTADOS

### *Ocorrência Natural de Vibrio spp. em Alimentos Portugueses de Origem Marinha.*

As contagens de *V. parahaemolyticus* em TCBS, variaram entre 10<sup>3</sup> UFC/g (Junho) em *Venerupis (Veneropsis) corrugata* (amêijoa-macha) e 10<sup>6</sup> UFC/g em *V. rhomboides* (Junho) e *Mytilus edulis* (mexilhão) (Agosto). As células viáveis de *V. vulnificus* variaram entre 10<sup>3</sup> UFC/g (Janeiro, Fevereiro, Abril e Novembro) em *Cerastoderma edule* (berbigão) e *Crassostrea angulata* (ostras) até 10<sup>6</sup> UFC/g em *Donax trunculus* (cadelinha) (Agosto).

### Ocorrência de *Vibrio* spp. em alimentos de origem marinha



Para avaliar a diversidade genómica dos isolados de *Vibrio* foram calculados para cada espécie os Índices de Shannon e Simpson. As repetições, para alguns isolados, de “M13 PCR fingerprinting”, levaram a que se assumisse um nível de semelhança máximo de 86 %, sendo assumido como o nível de reprodutibilidade. Como consequência, assumiu-se que os isolados com uma semelhança superior a 86 % representavam a mesma estirpe. O nível de 70% foi escolhido de forma arbitrária para avaliar a diversidade e definir grupos em cada um dos dendrogramas.

| Espécies                    | Nº de isolados | Nº de estirpes R.L. 86% | Nº de grupos L.D.A. 70% | Índice de Diversidade |             |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------|
|                             |                |                         |                         | J (Shannon)           | D (Simpson) |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | 23             | 19                      | 12                      | 1,02                  | 0,94        |
| <i>V. vulnificus</i>        | 27             | 23                      | 14                      | 1,10                  | 0,95        |
| <i>V. parahaemolyticus</i>  | 30             | 19                      | 10                      | 1,11                  | 0,80        |
| <i>Ph. damsela</i>          | 8              | 7                       | 5                       | 0,67                  | 0,90        |
| <i>Vibrio</i> spp.          | 6              | 6                       | 5                       | 0,57                  | 0,72        |

R. L. – Nível de Reprodutibilidade

L. D. A. – Nível de Diversidade

Índice de Simpson (Hunter e Gaston, 1988)

Índice de Shannon (Zar, 1996)

## CONCLUSÕES

Apesar da identificação fenotípica de isolados de *Vibrio* com galerias API 20E e API 20NE ser potenciada com a análise numérica taxonómica, através do uso de dendrogramas e estirpes tipo, os métodos moleculares revelaram-se cruciais para a identificação de alguns isolados.

Uma vez que “M13 PCR fingerprinting” revelou níveis elevados de diversidade intraespecífica, ter-se-á que estudar regiões genómicas mais conservadas (e.x. 16S rDNA e ITS).

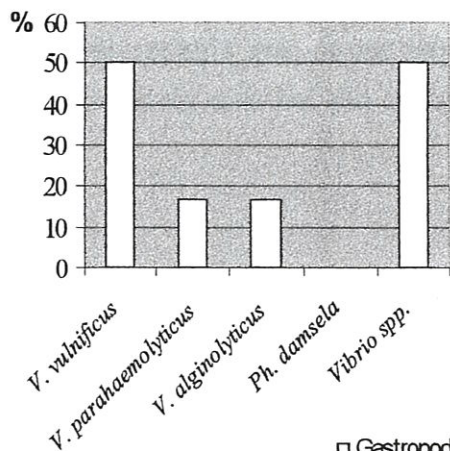
- Foi detectada a ocorrência de várias espécies de *Vibrio* no mesmo tipo de alimento, apesar de *V. parahaemolyticus* só ter sido encontrado em Gastrópodes e Bivalves e o *V. alginolyticus* parecer ausente de Crustáceos
- *V. vulnificus*, para além da sua ocorrência em todas as amostras, foi igualmente detectado durante os meses mais frios do ano (Novembro a Fevereiro).

- Foram encontrados níveis elevados de diversidade intraespecífica, não só dentro do mesmo tipo de animal mas também dentro das próprias espécies, com particular relevância para o *V. vulnificus*. Os níveis de diversidade intraespecífica variaram entre 0,72 e 0,95 (Índice de Simpson) e de 0,57 a 1,11 (Índice de Shannon).
- A plasticidade genómica revelada por estas espécies aponta para a necessidade de estudos posteriores de virulência por forma a avaliar o seu real risco em termos de saúde pública.

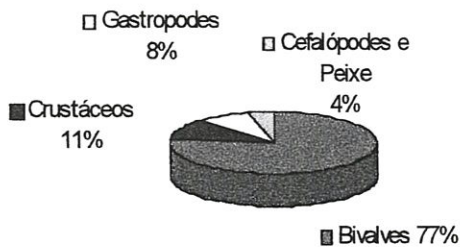
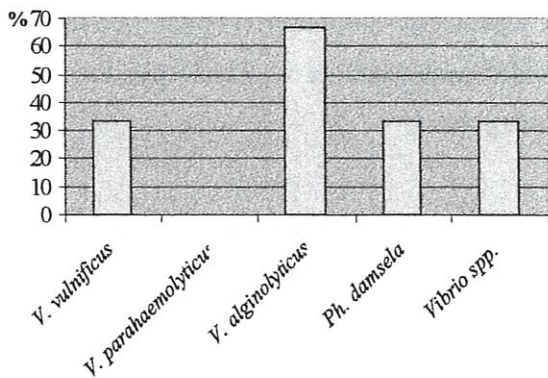
## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Hunter, P.; Gaston, M., 1998. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 26 (11): 2465-2466.
- Wittman, R. J.; Flick G. J., 1995. Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. *Annual Review Public Health*. 16: 123-140.

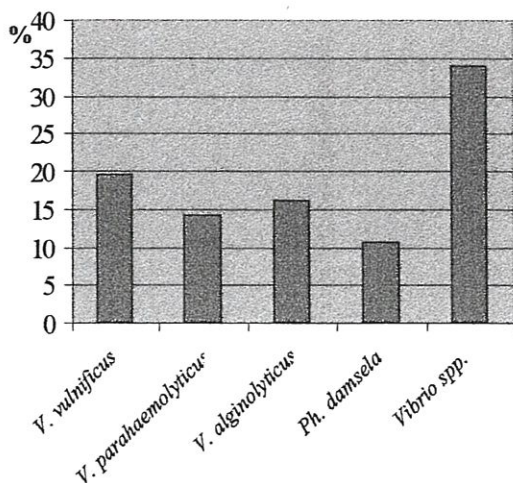
Ocorrência de *Vibrio* spp em Gastropodes



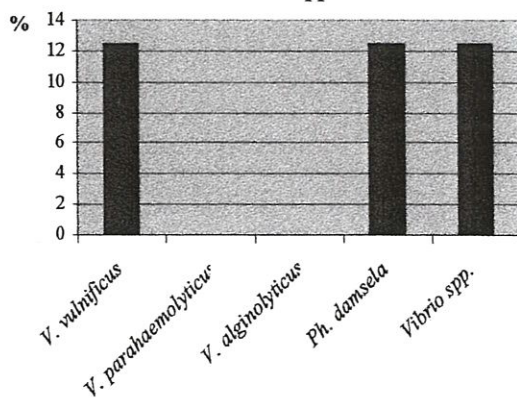
Ocorrência de *Vibrio* spp em Cefalópodes e Peixe



Ocorrência de *Vibrio* spp em Bivalves



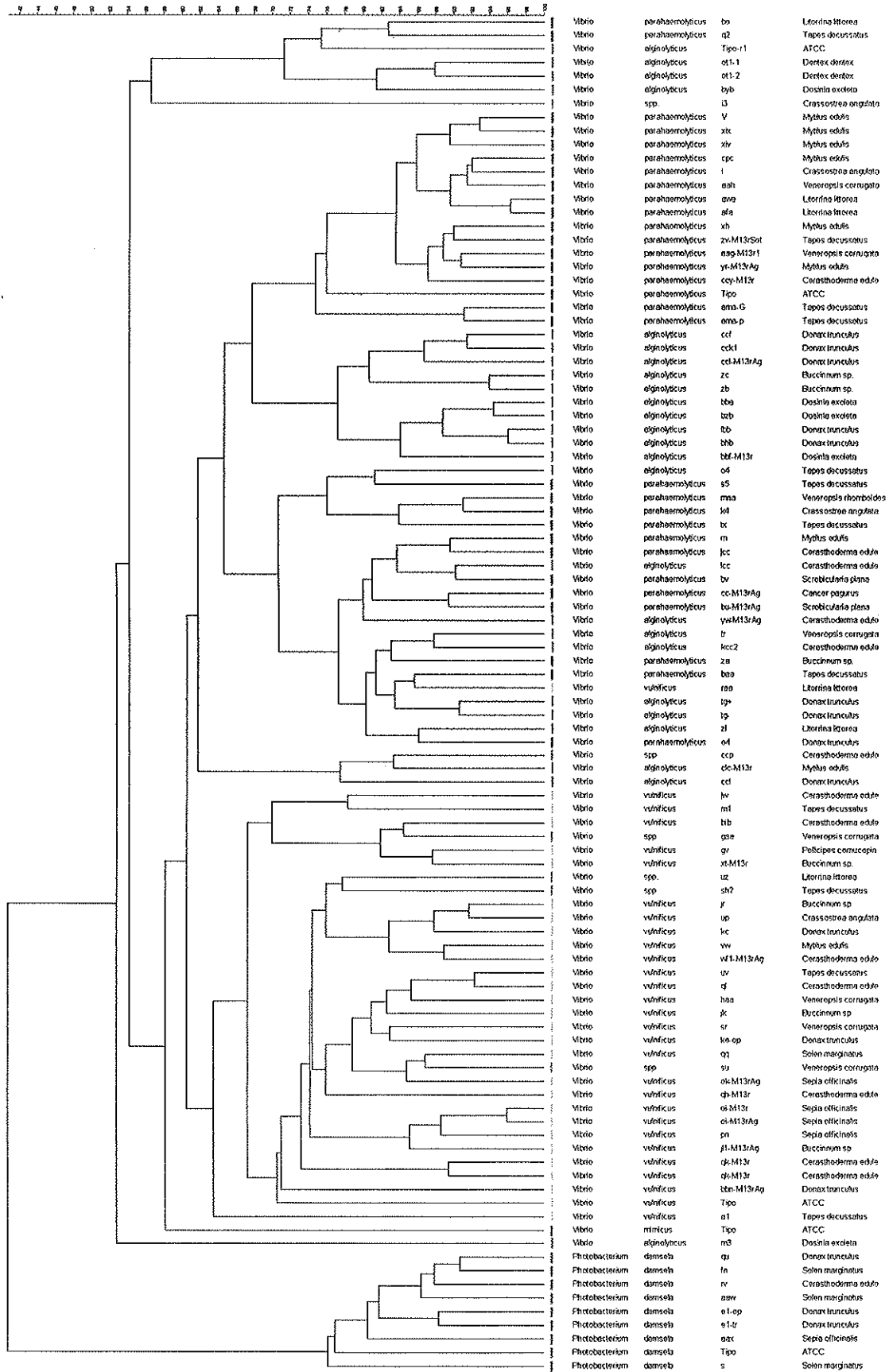
Ocorrência de *Vibrio* spp em Crustáceos



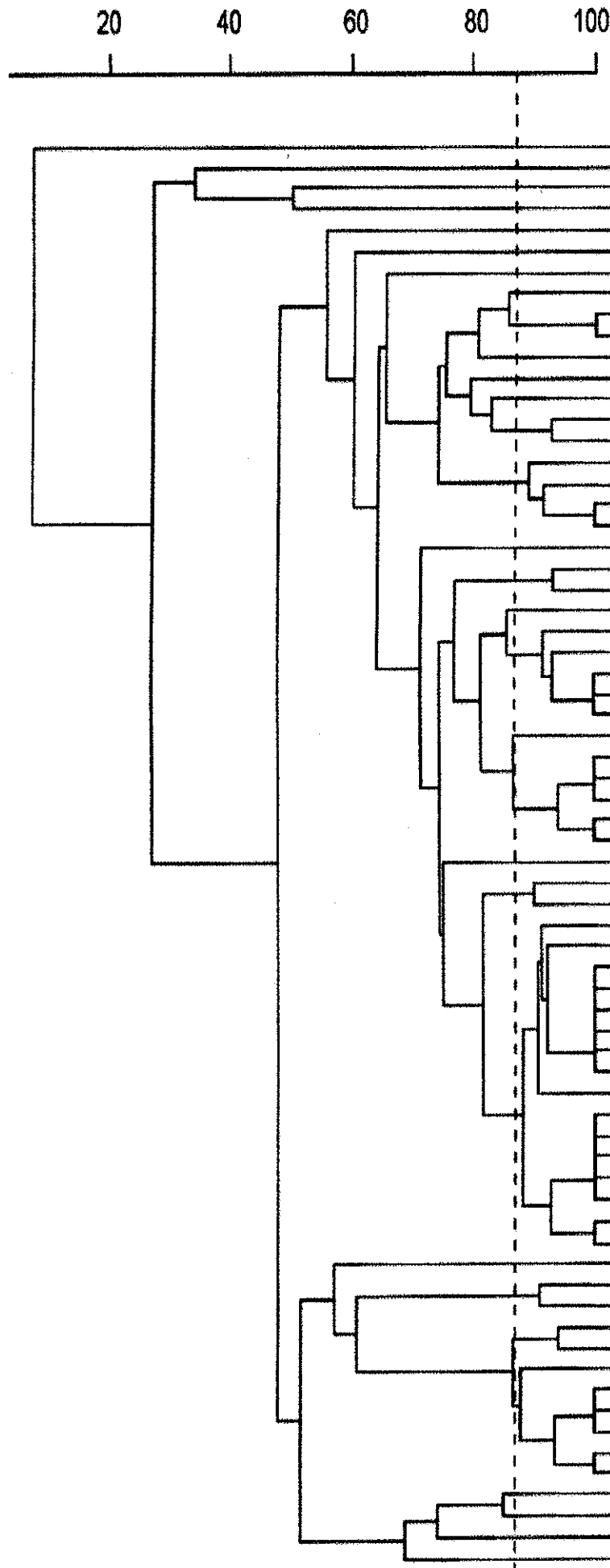


# Dendrograma global: perfis fenotipicos e moleculares

MSI 147216 - M120  
 208 - 2092 - M13



# Semelhança (%)



Identificado em:

Figura 1 – Dendrograma construído com 111 fenótipos Gram-negativos.  
 S – Bacalhau salgado; SD – Bacalhau salgado demolhado; SS – Bacalhau salgado/seco;  
 SSD – Bacalhau salgado/seco demolhado

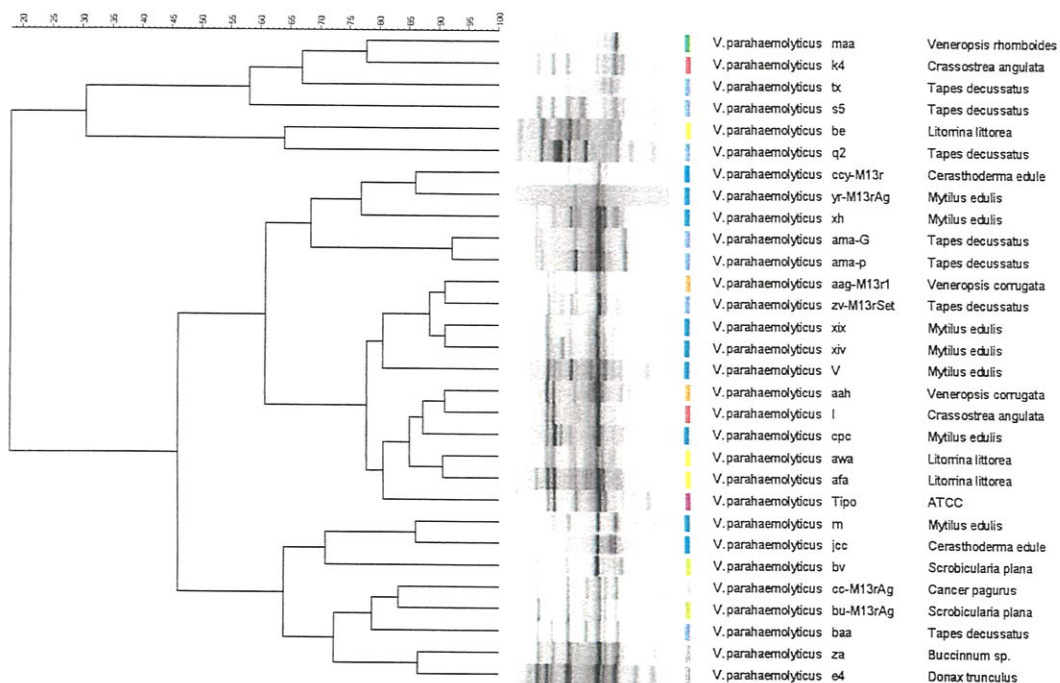
|  |                |
|--|----------------|
| Não identificada                       | SS             |
| <i>Staphylococcus auricularis</i>      | SS             |
| <i>Staphylococcus auricularis</i>      | SS             |
| <i>Staphylococcus auricularis</i>      | SS             |
| <i>Aerococcus viridians</i>            | SS             |
| <i>Staphylococcus capitis</i>          | SS             |
| <i>Staphylococcus cohnii</i>           | SS             |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SS             |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SS, SSD        |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SS             |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SS             |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SS             |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SS             |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SS             |
| <i>Staphylococcus epidermis</i>        | SD, SS         |
| Não identificada                       |                |
| Não identificada                       |                |
| <i>Staphylococcus hominis</i>          | SD             |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          | S, SS          |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          | S, SS          |
| Não identificada                       | SSD            |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          | SS, SSD        |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>     | SSD            |
| <i>Staphylococcus simulans</i>         |                |
| <i>Staphylococcus simulans</i>         |                |
| <i>Staphylococcus simulans</i>         | S, SD          |
| <i>Staphylococcus simulans</i>         |                |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i>    | SSD            |
| <i>Staphylococcus hominis</i>          | S, SS          |
| <i>Staphylococcus hominis</i>          |                |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i>    |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          | S, SD, SS, SSD |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| <i>Staphylococcus warneri</i>          |                |
| Não identificada                       | SSD            |
| <i>Corynebacterium serotus</i>         | S              |
| <i>Corynebacterium serotus</i>         |                |
| Não identificada                       |                |
| <i>Staphylococcus scirrii</i>          | S, SS          |
| <i>Staphylococcus scirrii</i>          |                |
| <i>Staphylococcus scirrii</i>          |                |
| <i>Staphylococcus scirrii</i>          | S, SS          |
| <i>Staphylococcus scirrii</i>          |                |
| Não identificada                       |                |
| Não identificada                       |                |
| <i>Enterococcus hirae</i> (Grupo D)    | S              |
| <i>Enterococcus hirae</i> (Grupo D)    | S              |
| <i>Aerococcus viridians</i>            | S              |
| <i>Streptococcus equinus</i> (Grupo D) | S              |



## Diversidade Genómica ao Nível Intraespecífico

Phylogenetic reconstruction (Opt1: 100%) (0.01%-100.01%)  
M13

M13





## IDENTIFICAÇÃO DE VÁRIAS ESPÉCIES DE PEIXE, UTILIZANDO A TÉCNICA DE RFLP

L. Gomes<sup>1</sup>, R. Quinta<sup>1</sup>, C. Rosa<sup>1</sup>, A.T. Santos<sup>1</sup>, G.L. Hold<sup>2</sup>, S.E. Pryde<sup>2</sup>, H. Rehbein<sup>3</sup>, J. Quinteiro<sup>4</sup>, M. Rey-Mendez<sup>4</sup>, C.G. Sotelo<sup>5</sup>, R.I. Pérez-Martin<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Lisboa, Portugal; <sup>2</sup>Rowett Research Institute, Aberdeen, Scotland, U.K.; <sup>3</sup>Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Biochemie und Technologie, Hamburg, Germany; <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Spain; <sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Vigo, Spain.

---

### INTRODUÇÃO

A importância de identificar e distinguir espécies de pescado utilizadas nas indústrias transformadoras tem vindo a aumentar consideravelmente, com o objectivo de evitar fraudes e defender o interesse do consumidor. O desenvolvimento de técnicas de DNA, como a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), permitiu já a identificação de produtos da pesca processados industrialmente, mas apenas de um grupo particular de peixes, como algumas espécies de tunídeos e salmonídeos.

Com o intuito de se aplicar esta técnica na distinção de um maior número de espécies de peixe, realizou-se este trabalho, desenvolvido no âmbito do projecto CT97-3061 ("Identification of species in processed seafood products using DNA-based diagnostic techniques"), onde foi efectuado um ensaio em colaboração com os vários parceiros do projecto, no qual se utilizou a técnica de RFLP.

Para cada uma das espécies utilizadas foi amplificado, com um "primer" universal, um fragmento de DNA de aproximadamente 464 pb, do gene do citocromo *b* e, posteriormente, tratado com enzimas de restrição, das quais se destaca, nesta apresentação, o resultado da *Hinf*I.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Extracção do DNA:** O DNA foi extraído segundo o método CTAB de Rogers e Bendich, descrito em Hold *et al.* (2001).

**Amplificação do PCR:** Foram utilizados os “primers”, descritos por Burgener, L14735 5’ - AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A - 3’ e H15149ad 5’ - GCI CCT CAR AAT GAY ATT TGT CCT CA - 3’, que amplificam um fragmento de ~ 464 pb do gene mitocondrial do citocromo *b*.

**Preparação das reacções de PCR:** 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP (Bioline), 1,25 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Bioline), 25 pM de cada “primer” e 50 -100 ng de DNA, num volume final de reacção de 50 µL.

### Condições de PCR:

1º Ciclo: 3 min a 96 °C.

2º Ciclo (40 vezes): 30 s a 96 °C, 60 s a 63 °C, 60 s a 72 °C.

Ciclo final de extensão: 3 min a 72 °C.

**Reacções de RFLP:** 10 µL de cada produto de PCR foram digeridos, durante a noite a 37 °C, com 10 unidades da enzima de restrição *HinfI*, num volume final de reacção de 25 µL, de acordo com as indicações do fornecedor. A enzima foi inactivada a 65 °C durante 10 minutos.

Os fragmentos obtidos foram aplicados num gel de poliacrilamida “Cleangel 48S” (Pharmacia Biotech) e após a electroforese, revelados com nitrato de prata “Pharmacia Plus One Silver DNA staining kit”.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho, confirmam a facilidade e fiabilidade deste método, que poderá ser aplicado e optimizado noutras espécies.

Os perfis obtidos com a enzima de restrição *HinfI*, permitiram distinguir 36 espécies de peixe diferentes.

É ainda de salientar que as mesmas espécies tratadas com outras enzimas de restrição (*AciI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HincII*, *MspI*, *NlaIII*) mantiveram a mesma diferenciação.

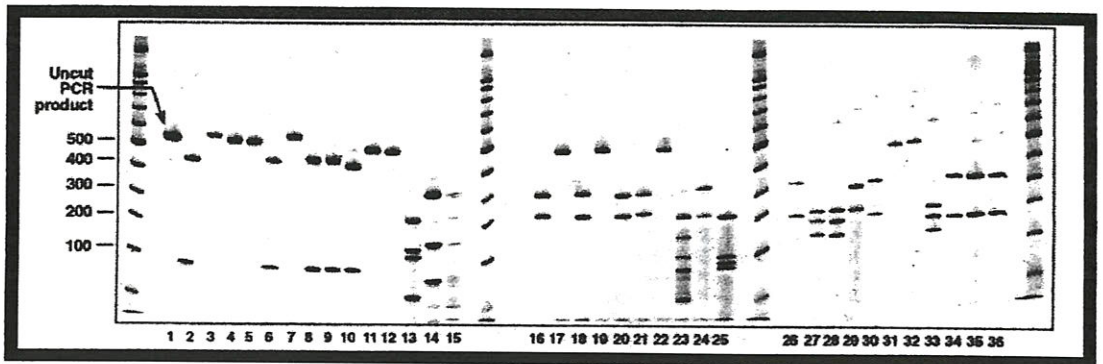


Figura 1 - Perfis de RFLP (1-36) obtidos para as 36 espécies de peixe, digeridas com a enzima de restrição *HinfI*.

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1 - <i>Merluccius merluccius</i>   | 19 - <i>Oncorhynchus gorbuscha</i>     |
| 2 - <i>Merluccius hubbsi</i>       | 20 - <i>Oncorhynchus nerka</i>         |
| 3 - <i>Merluccius polli</i>        | 21 - <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>   |
| 4 - <i>Merluccius senegalensis</i> | 22 - <i>Oncorhynchus mykiss</i>        |
| 5 - <i>Merluccius gayi</i>         | 23 - <i>Salvelinus alpinus</i>         |
| 6 - <i>Merluccius australis</i>    | 24 - <i>Salvelinus fontinalis</i>      |
| 7 - <i>Merluccius bilinearis</i>   | 25 - <i>Salmo trutta</i>               |
| 8 - <i>Merluccius albidus</i>      | 26 - <i>Solea solea</i>                |
| 9 - <i>Merluccius productus</i>    | 27 - <i>Glyptocephalus cynoglossus</i> |
| 10 - <i>Anguilla rostrata</i>      | 28 - <i>Pleuronectes platessa</i>      |
| 11 - <i>Anguilla australis</i>     | 29 - <i>Scophthalmus maximus</i>       |
| 12 - <i>Anguilla anguilla</i>      | 30 - <i>Lepidorhombus boscii</i>       |
| 13 - <i>Sardina pilchardus</i>     | 31 - <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> |
| 14 - <i>Sardinella aurita</i>      | 32 - <i>Scophthalmus rhombus</i>       |
| 15 - <i>Sardinops sagax</i>        | 33 - <i>Platichthys flesus</i>         |
| 16 - <i>Salmo salar</i>            | 34 - <i>Hippoglossoides elassodon</i>  |
| 17 - <i>Oncorhynchus keta</i>      | 35 - <i>Limanda ferruginea</i>         |
| 18 - <i>Oncorhynchus kisutch</i>   | 36 - <i>Limanda limanda</i>            |

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hold, G. L.; Russell, V. L.; Pryde, S. E.; Rehbein, H.; Quintero J.; Vidal, R.; Rey-Mendez, M.; Sotelo, C. G.; Pérez-Martin, R. I.; Santos, A. T.; Rosa, C., 2001. Development of a DNA-Based Method Aimed at Identifying the Fish Species Present in Food Products. *J. Agric. Food Chem.*, 49(3): 1175-1179.



## CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE ESPÉCIES DE AQUICULTURA

Lourenço, H. M.; Bandarra, N. M.; Delgado, N.; Martins, M. F.; Nunes, M. L.

IPIMAR – Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

Av. Brasília 1449-006 Lisboa

---

### INTRODUÇÃO

Actualmente o pescado é considerado um produto alimentar indispensável numa dieta equilibrada e as espécies de aquicultura podem contribuir para aumentar a disponibilidade destes produtos no mercado nacional. Assim, reveste-se de grande interesse caracterizar estas espécies de aquicultura no sentido de promover o seu consumo. Com o presente trabalho pretende-se contribuir para a caracterização nutricional de algumas espécies produzidas em explorações aquícolas portuguesas, designadamente a truta (*Oncorhynchus mykiss*), a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*), apresentando-se os resultados das determinações de macronutrientes, perfil de ácidos gordos e de aminoácidos totais.

### MATERIAL E MÉTODOS

As amostras analisadas eram constituídas pela parte edível de 5 peixes, excepto quando cada exemplar excedia 0,5 kg, situação em que eram apenas constituídas por dois indivíduos. A composição química aproximada – humidade, proteína, gordura, cinza – foi determinada segundo normas portuguesas (1, 2, 3) e técnicas descritas no AOAC (4), o valor energético calculou-se segundo a FAO (5). O perfil de ácidos gordos foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Bandarra *et al.* (6) e a sua conversão em g/100g de parte edível segundo Weihrauch *et al.* (7). Na análise dos aminoácidos totais seguiu-se a metodologia descrita no AOAC (4).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a composição química média (Fig. 1) são idênticos aos das espécies marinhas, revelando um elevado teor proteico. No que se refere ao teor lipídico, este é variável, tendo-se obtido valores entre 2 e 6%, no caso da truta, e de 5-12% na dourada e robalo. Na tabela 1 pode observar-se os teores de ácidos gordos das três espécies. Verifica-se que as amostras apresentam um perfil em que se destacam os níveis elevados de monoinsaturados e polinsaturados em especial o 18:1 $\omega$ 9 (ác. oleico) e os ácidos 20:5 $\omega$ 3 (EPA) e o 22:6 $\omega$ 3 (DHA) o que é vantajoso tanto em termos nutricionais como para a saúde em geral. Na figura 2 apresenta-se o perfil dos aminoácidos destas espécies, observando-se uma distribuição semelhante entre elas, sendo o ácido glutâmico (GLU), aspártico (ASP), lisina (LYS), leucina (LEU), arginina (ARG), alanina (ALA) e valina (VAL) os mais abundantes. Relativamente à composição em aminoácidos essenciais, a sua presença está numa proporção equilibrada, do ponto de vista da nutrição humana (8). Verifica-se ainda que são espécies ricas em LYS, aminoácido indispensável ao organismo, sobretudo durante a fase de crescimento (9).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) IPQ, 1991. NP-2282, Determinação do teor de humidade. Processo de referência. Lisboa, 4p.
- (2) IPQ, 1992. NP-1972, Determinação do teor de matéria gorda livre. Lisboa, 4p.
- (3) IPQ, 1988. NP-2032, Determinação do teor de cinza. Lisboa, 4p.
- (4) AOAC, 1996. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>th</sup>. (Eds) Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC.
- (5) FAO, 1989. Yield and nutrition value of the commercially more important fish species. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 309, Rome, 187p.
- (6) Bandarra, N. M.; Barata, J. D.; Batista, I.; Nunes, M. L.; Bruges, M.; Dickson, J.; Empis, J. M. A., 1997. Influence of sardine oil supplements on fatty acid profile and cholesterol levels in the rat. *In: J.B. LUTEN, T. BØRRESEN AND J.*

OEHLENSCHLÄGER (Eds.) Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp 609-619.

- 7) Weihrauch, J. L.; Posati, L. P.; Anderson, B. A.; Exler, J., 1977. Lipid conversion factors for calculating fatty acid contents of foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54(1): 36-40.
- 8) FAO, 1970. Amino acid content of foods and biological data proteins. *FAO Nutritional Studies* (24), FAO, Rome, Italy, 283 p.
- 9) Ferreira, F. A., 1983. *Nutrição Humana*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp 104-157.

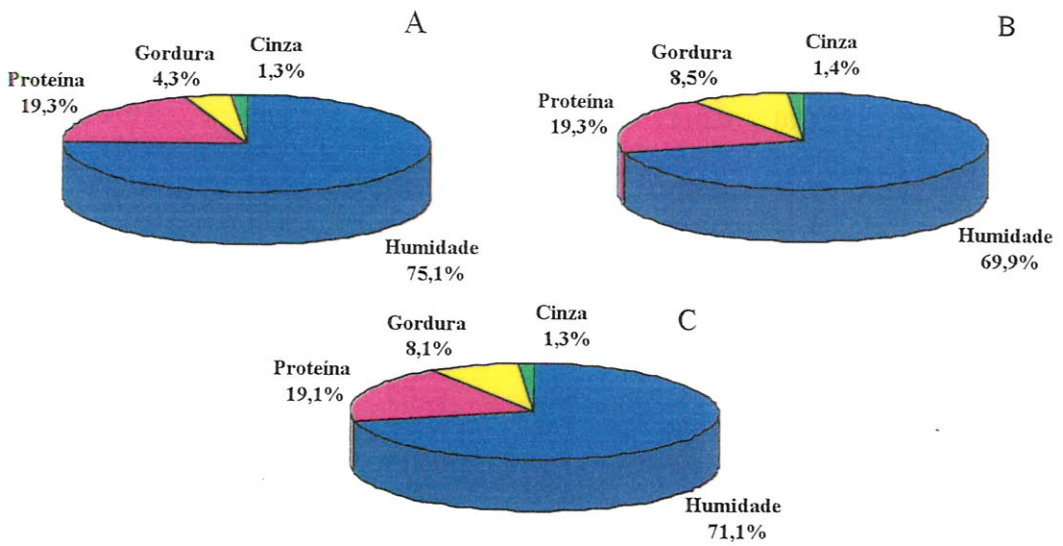


Figura 1 – Composição química média de: A - truta (N=23); B - dourada (N=23); C robalo (N=10).

Tabela 1 - Ácidos gordos na parte edível de truta, dourada e robalo.

| Ac. Gordos                     | TRUTA     |         | DOURADA   |         | ROBALO    |         |
|--------------------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
|                                | Média (%) | g /100g | Média (%) | g /100g | Média (%) | g /100g |
| 14:0                           | 2,76      | 0,025   | 4,32      | 0,299   | 3,89      | 0,201   |
| 15:0                           | 0,38      | 0,004   | 0,45      | 0,031   | 0,42      | 0,021   |
| 16:0                           | 16,27     | 0,150   | 15,55     | 1,077   | 15,15     | 0,783   |
| 16:1 $\omega$ 9                | 0,05      | <0,001  | 0,13      | 0,009   | 0,25      | 0,013   |
| 16:1 $\omega$ 7                | 4,77      | 0,044   | 6,94      | 0,481   | 5,61      | 0,290   |
| 16:1 $\omega$ 5                | 0,15      | 0,001   | -         | -       | -         | -       |
| 17:0                           | 0,17      | 0,001   | 0,78      | 0,054   | 0,59      | 0,030   |
| 18:0                           | 4,63      | 0,043   | 3,28      | 0,227   | 2,63      | 0,136   |
| 18:1( $\omega$ 9+ $\omega$ 7)  | 20,58     | 0,190   | 21,11     | 1,462   | 21,66     | 1,120   |
| 18:2 $\omega$ 6                | 9,87      | 0,091   | 6,88      | 0,477   | 5,84      | 0,302   |
| 18:3 $\omega$ 6                | 0,09      | 0,001   | 0,13      | 0,009   | 0,16      | 0,008   |
| 18:3 $\omega$ 3                | 1,20      | 0,011   | 1,37      | 0,095   | 1,43      | 0,074   |
| 18:4 $\omega$ 3                | 0,89      | 0,008   | 1,42      | 0,098   | 1,44      | 0,074   |
| 20:1                           | 2,98      | 0,028   | 4,19      | 0,290   | 6,80      | 0,352   |
| 20:4 $\omega$ 6                | 1,02      | 0,009   | 0,75      | 0,052   | 0,71      | 0,037   |
| 20:3 $\omega$ 3                | 0,16      | 0,001   | 0,14      | 0,010   | 0,14      | 0,007   |
| 20:4 $\omega$ 3                | 0,84      | 0,008   | 0,81      | 0,056   | 0,26      | 0,013   |
| 20:5 $\omega$ 3                | 4,57      | 0,042   | 5,67      | 0,393   | 5,61      | 0,290   |
| 22:1( $\omega$ 11+ $\omega$ 9) | 1,89      | 0,017   | 4,02      | 0,278   | 5,59      | 0,289   |
| 22:4 $\omega$ 6                | 0,22      | 0,002   | 0,32      | 0,022   | 0,29      | 0,015   |
| 22:5 $\omega$ 3                | 1,63      | 0,015   | 2,34      | 0,162   | 1,09      | 0,056   |
| 22:6 $\omega$ 3                | 18,04     | 0,167   | 11,77     | 0,815   | 12,81     | 0,663   |
| 24:1 $\omega$ 9                | 0,16      | 0,001   | 0,14      | 0,009   | 0,11      | 0,005   |
| Total:                         |           |         |           |         |           |         |
| Saturados                      | 24,19     | 0,222   | 24,49     | 1,697   | 22,86     | 1,182   |
| Monoinsaturados                | 30,58     | 0,282   | 36,45     | 2,525   | 40,26     | 2,083   |
| Polinsaturados                 | 38,50     | 0,356   | 31,52     | 2,183   | 29,76     | 1,539   |
| N Ident                        | 6,73      | 0,062   | 7,54      | 0,522   | 7,12      | 0,368   |
| $\omega$ 3                     | 27,31     | 0,252   | 23,51     | 1,629   | 22,78     | 1,178   |
| $\omega$ 6                     | 10,88     | 0,100   | 7,63      | 0,529   | 6,55      | 0,339   |
| $\omega$ 3/ $\omega$ 6         | 2,51      | -       | 3,08      | -       | 3,48      | -       |

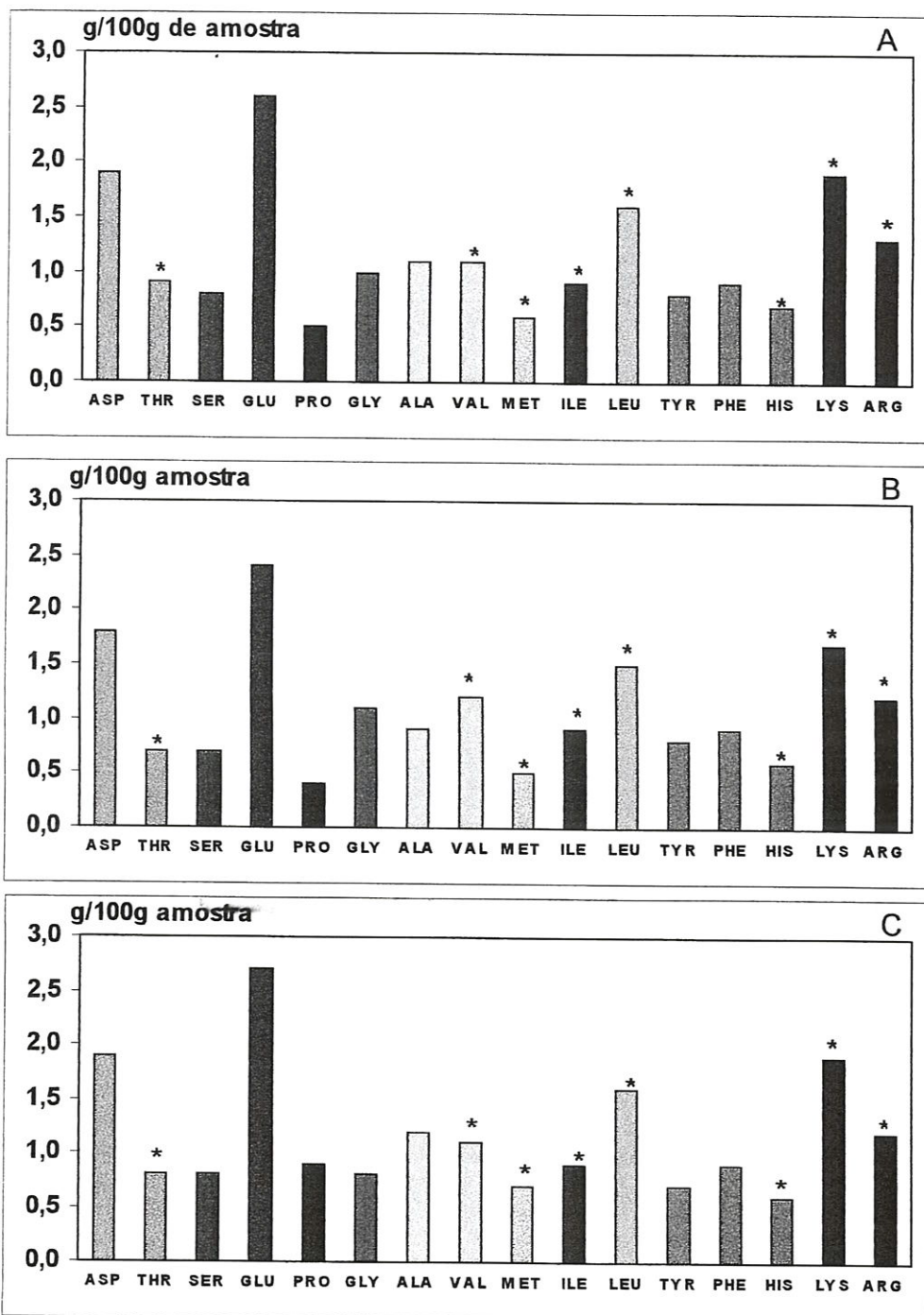


Figura 2 – Perfis de aminoácidos de: A - truta (N=2); B - dourada (N=2); C - robalo (N=2); \*Aminoácidos essenciais.



## NÍVEIS DE MERCÚRIO TOTAL EM ESPÉCIES DE AQUICULTURA

Lourenço, H. M.\*; Martins, M. F.\*; Lino, A. R.\*\*; Nunes, M. L.\*

\*IPIMAR – Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

Av. Brasília 1449-006 Lisboa

\*\* FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

---

### INTRODUÇÃO

O mercúrio é um metal pesado que, mesmo em quantidades muito pequenas, pode apresentar efeitos tóxicos. Tal facto foi constatado após os incidentes em Minamata e Niigata, no Japão, nos anos 50 e 60 do século XX (1,2). Desde então, os níveis de mercúrio no meio aquático têm sido monitorizados, tendo-se estabelecido limites de concentração para vários produtos da pesca (3,4).

No meio aquático, a acumulação deste metal ao longo da cadeia alimentar, leva a que os produtos da pesca e aquicultura possam apresentar teores de mercúrio mais elevados do que outros alimentos. Contudo, é difícil prever o teor deste contaminante no pescado pois depende da espécie, da idade e tamanho e ainda das condições ambientais (5,6). Assim, o objectivo deste trabalho foi quantificar o teor de mercúrio total nas espécies de aquicultura mais importantes em Portugal - truta, dourada e robalo.

### MATERIAL E MÉTODOS

As três espécies em estudo foram provenientes de aquiculturas portuguesas. A maior parte das amostras era constituída por cinco peixes, excepto no caso de exemplares que excediam 0,5 kg, em que as amostras eram constituídas apenas por dois indivíduos. A idade de cada indivíduo foi indicada pela unidade de produção. O mercúrio total foi determinado no músculo e no fígado por absorção atómica em fase de vapor frio (CV-AAS) (7).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de mercúrio no músculo das três espécies estudadas estiveram compreendidos entre 0,01 e 0,20 mg/kg (Tabela 1). No que se refere às amostras de fígado, a truta apresentou os valores mais elevados, mas todos os resultados se situaram abaixo do limite proposto pela UE (0,5 mg/kg, peso húmido) (Tabela 1). Estes valores estão de acordo com resultados obtidos por outros autores (8,9).

Tabela 1 – Níveis de mercúrio total nas amostras de truta, dourada e robalo.

| Espécies estudadas | Músculo (mg/kg)<br>Média (min. – máx.) | Fígado (mg/kg)<br>Média (min. – máx.) |
|--------------------|--|---------------------------------------|
| Truta (N = 40)     | 0,07 (0,01-0,18)                       | 0,10 (0,01-0,29)                      |
| Dourada (N = 24)   | 0,07 (0,01-0,13)                       | 0,03 (0,01-0,10)                      |
| Robalo (N = 20)    | 0,09 (0,02-0,20)                       | 0,04 (0,01-0,11)                      |

Nas figuras 1, 2 e 3 apresenta-se a distribuição deste contaminante, por classe de comprimento e de idade, nas três espécies. De um modo geral, a truta apresentava no fígado teores mais elevados do que no músculo, enquanto que na dourada e no robalo os resultados sugerem uma situação inversa. Os resultados obtidos não permitem também estabelecer, em nenhuma das espécies, uma relação entre os teores de mercúrio e a idade ou o comprimento dos exemplares analisados.

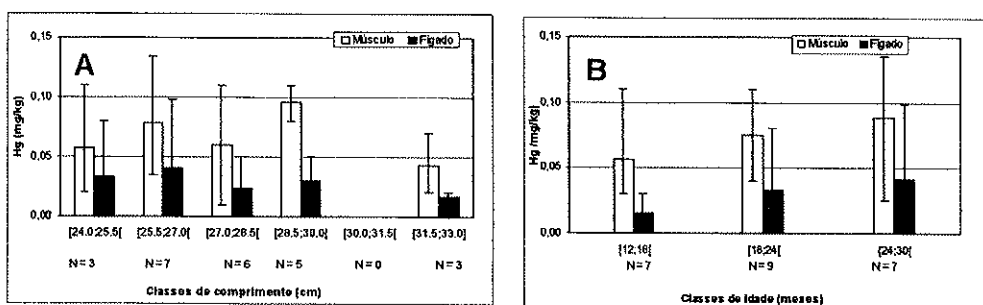


Figura 2 – Níveis de mercúrio total (mg/kg, peso húmido) em dourada *versus* classes de comprimento (cm) (A) e de idade (meses) (B).

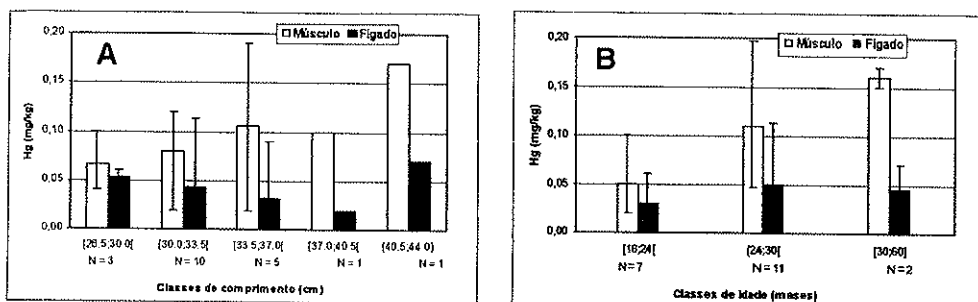


Figura 3 - Níveis de mercúrio total (mg/kg, peso húmido) em robalo *versus* classes de comprimento (cm) (A) e de idade (meses) (B).

## CONCLUSÕES

- Os níveis de mercúrio no músculo e fígado de truta, dourada e robalo foram sempre inferiores ao limite proposto pela UE (0,5 mg/kg, peso húmido).
- Não foi possível estabelecer relações entre o teor de mercúrio e a idade ou o comprimento das três espécies estudadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS

- (1) Takizawa, Y., 1979. Epidemiology of mercury poisoning. In: J. O. NRIAGU (Ed) The biogeochemistry of mercury in the environment. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp. 325-570.
- (2) Andersen, J. L.; Depledge, M. H., 1997. A survey of total mercury and methylmercury in edible fish and invertebrates from azorean waters. *Marine Environmental Research*, 44(3):331-350.
- (3) EU, 2001. Regulation (EC) N.º 466/2001. *JO L 77*, 16.03.2001,13p.
- (4) FDA, 1994. Mercury in fish: Cause or concern? *U. S. FDA*, Washington, DC., 4p.
- (5) De Sousa, J. V. B.; López Goyanes, A., 1992. Contenido de mercurio en productos de la pesca por espectrometria de absorción atómica en vapor frío. *Anales de Bromatologia*, XLIV(1):45-57.
- (6) Aduna de Paz, L.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Lagarda, M. J., 1997. Determination of mercury in dry-fish samples by microwave digestion and flow

injection analysis system cold vapor atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 58(1-2):169-172.

- (7) IPQ, 1988. Determinação do teor de mercúrio. Método espectrofotométrico de absorção atômica sem chama. *NP-2928*, 5p.
- (8) Ohlin, B., 1993. Mercury in fish on general sale. *Var-Foeda*, 45(8/9):390-397.
- (9) Neumann, C. M.; Kauffman, K. W.; Gilroy, D. J., 1997. Methylmercury in fish from Owyhee Reservoir in southeast Oregon: scientific uncertainty and fish advisories. *Science of the Total Environment*, 204(3):205-214.

## PREPARAÇÃO DE CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS POR VIA ENZIMÁTICA

Cardoso, C.; Batista, I.; Bandarra, N. M.; Nunes, M. L.

Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca.  
IPIMAR. Av. Brasília 1449-006 Lisboa – Portugal; Tel: 21 3027000; Fax: 21 3015948

---

### RESUMO

A preparação de concentrados de ácidos gordos polinsaturados por acção enzimática, usando uma lipase da *Pseudomonas cepacia* PS foi efectuada seguindo diferentes vias reaccionais: hidrólise, etanolise e glicerólise. O estudo comparativo das três abordagens permitiu obter produtos finais com diferentes perfis de ácidos gordos e avaliar as vantagens e inconvenientes da via enzimática bem como a selectividade da lipase usada. Na hidrólise atingiu-se 53,41 % de polinsaturados enquanto que na etanolise a percentagem atingida foi ligeiramente superior (55,66 %). É ainda de referir que nestes dois processos, a fracção enriquecida em ácidos gordos polinsaturados é constituída por mono, di e triacilgliceróis o que pode apresentar algumas limitações na sua utilização como suplemento alimentar. Na glicerólise obteve-se 63,88 % de polinsaturados na fracção dos triacilgliceróis, mas é de salientar que o óleo de partida era um concentrado de ésteres metílicos de ácidos gordos polinsaturados, obtido do óleo inicial por complexação com ureia o qual pode apresentar alguns inconvenientes (aumento do nível de contaminantes e de colesterol presentes no óleo inicial). Os resultados obtidos por estas três vias evidenciaram ainda a selectividade da lipase usada para catalisar as reacções envolvendo, preferencialmente, os ácidos gordos saturados e monoinsaturados.

## INTRODUÇÃO

A preparação de concentrados de ácidos gordos polinsaturados pode ser realizada por via química ou enzimática. As duas alternativas possuem vantagens e inconvenientes, existindo, no entanto, variantes possíveis no âmbito de cada alternativa que permitem superar alguns dos inconvenientes e aproveitar os aspectos positivos (Shahidi e Wanasundara, 1998). A via química consiste na exclusão dos ácidos gordos polinsaturados da complexação com a ureia, permitindo produzir concentrados muito ricos em polinsaturados (Haagsma *et al.*, 1982). Contudo, eventuais contaminantes e o colesterol presentes no óleo inicial não são complexados pela ureia, mantendo-se na fracção de ácidos gordos polinsaturados (Breivik e Haraldsson, 1999). Além disso, o solvente da ureia geralmente empregue - o etanol - reage com a ureia, formando-se carbamato de etilo, uma substância carcinogénica (Canas e Yurawecz, 1999). Assim, a via enzimática constitui um processo sem concentração de substâncias perigosas, em virtude da especificidade da lipase, que actua apenas sobre os lípidos esterificados, deixando os demais componentes intactos. A selectividade da enzima, em função do grau de insaturação, garante ainda a concentração dos polinsaturados, seja na parcela que não reage no caso da lipase favorecer a reacção de saturados e monoinsaturados, seja nos produtos da reacção no caso contrário (Breivik e Haraldsson, 1999). Porém, o nível de concentração de polinsaturados alcançado é modesto (teores pouco acima de 50%) quando comparado com os resultados obtidos por via química. Adicionalmente, a acção enzimática conduz a misturas lipídicas (mono, di e triacilgliceróis, ácidos gordos livres e, na etanólise, ésteres etílicos) que levantam problemas de separação e uma implementação industrial com novos problemas tecnológicos. Por estas razões, é de grande importância o aprofundamento do conhecimento da acção enzimática, de modo a conseguir-se tirar o maior partido das capacidades de cada enzima.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Nos vários ensaios realizados, utilizou-se o óleo de salmão "Natürlich" da firma Henry Lamotte como óleo de partida. Nos ensaios com enzimas, fez-se uso da lipase PS da Amano Pharmaceutical Co., Ltd. e nos ensaios com enzima imobilizada

empregou-se, como suporte, a resina Amberlite XAD-7™ da Fluka. A preparação das misturas reaccionais para a hidrólise, etanólise e glicerólise, bem como a imobilização enzimática foram realizadas de acordo com os protocolos experimentais apresentados por Breivik e Haraldsson (1999). A evolução da hidrólise foi monitorizada através dos índices de acidez e de saponificação, determinados segundo as Normas Portuguesas NP 903 (1987) e NP 940 (1985), respectivamente. A evolução das reacções de etanólise e glicerólise foi seguida recorrendo à cromatografia em camada fina. Os reagentes químicos aplicados nos vários métodos eram de grau analítico.

Tabela 1 – Condições reaccionais dos vários ensaios enzimáticos realizados.

| Tipo de reacção | Estado da enzima                 | Composição da mistura inicial  | Temperatura (°C) | Tempo(h) |
|-----------------|----------------------------------|--|------------------|----------|
| Hidrólise       | Livre                            | 12 g de óleo +18 ml de tampão fosfato  | 35               | 72       |
| Etanólise       | Imobilizada* em Amberlite XAD-7™ | 5 g de Óleo + 0,8 g de etanol  | 20               | 26       |
| Glicerólise     | Livre                            | 2 g de conc. de ést. met. de ác. gordos $\omega 3^{\dagger}$ + 1 g de glicerol + 2 ml de isooctano | 40 <sup>†</sup>  | 48       |

\* Na etanólise escolheu-se um ensaio com a enzima imobilizada pelo facto de apresentar melhores resultados.

† Obtido por complexação com ureia, <sup>†</sup> pressão reduzida (200 mbar).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Hidrólise*

Registou-se um enriquecimento em ácidos gordos polinsaturados na fracção não hidrolisada (Fig. 1), atingindo-se 53,41 % a partir de um teor no óleo inicial de 42,84 %. Este facto mostra que a selectividade enzimática incide, preferencialmente, sobre os ácidos gordos saturados e monoinsaturados, o que leva à concentração dos polinsaturados na fracção de óleo que não foi hidrolisada. Contudo, a concentração dos ácidos polinsaturados  $\omega 3$  não foi tão acentuada como a dos  $\omega 6$ , visto que a razão  $\omega 3/\omega 6$  diminuiu de 7,72 no óleo de partida para 4,54 no concentrado obtido após hidrólise. A enzima foi particularmente activa na hidrólise, remanescendo 43,6 % de fracção não hidrolisada no final da reacção.

### *Etanólise*

A concentração de ácidos gordos polinsaturados na fracção não transesterificada atingiu 55,66 % (Fig. 2), sendo o seu valor no óleo inicial 42,84 %. Na etanólise, a

lipase apresentou, em relação aos ácidos polinsaturados  $\omega$ 3, uma maior selectividade do que na hidrólise. Assim, a razão  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 aumentou relativamente ao valor do óleo inicial (7,72), alcançando o nível de 13,81 enquanto que na hidrólise se registou uma diminuição da razão. Por outro lado, a fracção dos acilgliceróis, mais rica em polinsaturados, representa 27,5 %, um resultado inferior ao atingido no concentrado obtido na hidrólise.

#### *Glicerólise*

A glicerólise permitiu produzir triacilgliceróis ricos em polinsaturados (63,88 %), o que é vantajoso, pois os triacilgliceróis são melhor absorvidos pelo aparelho digestivo. Este facto compensa a redução relativamente ao teor de polinsaturados do óleo usado como substrato da enzima (88,57 %). Esta redução pode ser atribuída à maior propensão da lipase para catalisar, preferencialmente, a esterificação dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados. Do mesmo modo, registou-se uma diminuição da razão  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 de 25,55 para 12,12 nos triacilgliceróis, que pode ser devida a uma catálise preferencial dos ácidos  $\omega$ 6. Adicionalmente, o nível de EPA no produto da reacção enzimática foi semelhante ao de DHA (Fig. 3), ao passo que no substrato o teor em EPA excedeu claramente o teor em DHA (Fig. 4). Este facto indica que a lipase usada incorpora mais facilmente o DHA do que o EPA, o que constitui uma excepção na tendência da enzima para ser menos activa quando aumenta o grau de insaturação dos ácidos gordos. Finalmente, a percentagem de triacilgliceróis obtida (25,4 %) é positiva, indicando a viabilidade da obtenção de triacilgliceróis por acção enzimática, um processo com condições menos drásticas do que a glicerólise química (Noureddini e Harmeier, 1998) e que assegura uma menor degradação dos ácidos polinsaturados.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Breivik, H.; Haraldsson, G. G., 1999. Refining oil compositions. U. S. Patent 5,945,318.
- Canas, B. J.; Yurawecz, M. P., 1999. Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids. *JAACS*, 76(4): 537.

- Haagsma, N.; van Gent, C.M.; Luten, J.B.; de Jong, R.W.; van Doorn, E., 1982. Preparation of an  $\omega$ 3 fatty acid concentrate from cod liver oil. *JAOCS*, 59 (3): 117-118.
- IPQ, 1985. NP-940, Gorduras e óleos comestíveis – Determinação do índice de saponificação e do índice de ésteres, Lisboa, 4p.
- IPQ, 1987. NP-903, Gorduras e óleos comestíveis – Determinação do índice de acidez e da acidez. Método titrimétrico, Lisboa, 5p.
- Noureddini, H.; Harmeier, S.E., 1998. Enzymatic glycerolysis of soybean oil. *JAOCS*, 75 (10): 1359-1365.
- Shahidi, F.; Wanasundara, U.N., 1998. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 230-240.

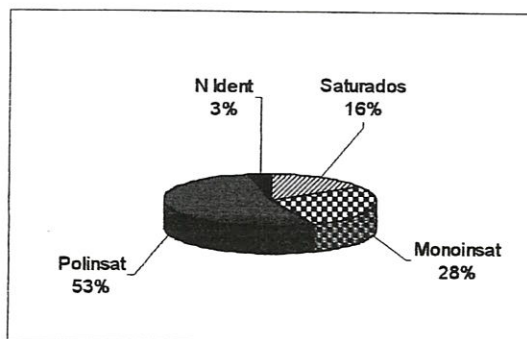


Figura 1 – Composição em ácidos gordos da fracção não hidrolisada (mono, di e triacilgliceróis).

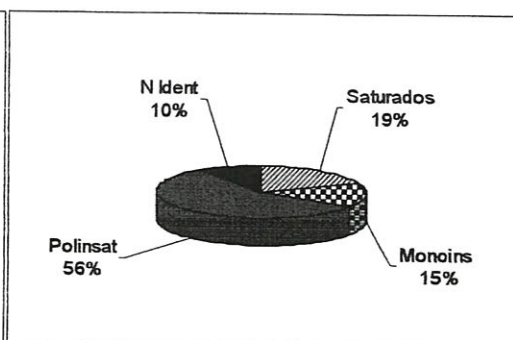


Figura 2 – Composição em ácidos gordos da fracção não transesterificada (mono, di e triacilgliceróis).

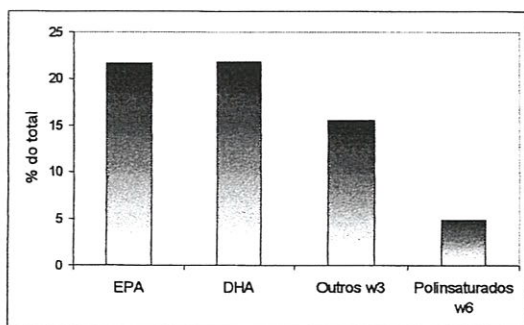


Figura 3 – Composição dos ácidos polinsaturados da fracção dos triacilglicéris.

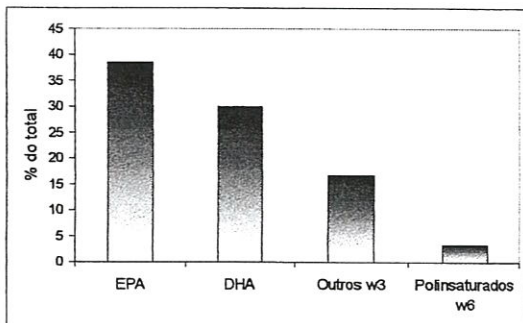


Figura 4 – Composição dos ácidos polinsaturados do óleo usado como substrato na glicerólise.

**BACTÉRIAS PRODUTORAS DE H<sub>2</sub>S E DE AMINAS BIOGÉNICAS EM BACALHAU**

M. J. Rodrigues\*; P. Ho\*\*; M. Albuquerque\*; P. Vaz-Pires\*\*\* e M.L. Nunes\*

\*IPIMAR – Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

\*\*Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

\*\*\*ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Largo do Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto

---

**INTRODUÇÃO**

No pescado, o teor em H<sub>2</sub>S tem sido considerado um parâmetro indicador do grau de frescura e, por seu lado, a presença de aminas biogénicas, além de indicadoras de deterioração, constitui também um risco para a saúde pública. Efectivamente, a histamina é susceptível de originar quadros alérgicos graves enquanto que outras aminas como a putrescina e cadaverina parecem potenciar a toxicidade da histamina e conduzir à formação de nitrosaminas carcinogénicas<sup>1</sup>. As aminas biogénicas são produzidas a partir da descarboxilação de aminoácidos livres por acção bacteriana. Neste contexto, realizaram-se estudos da microflora de bacalhau salgado (verde), salgado/seco e respectivos produtos demolhados, caracterizando-se os isolados em termos de produção de H<sub>2</sub>S e de aminas biogénicas.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Neste estudo usaram-se 12 amostras de cada um dos seguintes produtos: bacalhau salgado, salgado demolhado, salgado seco e salgado seco demolhado. A produção de H<sub>2</sub>S foi verificada directamente através de cartas GNI+ (Vitek®, bioMérieux, França).

As bactérias produtoras de putrescina e cadaverina foram identificadas através das referidas cartas com base na presença das enzimas ornitina descarboxilase, arginina diidrolase e lisina descarboxilase.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cerca de 180 estirpes isoladas nos 4 produtos analisados, apenas 7 espécies (*Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Shewanella putrefaciens*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus warneri*, *Vibrio alginolyticus* e *Xanthomonas maltophilia*), 3 grupos (*Aeromonas hydrophilia/caviae* e *Pseudomonas fluorescens/putida*) e 3 estirpes não identificadas possuíam potencial produção de H<sub>2</sub>S e/ou de aminas biogénicas (Tabela 1).

Tabela 1 – Microrganismos isolados de bacalhau produtores de H<sub>2</sub>S e/ou de aminas biogénicas (NI - estirpe Não Identificada).

| Bacalhau               | Produtor de H <sub>2</sub> S   | Detentor das enzimas:   |                          |   |
|------------------------|--|---|--------------------------|---|
|                        |  | Ornitina<br>descarboxilase  | Lisina<br>descarboxilase | Arginina<br>dihidrolase   |
| Salgado                | *****  | *****   | *****                    | *****   |
| Salgado demolhado      | <i>Xanthomonas maltophilia</i>   | <i>Xanthomonas maltophilia</i>  | *****                    | <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i><br><i>Vibrio alginolyticus</i>  |
| Salgado/seco           | NI n°1<br><i>Staphylococcus auricularis</i><br><i>Staphylococcus warneri</i> | NI n°1  | NI n°1                   | NI n°1<br>NI n°2<br><i>Staphylococcus auricularis</i><br><i>Staphylococcus warneri</i><br><i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i> |
| Salgado/seco demolhado | *****  | <i>Enterobacter cloacae</i><br><i>Morganella morganii</i><br><i>Shewanella putrefaciens</i> | *****                    | <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i><br>NI n°3   |

Algumas das espécies atrás mencionadas têm sido igualmente isoladas em pescado fresco<sup>3</sup>, o que poderá sugerir que o processo deteriorativo do bacalhau, principalmente após demolha, não seja muito diferente do observado em pescado fresco no que respeita à produção de H<sub>2</sub>S e aminas biogénicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Halász, A.; Baráth, A.; Simon-Sarkadi, L.; Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sc. Techn.*, 5: 42-49.

[2] bioMérieux.1996. Technical Bulletin Manual Clinical 510721-1 (REV 0796).  
bioMérieux Vitek, Inc. Hazelwood, EUA.

[3] Rawles, D. D.; Flick, G. J.; Martin R. E., 1996. Biogenic amines in fish and shellfish. *In: Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 39. Academic Press, Inc.



## **CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA DOS PRODUTOS DE BACALHAU**

M. J. Rodrigues\*; P. Ho\*\*; M. Albuquerque\*; P. Vaz-Pires\*\*\* e M.L. Nunes\*

\*IPIMAR – Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

\*\*Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

\*\*\*ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Largo do Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto

---

### **INTRODUÇÃO**

O bacalhau salgado seco foi objecto de numerosos estudos, em especial na primeira metade do século passado, tendo sido considerado um produto estável cujo processamento industrial não envolvia riscos elevados, devido ao baixo teor de humidade e elevadas concentrações de sal. Assim, posteriormente, os estudos incidiram, essencialmente, em termos da microflora halófila extrema. Contudo, o processamento alterou-se e, actualmente, o bacalhau salgado/seco evidencia características diferentes, em particular, maior teor em água o que torna a sua conservação mais difícil.

No sentido de contribuir para uma melhor caracterização dos produtos actualmente disponíveis no mercado, realizaram-se estudos da microflora de bacalhau salgado (verde), salgado seco e respectivos produtos demolhados no que respeita à presença de bactérias isoladas em meio com baixo teor em sal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo usaram-se 12 amostras de cada um dos seguintes produtos: bacalhau salgado, salgado demolido, salgado seco e salgado seco demolido. Os microrganismos foram isolados de PCA (Plate Count Agar) com 1% de NaCl. A caracterização foi efectuada com base na observação microscópica, teste de Gram, reacção à catalase ou oxidase e em cartas GNI, GNI+ e GPI (Vitek®, bioMérieux, França)<sup>1</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, construiu-se uma matriz composta por dados binários e nominais. A função DAISY do programa R<sup>2</sup> executou a transformação da matriz dissemelhante, tendo sido posteriormente aplicado o algoritmo “UPGMA” (Unweighted pair-group matching coefficient)<sup>3</sup>. Os agrupamentos foram determinados a partir do “agglomerative coefficient”<sup>3</sup>.

Através dos 69 fenótipos Gram-positivos encontrados (Fig. 1), foi possível identificar 61 estirpes, perfazendo um total de 15 espécies, salientando-se os *Staphylococcus* sp.

Do conjunto dos 111 fenótipos Gram-negativos isolados (Fig. 2), identificaram-se 93 estirpes, ainda que em 61 destas haja dúvidas quanto à espécie, destacando-se as *Pseudomonas* sp. e a *Shewanella putrefaciens*.

Tais resultados indicam que a microflora encontrada nos quatro tipos de produto está não só relacionada com a matéria prima<sup>4</sup>, mas também com a manipulação directa e transferência ambiental<sup>4,5,6</sup>.

Nos produtos demolidos observou-se maior variedade de Gram-negativos do que Gram-positivos, ao contrário dos produtos salgados e salgados secos.

Semelhança (%)

20 40 60 80 100

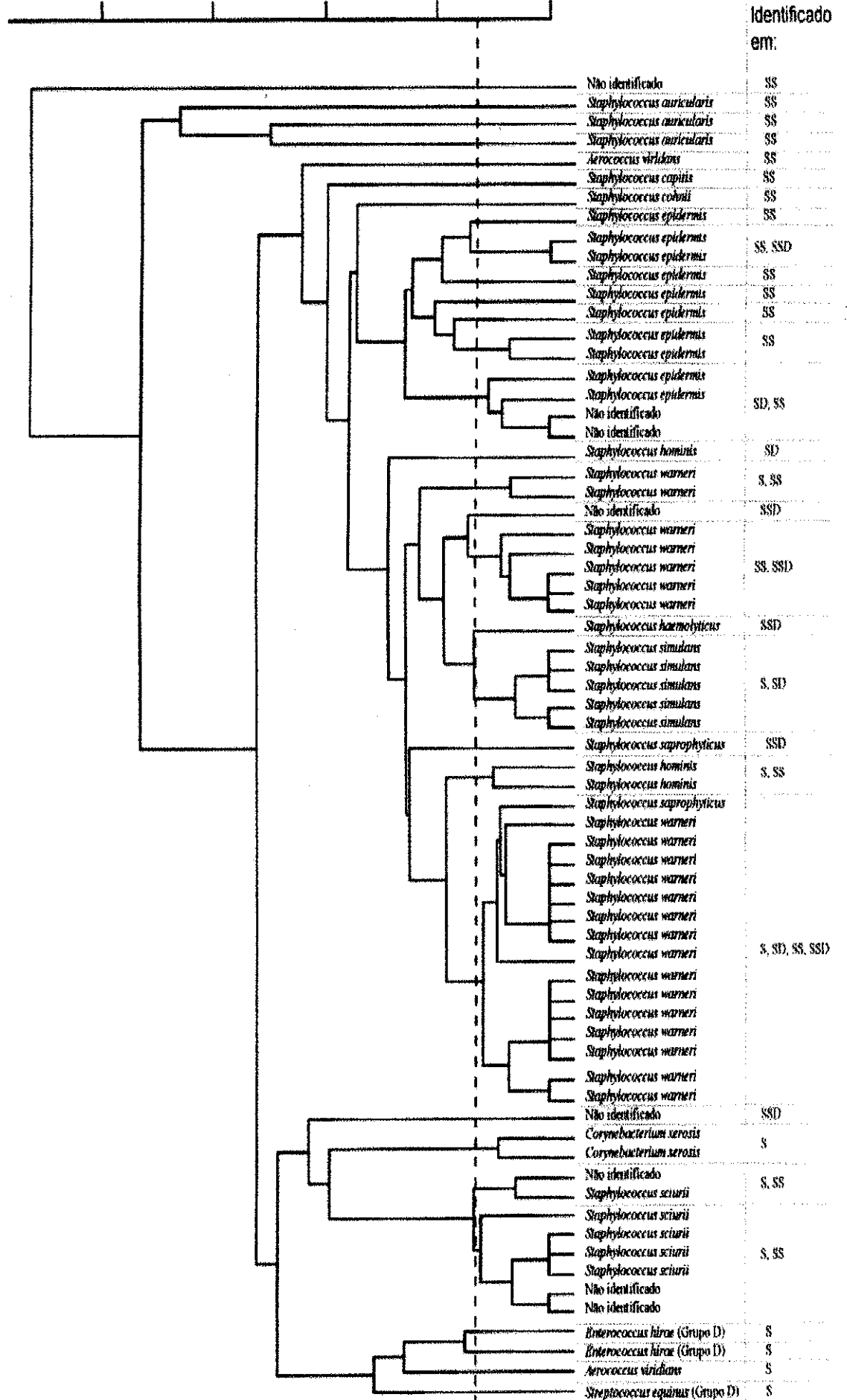


Figura 1 - Dendrograma construído com 111 fenótipos Gram-negativos.

S - Bacalhau salgado; SD - Bacalhau salgado demolhado; SS - Bacalhau salgado/seco;

SSD - Bacalhau salgado/seco demolhado



## REFERÊNCIAS

- [1] bioMérieux, 1996. Technical Bulletin Manual Clinical 510721-1 (REV 0796). bioMérieux Vitek, Inc. Hazelwood, EUA.
- [2] Ihaka, R.; Gentleman, R., 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J. Comput. Graphical Stats*, 5: 299-314.
- [3] Kaufman, L.; Rousseeuw, P.J., 1990. Finding groups in data. *In: An introduction to cluster analysis*. John Wiley & Sons, Inc. New York, EUA.
- [4] ICMSF (International Commission on Microbiol Specifications for Foods), 1998. Fish and fish products. *In: T. A. ROBERTS, J. I. PITT, J. FARKAS E F. H. GRAU (Eds.), Micro-organisms in foods. Microbial ecology of food commodities*, vol. 6. Blackie Academic and Professional, London, RU.
- [5] Krieg, N. R.; J. G. Holt. (ed.), 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, EUA.
- [6] Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E.; Holt, J. G. (Eds.), 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, EUA.



## NUCLEOTIDES DEGRADATION ON CRUSTACEANS CHILLED WITH LIQUID ICE

Mendes, R.<sup>1</sup>, Huidobro, A.<sup>2</sup>

1- Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR), Av. Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal

2- Instituto del Frío (CSIC), Ciudad Universitaria, s/n; E-28040 Madrid, Espanha

---

### INTRODUCTION

Liquid ice or binary ice is a new food chilling technique that requires less time to chill products and acts more uniformly than other types of ice. Liquid ice application on crustaceans immediately after catch provokes a stronger muscular contraction, which improves processing of individuals.

The aim of this study was to evaluate the effect on ATP and derivatives formation of chilling deepwater pink shrimp, red shrimp and Norway lobster with liquid ice onboard immediately after catch.

### MATERIALS AND METHODS

Crustaceans source. The studied crustaceans were deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*), red shrimp (*Aristeus antennatus*) and Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) caught off the Algarve coast (Portimão) by the bottom trawler Costasul (Cardiopeixe, Lda)

Treatments. Flake ice lots were treated with commercial antimelanolic product based on sulphite by spreading, while liquid ice lots were introduced during 7 minutes in an insulated container filled in with 30% liquid ice as recommended by the commercial supplier. For each species, both lots were chilled and stored during 80 hours in cold stores ( $2 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with flake ice on them.

Analyses performed. ATP and their breakdown products were extracted according to Ryder (1985). K value (as a percentage of the ratio between Ino+Hx to all ATP related products) was calculated according to Saito *et al.* (1959).

## RESULTS

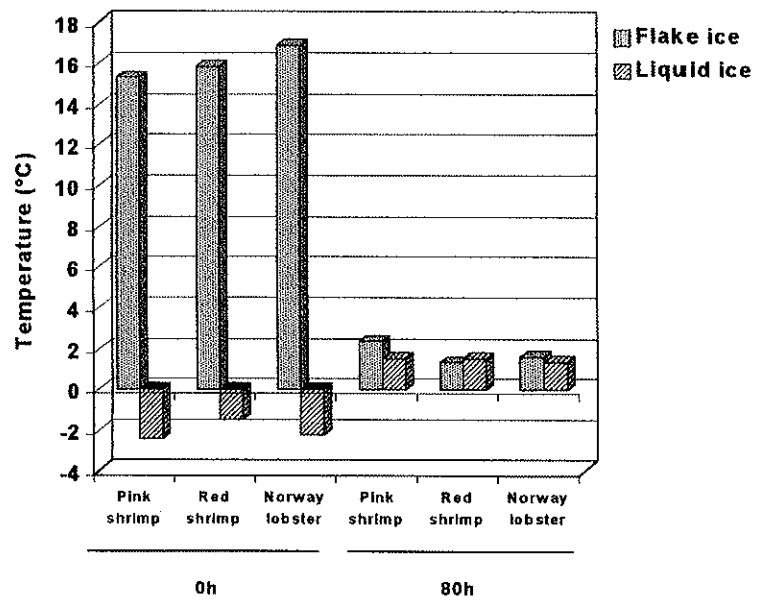


Fig. 1. Temperature of pink shrimp, red shrimp and Norway lobster chilled with flake ice or liquid ice immediately after catch and stored up to 80 hours.

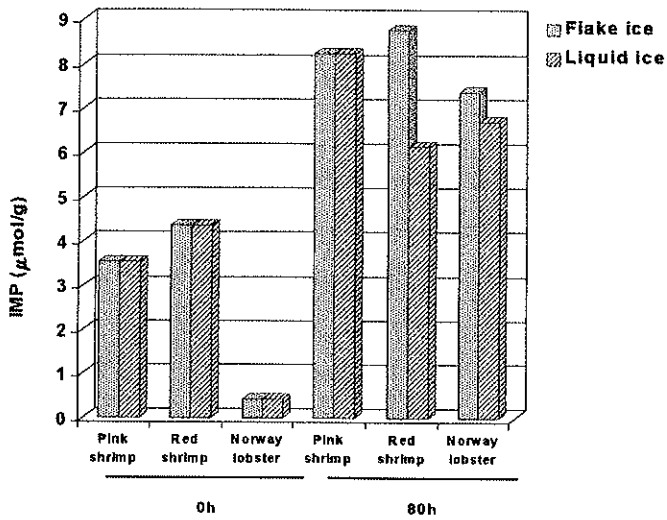


Fig. 2. Inosine monophosphate (IMP) of pink shrimp, red shrimp and Norway lobster chilled with flake ice or liquid ice immediately after catch and stored up to 80 hours.

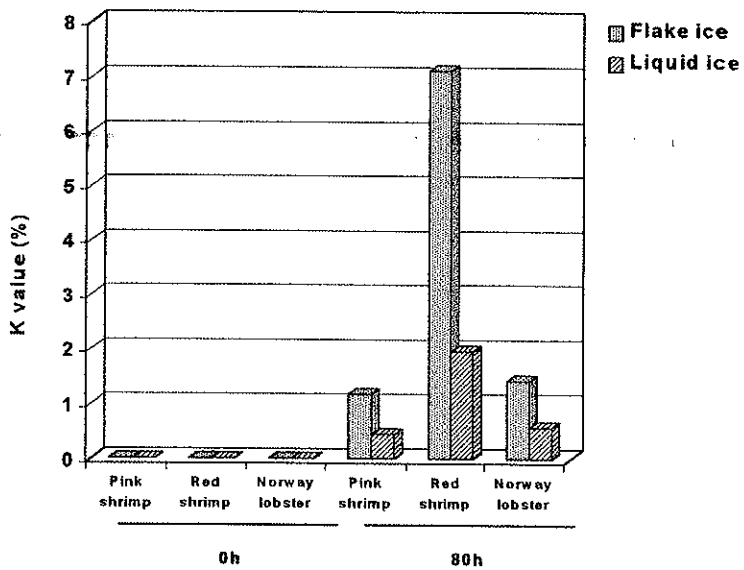


Fig. 3. K value of pink shrimp, red shrimp and Norway lobster chilled with flake ice or liquid ice immediately after catch and stored up to 80 hours.

## **CONCLUSIONS**

The use of liquid ice to chill the studied species reduced significantly the temperature of the individuals.

When liquid ice was applied to chill pink shrimp, red shrimp or Norway lobster immediately after catch, the spoilage measured as K value evolved more slowly and reached lower final values after 80 hours of chilled storage.

## **REFERENCES**

- Ryder, J.M., 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 678-680.
- Saito, T., Arai, K.I. and Matsuyoshi, M. 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 24: 749-750.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Mr. António Farinha from CARDIOPEIXE, Lda (Lisboa, Portugal) for the supply of the shrimp used in this study and for the contribution in the development of this work. STS company (Alcalá de Henares, Madrid, España) for the supply of the demonstration prototype to produce liquid ice.

## DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO TOTAL, ORGÂNICO E INORGÂNICO EM PEIXE-ESPADA-PRETO (*Aphanopus carbo*) CAPTURADO AO LARGO DA ILHA DA MADEIRA

C. Afonso<sup>1,2</sup>, H.M. Lourenço<sup>2</sup>, M.L. Nunes<sup>2</sup>, Abreu Dias<sup>3</sup>; M. Castro<sup>1,4</sup>

1 – Fac. Farmácia Lisboa; 2 – IPIMAR; 3 – Alicontrol; 4 – Centro de Farmac. Exper. Clínica Univ. Lisboa

---

### INTRODUÇÃO

A poluição do ambiente marinho por contaminantes orgânicos e inorgânicos tem sido identificada como sendo um dos factores de maior impacte em fenómenos toxicológicos que ameaçam a sobrevivência dos organismos marinhos. Os fenómenos biogeoquímicos regulam a transmissão de mercúrio aos níveis tróficos e, deste modo, levam à bioacumulação nos peixes. Esta concentração de mercúrio ao longo da cadeia alimentar representa um risco toxicológico, particularmente no fim da cadeia trófica, ou seja, o Homem que consome o pescado.

O mercúrio é um dos metais que apresenta maior diversidade de efeitos adversos correspondentes às diferentes formas químicas. O mercúrio pode encontrar-se sob a forma elementar, orgânica e inorgânica, cada um com toxicocinética e efeitos tóxicos diferentes. O metilmercúrio é a forma mais importante de mercúrio em termos de toxicidade e efeitos adversos.

O ciclo biológico do peixe-espada-preto (*Aphanopus carbo*) pode predispor à acumulação deste metal a nível dos seus tecidos e deste modo pode influenciar, por via da cadeia alimentar, a saúde do consumidor. Visto que é um produto de grande valor económico no mercado português, sobretudo na Ilha da Madeira, este trabalho tem como objectivo determinar o teor de mercúrio total, orgânico e inorgânico em exemplares desta espécie capturados ao largo da Ilha da Madeira.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho os exemplares de peixe-espada-preto estudados foram capturados ao largo da Ilha da Madeira (N=50). Depois de efectuada a medição e pesagem, foram separados, para posterior análise, a pele e tecido adiposo subcutâneo, o fígado e a parte muscular.

Os teores de mercúrio foram determinados pelo método de Espectrofotometria de Absorção Atômica em fase de vapor frio. O mercúrio total foi doseado de acordo com a Norma Portuguesa NP 2928 (1). O método de determinação do mercúrio orgânico e inorgânico foi baseado no método descrito por diversos autores (2 e 3).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os comprimentos dos indivíduos estudados encontravam-se compreendidos entre 98 e 126 cm, gama frequentemente comercializada (5 e 6), e pesavam entre 1,4 e 3,0 kg (Tabela 1), sendo todos os exemplares adultos.

Os níveis médios de mercúrio total no fígado foram mais elevados do que os verificados na pele e no músculo. Os resultados obtidos permitiram constatar que a concentração média de mercúrio total foi de  $0,9 \pm 0,3$ ,  $0,6 \pm 0,3$  e  $4,5 \pm 2,5$  mg/kg, respectivamente, no músculo, pele e fígado. Por outro lado, o teor máximo de mercúrio observado no músculo e pele foi de 1,4 mg/kg e no fígado de 11,3 mg/kg.

Tabela 1 - Caracterização do peixe-espada-preto no que respeita a valores médios de comprimento, peso e teor de mercúrio total nos vários tecidos.

| N=50         | Comprimento (cm) | Peso (kg) | Hg (mg/kg) |         |         |
|--------------|------------------|-----------|------------|---------|---------|
|              |                  |           | Músculo    | Pele    | Fígado  |
| Média ± D.p. | 111±6            | 2,1±0,4   | 0,9±0,3    | 0,6±0,3 | 4,5±2,5 |
| Mediana      | 111              | 2,2       | 0,9        | 0,6     | 4,3     |
| Valor máximo | 126              | 3,0       | 1,4        | 1,4     | 11,3    |
| Valor mínimo | 98               | 1,4       | 0,2        | 0,1     | 0,3     |

A figura 1 ilustra a relação entre o teor médio de mercúrio total nos diferentes tecidos analisados e as classes de comprimento. A análise dos resultados não permitiu obter nenhuma correlação entre o teor de mercúrio nos vários tecidos e o

comprimento. Os coeficientes de correlação foram -0,11, -0,18 e 0,09, respectivamente, para o músculo, pele e fígado os quais apresentam um nível de significância inferior a 95%.

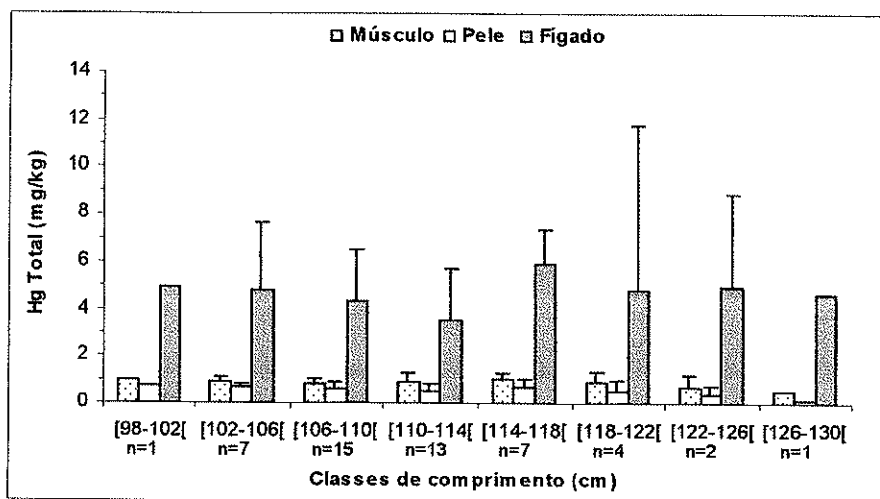


Figura 1 – Teor médio de mercúrio (músculo, pele e fígado) por classes de comprimento.

Na figura 2 está representada a relação entre a percentagem de indivíduos que, nos diferentes tecidos, apresentavam teores de mercúrio inferiores ou superiores ao teor máximo legislado pela U.E. (3) que é de 1 mg/kg. Os resultados obtidos indicam que o teor de mercúrio no músculo era igual ou superior a 1 mg/kg em 46% dos indivíduos. No que respeita à pele e ao fígado, estas percentagens cifravam-se em 10 e 98%, respectivamente.

A determinação dos teores de mercúrio orgânico e inorgânico revelou que cerca de 81% do mercúrio total existente no músculo se apresenta sob a forma orgânica e somente 19% era inorgânico (Fig. 3). Tal como verificado para o músculo, a percentagem de mercúrio orgânico no fígado foi superior à do inorgânico, sendo estes valores médios, respectivamente, 83% e 17%. Percentagens semelhantes às encontradas foram referidas, para outras espécies, por diversos autores (3, 7 e 8).

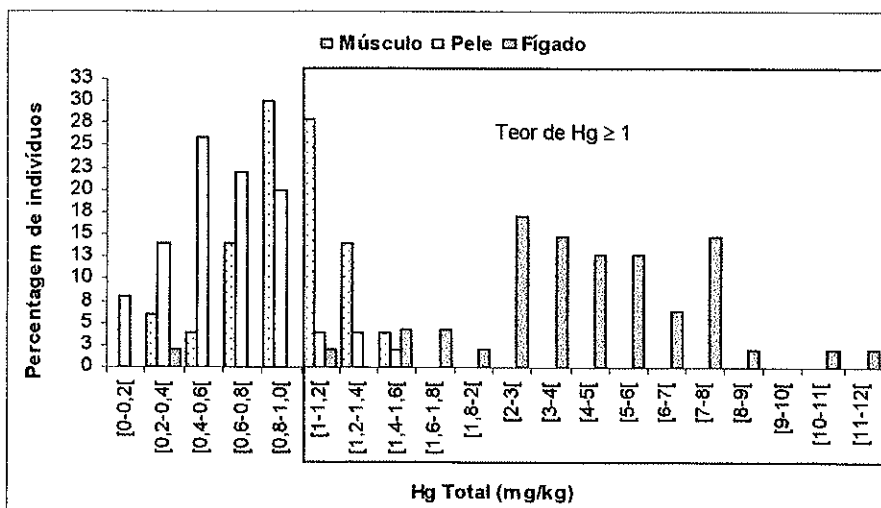


Figura 2 – Percentagem de indivíduos em função do teor de mercúrio nos tecidos (músculo, pele e fígado).

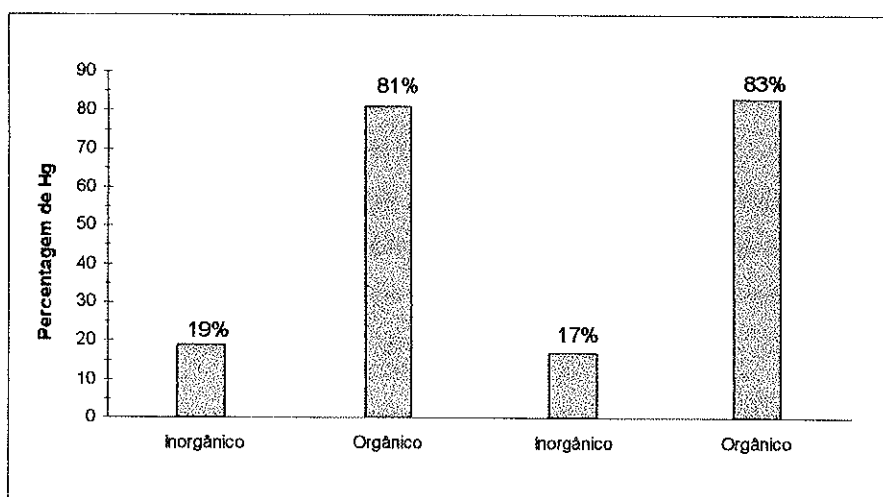


Figura 3 - Percentagem de mercúrio inorgânico e orgânico em músculo e fígado de peixe-espada-preto.

## CONCLUSÕES

⇒ Atendendo aos resultados obtidos no doseamento do mercúrio total no fígado (98% das amostras continham valores superiores ao limite legislado pela U.E.), deve

considerar-se que este é um tecido de risco elevado, pelo que o seu consumo deve ser excluído da dieta alimentar.

- ⇒ A especiação do mercúrio total em algumas amostras de músculo e fígado demonstrou que a maior fracção de mercúrio total se apresentava sob a forma orgânica (>80%).
- ⇒ Em relação ao potencial risco associado ao consumo do tecido muscular e pele do peixe-espada-preto, pode concluir-se que este é seguro se o seu consumo for moderado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) – IPQ, 1988. NP 2928, Determinação do teor de mercúrio. Método espectrofotométrico de absorção atómica sem chama, Lisboa, 5p.
- (2) – Oda, C.E.; Ingle, J.D., 1981. Speciation of mercury by cold vapor atomic absorption spectrometry with selective reduction. *Analytical Chemistry*, 53(14): 2309-2313.
- (3) – Ubillús, F.; Alegria, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Lagarda, M.J., 2000. Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 71: 529-533.
- (4) – UE, 2001. Regulamento (EC) N.º 466/2001. JO L77, 16.03.2001, 13p.
- (5) – Martins, M.R.; Martins, M.M.; Cardador, F., 1989. Portuguese fishery of black scabbard fish (*Aphanopus carbo* Lowe, 1839) off Sesimbra waters. ICES, CM-1989/G:38 (mimeo).
- (6) - Morales-Nin, B., Sena-Carvalho, D., 1996. Age and growth of the black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) off Madeira. *Fisheries Research*, 25: 239-251.
- (7) – Andersen, J.L., Depledge, M.H., 1997. A survey of total mercury and methylmercury in edible fish and invertebrates from azorean waters. *Marine Environmental Research*, 44(3): 331-350.
- (8) – Francesconi, K.A., Lenanton, R.C.J., 1992. Mercury contamination in a semi-enclosed marine embayment: organic and inorganic mercury content of biota, and factors influencing mercury levels in fish. *Marine Environmental Research*, 33: 189-212.



## CONSERVAÇÃO DE BACALHAU DEMOLHADO REFRIGERADO EMBALADO A VÁCUO

S. Pedro; C. Pestana; N. Magalhães; I. Batista; M. M. Albuquerque; M. L. Nunes  
Instituto de Investigação das Pescas e do Mar; Departamento de Inovação Tecnológica  
e Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa

---

### RESUMO

Neste trabalho estudou-se a qualidade do bacalhau demolhado, conservado em refrigerado e embalado a vácuo através de análises físicas, químicas, sensoriais e microbiológicas. Os teores de ABVT, TMA e pH aumentaram após o 21º dia de armazenagem. A evolução do TBA não indicou alterações ao nível dos lípidos. Ocorreu um ligeiro aumento da firmeza durante a armazenagem, embora, de um modo geral, a textura se tenha mantido característica para este produto. O bacalhau foi aceite por mais de 50% dos provadores até ao 21º dia de armazenagem. Na flora halotolerante observou-se, até ao 3º dia, um aumento de 2 ciclos log, atingindo-se teores de aproximadamente  $5 \times 10^4$  ufc/g. No restante período de armazenagem detectou-se um crescimento menos acentuado, registando-se teores próximos de  $1 \times 10^8$  ufc/g aquando da rejeição sensorial do produto (28º dia). A flora produtora de H<sub>2</sub>S aumentou 3,5 ciclos log entre os dias 3 e 7, detectando-se no 7º dia teores de aproximadamente  $6 \times 10^4$  ufc/g. A partir dessa data, tornou-se dominante e constituída, maioritariamente, por estirpes produtoras de TMA. Assim, o tempo de conservação do bacalhau demolhado refrigerado, embalado a vácuo, foi de 21 dias, com base nas características organolépticas, porém, atendendo aos parâmetros microbiológicos, deverá ser encurtado para 7 dias.

## **INTRODUÇÃO**

O bacalhau salgado seco tem uma longa tradição em Portugal, sendo consumido normalmente, após demolha de um a dois dias e cozinhado de múltiplas maneiras. A necessidade de uma preparação prévia (demolha) torna-o pouco adequado ao estilo de vida e estrutura familiar actuais, exigindo o desenvolvimento de produtos prontos a consumir. Existem já no mercado alguns produtos à base de bacalhau demolido cujo consumo tem vindo a popularizar-se dada a sua comodidade de utilização. Contudo, são comercializados em congelado, não respondendo totalmente às exigências do mercado. Assim, no sentido de estudar novos tipos de apresentação de bacalhau demolido, realizaram-se ensaios de conservação, em refrigerado, deste tipo de produto embalado a vácuo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O bacalhau foi demolido a 4°C durante 48 horas, com 2 mudas de água da torneira, após o que foi embalado a vácuo e conservado a 4°C durante 28 dias. A evolução da qualidade durante a armazenagem foi seguida através de análises sensoriais, físicas (pH e textura), químicas (ABVT, TMA, TBA e humidade) e microbiológicas (bactérias halotolerantes e produtoras de H<sub>2</sub>S). A textura foi determinada no equipamento Instron 4301, usando a célula de Kramer wr2944, e uma carga de 1kN; o pH foi medido no pH Meter Methrom 691. Na determinação do teor de humidade, a secagem das amostras, até peso constante, foi realizada em estufa a 105 °C ou num forno de microondas com uma potência de 800 W e uma temperatura de 160°C durante 10 min; o azoto básico volátil total (ABVT) foi determinado por destilação no aparelho Kjeltex Auto Sampler System 1035 Analyzer da Tecator; o teor em Azoto de Trimetilamina (ATMA) foi determinado pelo método descrito por Cobb *et al.* (1973) e o índice TBA de acordo com a norma portuguesa NP 3356 (IPQ, 1990). Na realização da análise sensorial utilizou-se o Método do Índice de Qualidade (QIM) para a apreciação do bacalhau demolido cru. A qualidade microbiológica foi avaliada através da contagem de bactérias halotolerantes (PCA +3% NaCl; 15°C, 10d) e da contagem de bactérias produtoras de H<sub>2</sub>S (Iron agar; 15°C, 10 d).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o 20º dia, os valores de ABVT e TMA aumentaram de forma acentuada, mas o teor de 35 mg N/100g (limite máximo indicado na Decisão 95/149/CEE (1995) para o valor deste índice em peixe fresco para espécies da família Gadidae) nunca foi atingido no período em que decorreu o ensaio (Fig. 1). A flora halotolerante aumentou 2 ciclos log até ao 3º dia, detectando-se depois um crescimento menos acentuado (Fig. 2). A flora produtora de H<sub>2</sub>S aumentou 3,5 ciclos log entre os dias 3 e 7; a partir do 7º dia, tornou-se dominante.

A textura do produto ficou ligeiramente mais firme (Fig. 3), tendo-se observado, a partir do 11º dia (Figs. 3 e 4), um aumento da firmeza e uma diminuição do teor de água no bacalhau que poderá ser responsável por aquele aumento.

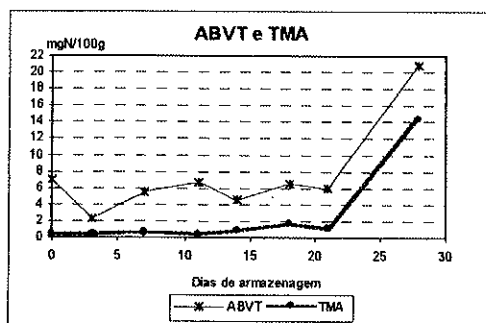


Figura 1 – Evolução do ABVT e TMA ao longo do período de armazenagem.

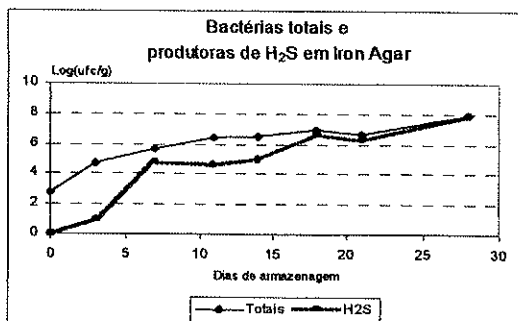


Figura 2 – Evolução microbiana ao longo do período de armazenagem.

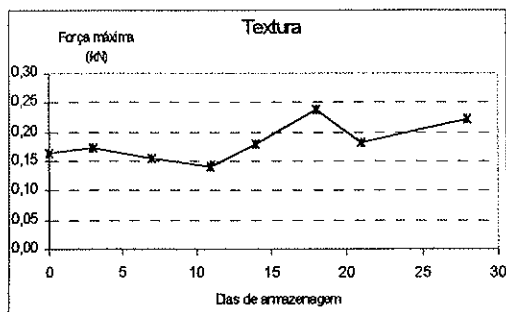


Figura 3 – Evolução da textura ao longo do período de armazenagem.

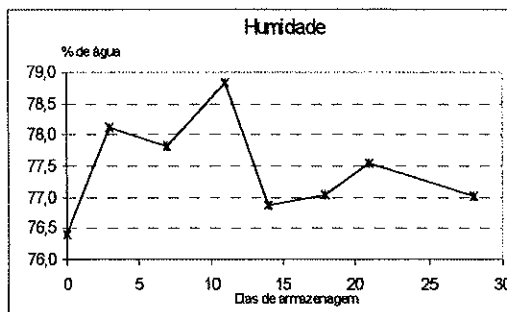


Figura 4 – Evolução da humidade ao longo do período de armazenagem.

O pH variou entre 6,38 e 6,8, tendendo durante a armazenagem para valores próximos da neutralidade (Fig. 5). Os valores do índice TBA foram sempre inferiores a 0,3 mg de aldeído malónico/kg de amostra. Estes resultados situaram-se muito abaixo da gama referida por Connell (1975) (1-2 mg de aldeído malónico/kg de amostra) que este autor considera como os valores a partir dos quais o pescado pode apresentar cheiro e sabor a ranço.

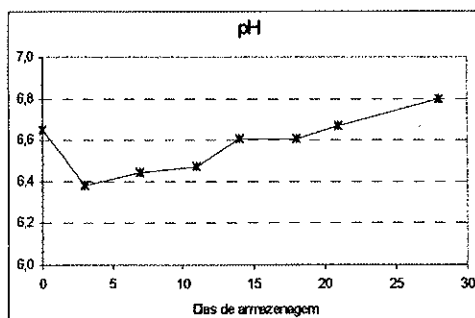


Figura 5 – Evolução do pH ao longo do período de armazenagem.

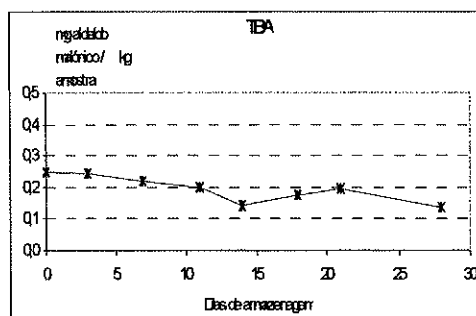


Figura 6 – Evolução do índice TBA ao longo do período de armazenagem.

Até ao 7º dia o bacalhau foi considerado, por 100% dos provadores, com qualidades organolépticas características deste tipo de produtos (Fig. 7). Após 21 dias apenas 50% dos provadores consideraram o bacalhau cru aceitável, tendo sido o cheiro desagradável a principal causa de rejeição.

## CONCLUSÃO

O tempo de conservação do bacalhau demolido refrigerado embalado a vácuo foi estabelecido em 21 dias com base nas características organolépticas do produto. Porém, atendendo aos parâmetros microbiológicos, o período de conservação deverá ser considerado de 7 dias.

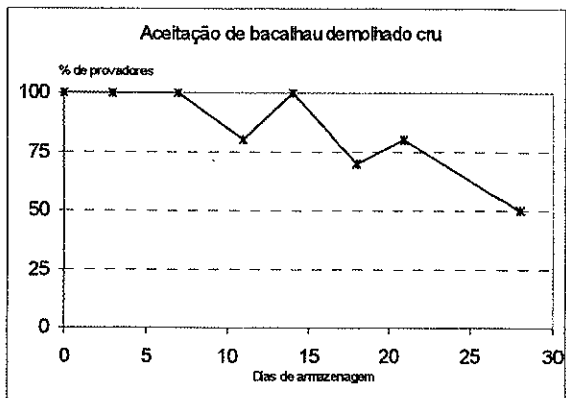


Figura 7 - Aceitação de bacalhau demolido cru ao longo do período de armazenagem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CE, 95/149/CE Decisão da Comissão de 8 de Março de 1995 que fixa os valores limite de azoto básico volátil total (ABVT) para determinadas categorias de produtos da pesca e os métodos de análise a utilizar. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº L 97 de 29.04.95.
- 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.
- Connell, J. J., 1975. Control of fish quality. Fishing News (Books) Ltd. 179 p.
- Huss, H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fish. Tech. Pap.* 348, FAO Rome, Italy, 195p.
- IPQ, 1990. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.). Método colorimétrico. NP3356. 5 p.
- Jacober, L. F.; Rand Jr., A. G, 1982. Biochemical Evaluation of Seafood. In: R. MARTIN, G. J. FLICK, C. E. HEBARD, C. E. e D. R. WARD (Eds.) *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products*. Avi Publishing Company, West Port, Connecticut, pp. 347-363.
- UE, 1995. Directiva 95/149/CE, Jornal Oficial das Comunidades Europeias N.º L 97 de 29.04.95, 84-87.



## **AVALIAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA A DETECÇÃO DE *SALMONELLA* EM MOLUSCOS BIVALVES DE ÁGUAS MUITO CONTAMINADAS**

Helena A. Silva, M. Lurdes Silva, Ana M. Ferreira, Nuno Magalhães E M. Madalena Albuquerque

Instituto de Investigação das Pescas e do Mar - Av. Brasília, 1449-006 Lisboa,

---

### **INTRODUÇÃO**

Os moluscos bivalves vivos são considerados produtos de elevado risco especialmente nas épocas mais quentes, sendo a *Salmonella* o microrganismo que coloca mais problemas. Para a sua detecção têm sido propostos diversos protocolos mas a própria composição intrínseca dos bivalves interfere na pesquisa deste patogénico e aquando da presença de níveis elevados de contaminação fecal podem surgir interferências que condicionam a metodologia. Com o objectivo de encontrar uma forma de detecção mais rápida e fiável da *Salmonella* nestes produtos da pesca, estudou-se a aplicação de um método de imunofluorescência, com e sem imunoc concentração (esquema A e B respectivamente), e compararam-se os resultados obtidos com o da metodologia descrita na prEN 12824 (1997). Embora esta última metodologia dê resultados coerentes, as muitas reacções positivas que depois da confirmação em placa e serologia correspondem a amostras sem *Salmonella*, vêm introduzir a necessidade de encontrar uma metodologia que permita eliminar os resultados negativos mais rapidamente.

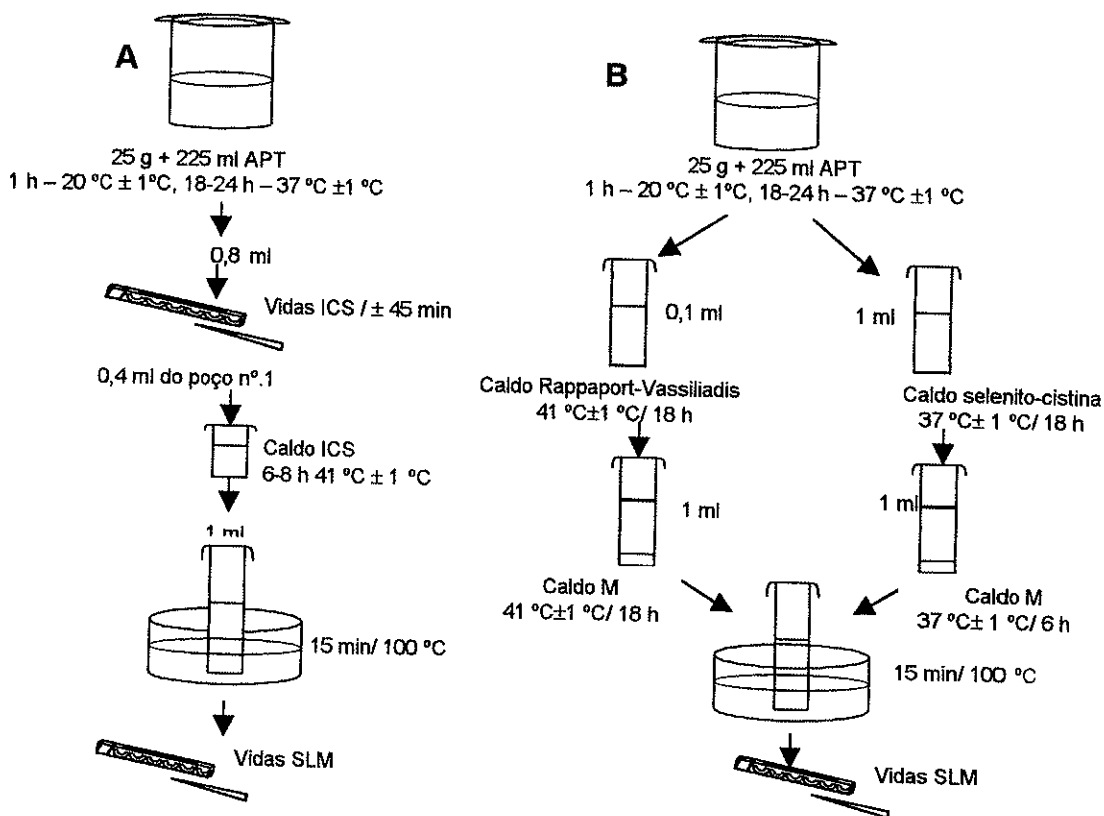
## MATERIAL E MÉTODOS

Água peptonada tamponada (BPW), Caldo Rappaport Vassiliadis (RVB), Caldo Selenito Cistina (SCB), Caldo M (MB), Agar para identificação de Salmonella (SMID), Tubos Kligler, Vidas Salmonella (Vidas SLM), kit de imunocaptação Vidas (Vidas ICS), Analisador automatizado Vidas, Vitek 32 e cartas de identificação para bactérias gram-negativas (GNI+) de bioMérieux.

Meio para teste rápido de Salmonella (SRTEM), Discos de Novobiocina, Agar de Verde Brilhante (BGAM), Teste rápido de Salmonella (SRT) e Agar Salmonella Shigella (SS) de Oxoid. Anti-serum Salmonella O Poli A-I e Vi (DIFCO). A embalagem para o teste rápido de Salmonella (Oxoid) foi re-hidratada e preparada de acordo com as instruções do fabricante. O kit Vidas SLM, o kit Vidas ICS, o analisador Vidas e o Vitek foram usados de acordo com as instruções do fabricante.

Protocolo validado AFNOR (BIO-12/1-04/94) - ISO 6579.<sup>(1)</sup> NP-1828, 1982. <sup>(2)</sup>

As metodologias foram desenvolvidas nas seguintes etapas: pré-enriquecimento com água peptonada tamponada (APT) que foi incubada durante 1h a 20 °C ±1 °C seguida de 18-24 h a 37 °C ±1 °C; enriquecimento selectivo, confirmação dos resultados suspeitos por sementeira em placa em dois tipos de agar diferentes (Agar verde brilhante modificado, Salmonella-Shigella Agar e/ou SMID Agar, selecção de colónias suspeitas que foram submetidas a testes serológicos e bioquímicos (5 colónias por placa) e respectiva identificação por carta Vitek GNI+. As amostras só foram consideradas positivas após confirmação.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Os resultados obtidos com os métodos Vidas ICS e Vidas SLM são comparáveis com os do método Rapid Oxoid na detecção da *Salmonella* em moluscos bivalves de zonas com elevada contaminação fecal, normalmente superior a 5400 coliformes fecais (resultados não apresentados aqui).
- A técnica de imunofluorescência permitiu eliminar os resultados negativos mais rapidamente e evitou a necessidade de confirmação sistemática. A imunocaptação prévia da amostra permitiu obter os resultados negativos em apenas 24 h. No caso de amostras positivas ou suspeitas em que é necessária a confirmação, o período total da análise pode ser encurtado (24 h).
- Nos métodos A e B obtiveram-se 3 e 2 falsos negativos o que está de acordo com os resultados de outros autores para produtos alimentares.

- Pretende-se prosseguir o trabalho, em particular no aperfeiçoamento da fase de confirmação, uma vez que a presença de muita flora contaminante (nomeadamente *Proteus*, *Citrobacter*) torna particularmente moroso o trabalho de confirmação das amostras suspeitas. Neste trabalho as agaroses SMID e SS revelaram-se mais eficazes do que o agar BGAM para seleccionar as colónias suspeitas para confirmação.

| Métodos  | A         | B         | C        |
|--|-----------|-----------|----------|
|  | Vidas ICS | Vidas SLM | Rapid Ox |
| Até obtenção de resultado positivo ou suspeito | 23-27     | 40-44     | 48-48    |
| Confirmação de resultado positivo ou suspeito  | 81-103    | 92-114    | 106-124  |
| Nº amostras                                    | 35        | 96        | 96       |
| Amostras negativas                             | 17        | 49        | 46       |
| Amostras positivas confirmadas                 | 15        | 47        | 50       |
| Amostras falso-negativas                       | 3         | 2         | NA       |
| % amostras falso-negativas                     | 9         | 2         | -        |

## REFERÊNCIAS

1. IPIMAR, 1998. Pesquisa e identificação de *Salmonella* em moluscos bivalves vivos. Procedimento técnico de métodos analíticos n.º 10. 9 p.
2. pr EN ISO 6579, 1997. Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonella, AFNOR, Dezembro, 1993. 35 p. (Versão em revisão da EN ISO 6579,1993.)
3. NP-1828, 1982. Colheita de amostras para análise microbiológica.1ª ed. Instituto Português da Qualidade, 3 p. NP-1829, 1982. Microbiologia alimentar. Colheita de amostra para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade, 3 p.

## **MESAS REDONDAS**



## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

### **1º ENCONTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IPIMAR**

Marcelo de Vasconcelos, Presidente do IPIMAR

---

Quando se tenta esboçar o que poderão ser **perspectivas de futuro** e, sobretudo, os grandes desafios que se nos podem colocar, é, obviamente, útil ter uma noção do que pensa a indústria, porque se colocam numa “linha da frente”, balizada pela disponibilidade de matéria-prima, de um lado, e pelo consumo, do outro, possuindo uma experiência concreta, tanto em termos de *know how* e de tecnologia como de mercado.

Esse contributo ajuda-nos a compreender melhor as aspirações, os caminhos que se deseja percorrer e as dificuldades que se colocam. Todavia, sendo ele inestimável, não nos dará, porventura, a visão mais completa dos desafios que se colocam num mundo em que a matéria-prima se vai revelando escassa e vulnerável, em que tradições de consumo aparentemente solidificadas estão em mudança e em que as fronteiras se abrem.

Neste mundo que sempre se procura julgar sólido cresce a necessidade de sustentação, mas a sustentação implica equilíbrio, qualidade e segurança.

É verdade que os últimos anos têm registado, genericamente, progressos assinaláveis em diversos domínios, mas é igualmente notório que resta muito a fazer, alterando hábitos e descobrindo outros caminhos. Por tudo isto e porque o objectivo desta mesa redonda é o de contribuir para um debate sobre perspectivas futuras gostaria de, muito rapidamente, chamar a atenção para um conjunto de questões, algumas certamente abordadas nestes dois dias – e que têm sido objecto de investigação e de uma colaboração frutuosa com a Indústria – mas outras nem sequer ou apenas afloradas.

Em primeiro lugar, parece evidente que qualquer que seja o segmento da indústria envolvido há que caminhar no sentido de:

- ◆ pugnar por índices mais elevados de qualidade tanto ao nível das matérias-primas como da produção de transformados,
- ◆ contribuir para uma maior rentabilidade do processo produtivo, reduzindo as perdas e convertendo desperdício em mais-valia,
- ◆ afinar e desenvolver métodos e técnicas que permitam, qualquer que seja a transformação, identificar as espécies, determinar a origem dos produtos e avaliar a sua qualidade.

Sendo nós altamente dependentes da importação de produtos da pesca para consumo directo ou para a indústria, parece evidente a necessidade de não subestimarmos a importância destes pontos e a necessidade de sobre eles continuar a incidir um **acrescido esforço por parte de uma investigação interdisciplinar em estreita parceria com o sector.**

**Em segundo lugar, vamos tendo consciência de que neste novo século XXI – e a prazo já não muito distante – dois dos grandes desafios que se colocam à Humanidade (para além do alimentar) têm a ver com água e energia.**

Quer isto dizer que, também nestes domínios há que apostar em processos fabris menos desperdiçadores destes dois bens comuns que estão desigualmente distribuídos e vão evidenciando tendência para maior escassez. Se as energias alternativas são uma saída possível ainda insuficientemente explorada e em uso, já a água representa hoje um problema que tende a agravar-se muito rapidamente, bastando pensar que:

- ◆ a água potável representará qualquer coisa como cerca de 1% de toda a água disponível,
- ◆ metade da humanidade vive hoje concentrada em áreas urbanas e
- ◆ em mais de metade das cidades europeias, as necessidades de consumo actual são satisfeitas através da sobreexploração de lençóis de água

subterrânea, sendo que parte dessas reservas se encontrará poluída em muitos países.

A racionalização dos usos (que implicam um sentido de responsabilidade colectiva) e a busca de soluções justificam que também aqui se estreitem, ainda mais, as relações de colaboração estreita entre a indústria e a ciência – com a vantagem adicional de se poderem minimizar custos.

**Em terceiro lugar**, nem todas as unidades de produção da indústria dispõem de idêntica capacidade para enfrentar, por si sós e com êxito, os constantes **desafios de um mercado aberto** que – à sua escala – se caracteriza pelo forte dinamismo e por uma concorrência que tende a:

- ◆ diversificar-se, com o aparecimento de novas espécies que ameaçam pôr em cheque as tradicionalmente implantadas no mercado e a
- ◆ aumentar com a entrada de novos interventores.

A conjugação de esforços, a complementaridade e a definição de serviços comuns pode ser uma solução inteligente, orientando-se a natural concorrência entre empresas para os momentos e locais onde essa luta não contribua para a sua destruição. Por outras palavras, defendo uma **estratégia de organização e convergência de interesses** que, livremente aceite, permita reforçar a capacidade de defesa e intervenção da indústria nacional.

**Em quarto lugar**, uma maior mobilidade e abertura de fronteiras e, conseqüentemente, de mercados abre portas a novos e muito sérios desafios em matéria de **saúde pública**. A **biotecnologia** pode contribuir para que no futuro o sistema de produção pesqueira (que engloba a aquicultura) alcance, dentro de certos limites, melhores índices de rentabilidade e sustentabilidade, mas temos de reconhecer que, no estágio actual do conhecimento, as margens de incerteza – e, portanto, de real

ou potencial risco – são demasiado elevadas, não sendo indiferentes as questões de natureza ética.

Em todos os casos se exige uma completa transparência na informação que se presta à sociedade e um cuidadoso confronto com uma experimentação científica idónea, rigorosa e independente.

**Em quinto lugar**, há que reconhecer o papel chave da **ciência** e o contributo que ela pode prestar em todos os domínios, que não só os de natureza puramente técnica. O estreitamento de relações e o alargamento de um clima de confiança entre a investigação e o Sector abre caminho para melhores formas de governança, assegurando o reforço do processo participativo e responsabilizando todos os agentes ou actores intervenientes no processo que termina na tomada de decisão.

**Em sexto e último lugar**, os desafios da **sociedade de informação** que se vai construindo implicam a necessidade de adopção de regras estritas e de harmonização de critérios e procedimentos, a alteração dos modelos tradicionais de relação, comunicação e transacção e a construção de uma base de confiança sólida entre produção, comércio e consumo.

A valorização da ética, a adopção de um Código de Conduta de boas práticas entre Estados e entre produtores, nas suas relações de mercado, e o dever de formar e informar o consumidor são pontos essenciais deste exercício. Se é certo que compete aos Estados uma larga fatia de responsabilidades nesta matéria, também é bom que se esteja convicto que à indústria e às estruturas organizadas de cidadania cabe igual parcela de responsabilidade.

# **BACALHAU SALGADO SECO, EVOLUÇÃO DE UM PRODUTO TRADICIONAL FACE ÀS EXIGÊNCIAS DO CONSUMIDOR DO SÉC. XXI**

João Vieira

Pascoal & Filhos

Apartado 12 3834-908 Gafanha da Nazaré

---

## **A PESCA**

Os Portugueses terão chegado à Terra Nova em 1502 começando aí a pesca do bacalhau. Do século XVI ao final do XIX a pesca teve períodos de altos e baixos, sendo a produção irregular. O início do século XX traz um desenvolvimento contínuo baseado em alguma programação. Desenvolvem-se os métodos e as técnicas:

- Pesca à linha:
  - i) Lugre à vela;
  - ii) Navios motores.
- Pesca em rede de emalhar.
- Pesca de arrasto lateral.
- Pesca de arrasto pela popa.

Existem locais de captura distintos consoante a espécie:

- *Gadus morhua*: Noruega, Islândia e Canadá (NAFO)
- *Gadus macrocephalus*: Pacífico

## **A CONSERVAÇÃO POR SALGA**

A água é o elemento fundamental para a vida, mesmo para os microrganismos responsáveis pela decomposição do peixe. Reduzindo a percentagem de água no bacalhau (até 52%) diminui a velocidade de decomposição microbiana.

Durante a pesca longínqua os portugueses necessitavam de produtos que não fossem perecíveis e que aguentassem as longas viagens que demoravam por vezes mais de 3 meses de travessia pelo Atlântico, sendo o bacalhau salgado a bordo.

### **MELHORIA DAS CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO POR SECAGEM**

A secagem constitui um método adicional para reduzir a percentagem de água por evaporação.

O teor de humidade no bacalhau dependendo do produto e do mercado particular a que se destina, varia entre 35 a 47%.

### **O BACALHAU SALGADO NA CLASSE DOS PRODUTOS CURADOS**

O bacalhau salgado seco apresenta características organolépticas *sui generis*.

A sua textura deverá ser ligeiramente fibrosa, o sabor ligeiramente salgado, a cor branca/amarelada e o odor típico.

### **O BACALHAU SALGADO SECO – PRODUTO TRADICIONAL**

**MERCADO:** Um produto alimentar “âncora” na dieta portuguesa.

**CONSUMO:** Cerca de 70 000 toneladas (30 kg per capita).

#### **VANTAGENS:**

- Confeção variada
- Fácil conservação
- Alto valor nutritivo
  - 1 kg bacalhau salgado seco ↔ 3 kg peixe fresco
  - Produto rico em proteínas ( pobre em gorduras)

#### **DESVANTAGENS:**

- Planeamento da refeição (24 a 48 horas de antecedência)
- Demolha prévia do bacalhau (conhecimento do processo)
  - Dificuldade em obter postas com teor de sal uniforme e ao gosto do consumidor
- Congelação em arca frigorífica (diminuição da qualidade)

- Processo lento que, após descongelação, origina a perda de água que afecta a qualidade do peixe

## **AS TENDÊNCIAS DO MERCADO**

### **DECRÉSCIMO DO CONSUMO DEVIDO A:**

- Falta de conveniência (de carácter definitivo)
- Preço (de carácter temporário)
- Preço da matéria prima muito elevado devido à escassez

## **O BACALHAU DEMOLHADO ULTRACONGELADO COMO ALTERNATIVA PELA SUA CONVENIÊNCIA**

- Pronto a cozinhar
- Conveniência de escolha (postas ou lombos)

## **SUBSTITUIÇÃO DO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO: PRODUTO SALGADO *VERSUS* PRODUTO DEMOLHADO CONGELADO**

Associado à conveniência de um produto pronto a cozinhar, houve necessidade de introduzir no processo um método de conservação que mantivesse as características organolépticas do bacalhau demolhado tradicional; tendo-se optado pela congelação.

## **A QUESTÃO DA SEGURANÇA NO NOVO PROCESSO PRODUTIVO**

A PASCOAL & FILHOS, S.A. é uma empresa da área alimentar que se preocupa com a segurança e higiene dos seus produtos, de modo a responder adequadamente às exigências dos seus clientes e consumidores.

A implementação do HACCP, baseada na legislação vigente e nos sete princípios fundamentais do sistema, teve por objectivo a identificação e análise de pontos críticos nas diferentes fases dos processos produtivos e o estabelecimento de meios necessários para controlar esses pontos.

Nesse sentido, a empresa efectua um rigoroso controlo dos processos ao nível do binómio tempo/temperatura (nomeadamente nas etapas de demolha e congelação) por

forma a apresentar um produto tradicional, conveniente e seguro do ponto de vista alimentar.

## INVESTIR NA QUALIDADE

Humberto Carrapato

DOCA PESCA, PORTOS E LOTAS, S. A., Direcção de exploração

Av. Brasília, 1400 Lisboa

---

Em Portugal, a primeira venda de pescado fresco e refrigerado é feita, obrigatoriamente, em lota. À DOCAPESCA compete a gestão de todas as lotas do Continente; nos arquipélagos da Madeira e dos Açores esta competência é de outras instituições.

Nas lotas, processam-se as vendas em leilão de todo o pescado descarregado das embarcações que o capturam. A gestão integrada de todas as lotas por uma única entidade - a DOCAPESCA, permite garantir dados estatísticos fiáveis, indispensáveis para garantir a correcta gestão das quotas de algumas espécies e dos stocks existentes.

Actualmente, a DOCAPESCA tem uma estrutura descentralizada, composta por catorze Delegações (das quais dependem as lotas principais e os postos de vendagem) e pelos Serviços Centrais, em Lisboa. Está actualmente em curso um estudo de reestruturação da empresa que não afectará, no entanto, o princípio da estrutura descentralizada.

Em termos económicos, a DOCAPESCA, necessariamente, reflecte a actual situação de crise em que o sector das pescas está mergulhado.

Há já muitos anos que todas as vendas se processam por meios informatizados nas lotas principais, e até já em alguns postos de vendagem. Durante bastantes anos, as vendas eram contabilizadas nas sedes das Delegações e, posteriormente, aglutinadas na sede da empresa, em Lisboa. A partir de 2001, todas as vendas são contabilizadas em tempo real, sendo acessíveis todos os dados em todas as Delegações da empresa, simultânea e imediatamente. Foi um passo importante, apenas tornado possível após a implementação de um novo sistema informático de gestão da empresa.

A actividade da DOCAPESCA não se limita, no entanto, à primeira venda do pescado nas lotas. Efectivamente, tem sido preocupação da empresa intervir em áreas

complementares à venda em lota propriamente dita, no intuito de facilitar o desenvolvimento de todo o sector das pescas e, simultaneamente, garantir para si outros proveitos que lhe permitam minimizar os prejuízos provenientes da primeira venda de pescado e fazer face às difíceis condições económicas actuais.

Estão neste caso várias prestações de serviços que a DOCAPESCA já disponibiliza (nalguns casos há já bastante tempo) e que a empresa tem vindo a desenvolver e a melhorar, sempre com o objectivo de caminhar firmemente no sentido da melhoria da “QUALIDADE”.

No que respeita a prestações de serviço tradicionais que a DOCAPESCA já pratica há muito tempo, para além da primeira venda, destacamos:

- Em algumas delegações, a descarga das embarcações e a escolha e classificação do pescado, por espécies e tamanhos;
- Em alguns portos de pesca, a gestão de armazéns para comerciantes de pescado (UMAP - Unidades de Manipulação e Acondicionamento de Pescado) e para armadores, compreendendo todas as vertentes, desde a emissão de licenças de ocupação até à conservação e realização de obras de adaptação e melhoramentos;
- O abastecimento de água potável e o fornecimento de energia eléctrica às embarcações, quando solicitado;
- O financiamento de aquisições de novos equipamentos para a pesca e de melhorias a introduzir nas embarcações;
- Nas Delegações de Lisboa, Peniche e Matosinhos, a conservação de pescado congelado e, nas duas últimas, também a congelação de pescado em túnel. Para desenvolver esta actividade, estas Delegações dispõem de entrepostos frigoríficos dotados de várias câmaras de manutenção de congelados e, em Peniche e Matosinhos, de túneis de congelação. Brevemente, após a realização de obras que se encontram praticamente concluídas, os entrepostos de Peniche e de Matosinhos estarão em condições de obter os respectivos números de controlo veterinário definitivo, tornando-se duas das primeiras unidades frigoríficas a cumprir todos os requisitos legais nacionais

e comunitários. No entreposto frigorífico de Lisboa também estão em curso trabalhos que visam, numa primeira fase, a obtenção do número de controlo veterinário numa das suas maiores câmaras frigoríficas, ficando para uma segunda fase o licenciamento de todas as outras. Todos estes processos de licenciamento, com excepção da segunda fase do entreposto frigorífico de Lisboa, estarão concluídos antes do final do ano em curso.

No que respeita a novas prestações de serviço, a DOCAPESCA disponibiliza ainda, entre outros:

- Câmaras frigoríficas para conservação de pescado fresco, para permitir aos armadores e pescadores a armazenagem do pescado eventualmente descarregado fora das horas de leilão;
- Comercialização de gelo de qualidade para as embarcações e para os comerciantes de pescado, a preços sempre inferiores ou iguais aos da concorrência;
- Nas delegações de Lisboa e de Matosinhos, mercados de revenda, onde os comerciantes grossistas podem vender o seu pescado aos comerciantes de menor dimensão.

As condições higio-sanitárias das lotas (e, nos portos geridos pela DOCAPESCA, de todas as instalações existentes) têm vindo a ser consideradas a primeira prioridade para a empresa, nomeadamente em termos de investimento. Foram já concluídos todos os estudos das situações de todos os portos e decididas as medidas tendentes a modernizar, a curto prazo, os armazéns utilizados pelos comerciantes para a preparação das suas encomendas (UMAP), com vista a tornar possível a obtenção dos respectivos números de controlo veterinário, sendo partilhados, entre a DOCAPESCA e os utilizadores, os respectivos custos.

No que respeita às lotas, nos últimos quinze anos, a evolução qualitativa foi de tal modo importante, que não hesitamos em afirmar que estas infra-estruturas sofreram uma autêntica “revolução”, quer ao nível dos procedimentos, quer ao nível das

instalações e equipamentos disponíveis em todas elas. Ao nível dos procedimentos, podemos afirmar que, hoje, tudo é completamente transparente e a informatização é uma realidade constante em todas as lotas importantes, até em alguns pequenos postos de vendagem. Ao nível das instalações, hoje todas as lotas importantes são novas (exceptua-se a lota de Lisboa, que apenas foi remodelada, dado que o edifício onde está instalada já tinha muito boas condições) e o mesmo começa a acontecer com alguns pequenos postos de vendagem, onde estão em curso ou em vias de se iniciar obras de beneficiação e de construção. Finalmente, ao nível dos equipamentos, todas estão dotadas de modernos meios (eléctricos) para elevação e movimentação de cargas e fábricas de gelo, entre outros.

Podemos, pois, afirmar que todas as lotas importantes estão hoje devidamente licenciadas, e existe um conjunto de outras, muito menos importantes, onde se estão a criar as condições para, num prazo que prevemos relativamente curto, se possa solicitar o respectivo licenciamento às entidades competentes. A título de exemplo, referimos que as lotas que já estão devidamente licenciadas foram, em 2000, responsáveis pela primeira venda de 94% do pescado fresco transaccionado em lota; apenas 6% do pescado fresco, todo proveniente de pesca local (capturado horas antes da descarga), é vendido em instalações que ainda não estão dotadas de número de controlo veterinário e, ainda assim, acreditamos que, durante o ano de 2002, esta percentagem se vai reduzir ainda mais.

Sobre esta questão, não podemos deixar de afirmar que todas as incorrecções que, por vezes acontecem, derivam, em grande parte, de alguma legislação inadequada existente (por exemplo, a atribuição da responsabilidade da classificação de pescado a entidades que não são posteriormente responsabilizadas).

A partir de 1 de Abril de 1999, foi progressivamente implementada, em todas as lotas licenciadas, a inspecção hígio-sanitária do pescado, existindo desde 2000, em permanência, uma equipa de inspecção hígio-sanitária, dependente da Direcção Geral de Veterinária, que acompanha todas as operações anteriores à venda e que inspeciona todo o pescado, antes de se proceder ao leilão. A qualidade do pescado transaccionado em lota está, assim, totalmente garantida.

Em consequência da prioridade dada aos investimentos na área da “Qualidade”, a DOCAPESCA investiu, no ano de 2000, cerca de 100.000 contos, e investirá, até final de 2001, mais de 500.000 contos nesta área. Estes números são bons indicadores da importância atribuída ao vector “Qualidade” e o esforço financeiro que este representa.

A DOCAPESCA está agora empenhada em mais uma “batalha” pela qualidade dos produtos comercializados sob sua responsabilidade - trata-se da rotulagem do pescado comercializado em lota, por forma a garantir uma correcta informação ao consumidor, sobre a sua origem e qualidade.

Para tal, a DOCAPESCA iniciou em 2000 os estudos necessários e vai antecipar-se à entrada em vigor da directiva comunitária que vai tornar obrigatória a rotulagem do pescado, em 1 de Janeiro de 2002, prevendo-se que a informação ao consumidor entre em funcionamento regular antes do final do corrente ano.

Entretanto, no princípio de 2001, entrou em funcionamento experimental e para os comerciantes que o requeiram, um rótulo simples para acompanhamento de pescado para exportação ou troca intracomunitária, que, no entanto, já obedece à regulamentação comunitária que entrará em vigor em 01 de Janeiro de 2002, e que até contém muito mais informação que a que vai ser tornada obrigatória. A partir do terceiro trimestre de 2001 este rótulo passou a estar disponível em todas as lotas licenciadas.

Finalmente, admitimos que em 2002, poderá entrar em vigor um rótulo muito mais completo e elaborado, que possa atestar a origem e a qualidade do pescado que o ostentar. Para tal, a DOCAPESCA iniciará, oportunamente, os contactos necessários, nomeadamente com as Organizações de Produtores que, eventualmente, se mostrem interessadas na certificação dos seus produtos, para que seja possível a implementação deste tipo de rótulo, já relativamente conhecido em outros produtos alimentares.



## **PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE PESCADO CONGELADO: EVOLUÇÃO RECENTE E PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Manuel Tarré – Associação da Indústria Alimentar pelo Frio (ALIF)

Largo de São Sebastião da Pedreira, nº 31, 1050-205 Lisboa

---

O sector dos congelados é, sem qualquer dúvida, o mais recente e também o mais dinâmico de todo o conjunto da actividade transformadora de produtos da pesca.

Pode afirmar-se, com segurança, que foi a partir da segunda metade da década de 80 que se passou a assistir a um rápido crescimento da produção e do número de empresas, sendo certo que, simultaneamente, muitas outras cessaram a actividade.

É nessa época que se inicia um longo e difícil processo de reestruturação e reconversão, ainda não concluído, visando a modernização das unidades, a melhoria da qualidade dos artigos processados e, conseqüentemente, a obtenção de uma maior competitividade.

Na sequência da adesão de Portugal à Comunidade Europeia, em 1986, iniciaram-se processos de licenciamento dos estabelecimentos que muito contribuíram para assegurar a estabilidade e confiança no sector.

Na viragem a que nos referimos, assumiram inegável importância os financiamentos recebidos pela generalidade das empresas ao abrigo das disposições dos Regulamentos (CEE) n.º 355/77 e Regulamento (CEE) n.º 4042/89.

A década de 90, bem como a recentemente iniciada, tem assistido a uma concentração do sector em estabelecimentos industriais de maior dimensão, procurando-se economias de escala e de capacidade de internacionalização, do mesmo passo que os níveis tecnológicos e de controle de qualidade têm registado um enorme progresso, podendo dizer-se que as empresas nacionais de topo fornecem produtos de indiscutível qualidade e segurança, que nada ficam a dever aos processados por empresas estrangeiras que comercializam em Portugal.

O consumo de pescado *per capita* em Portugal, como é sabido, assume valores

muito significativos, ocupando o primeiro lugar no conjunto dos países da UE e das primeiras relativamente a todos os países do mundo.

Relativamente a este consumo, o de pescado congelado tem assumido uma posição crescente, tendência que não se deverá alterar. Na verdade, cada vez mais o consumidor necessita evitar perdas de tempo na organização e preparação dos alimentos, sendo certo que já é reconhecido manterem estes toda a qualidade e teor nutritivo que são característicos de um produto fresco.

Desde que estejam asseguradas temperaturas estáveis (-18° C) e a protecção do alimento da acção directa do frio, a congelação dos alimentos tem a importantíssima particularidade de permitir um longo período de armazenagem.

Todo este circunstancialismo levou os produtos congelados da pesca a ocupar um lugar de destaque como artigos de grande consumo e com extraordinária adequação à vida moderna, destacando-se o posteadado, os filetes, os cefalópodes e as preparações alimentares.

Quanto a vendas no mercado externo, há que assinalar que diversas empresas já se encontram viradas para o exigente mercado externo, promovendo transacções em boa parte do mundo.

É de salientar que é previsível a expansão desta actividade exportadora, encontrando-se as empresas a preparar-se para tal desafio.

A participação de uma significativa representação portuguesa nos mais importantes certames europeus nesta área, como a E.S.E. de Bruxelas e a CONXEMAR de Vigo, que pela primeira vez ocorreu em 2001 são mostras desse ânimo, desse desejo de alargar a actividade.

Esse punhado de empresas tem o confessado objectivo de conquistar novos mercados, novos clientes, novos fornecedores e novos canais de distribuição.

Vários problemas, no entanto, se colocam aos industriais do sector, destacando-se a falta de clareza na concorrência, por parte dos agentes que violam, por sistema, as regras estabelecidas muitas vezes nem se encontrando legalizadas ou operando em Portugal a partir do exterior.

A actuação das entidades fiscalizadoras e do sistema punitivo tem-se revelado

bem pouco eficaz, para o que contribui, decisivamente, o amontoado de legislação comunitária e nacional, com frequência pouco clara e contraditória, amontoado esse que não pára de crescer.

Do ponto de vista dos órgãos de fiscalização é ainda uma incógnita o sentido da actuação da recém criada Agência da Qualidade Alimentar, de todo o modo para as empresas da fileira do pescado o não estar previsto, desde logo, um lugar que seja para o seu representante no Conselho Nacional, é um mau princípio...

Traçada muito sumariamente a evolução recente do sector dos congelados pode-se concluir, com segurança, que o futuro é prometededor.

Terá de se apostar, no entanto, fortemente na capacidade de resposta das empresas no que concerne à inovação e diversificação, fundamentalmente, isto no respeitante ao próprio produto mas também quanto ao mercado, havendo que tomar iniciativas.

O dinamismo terá de renovar-se sempre.



## FUTURO DA INDÚSTRIA DA PESCA

António Oliveira

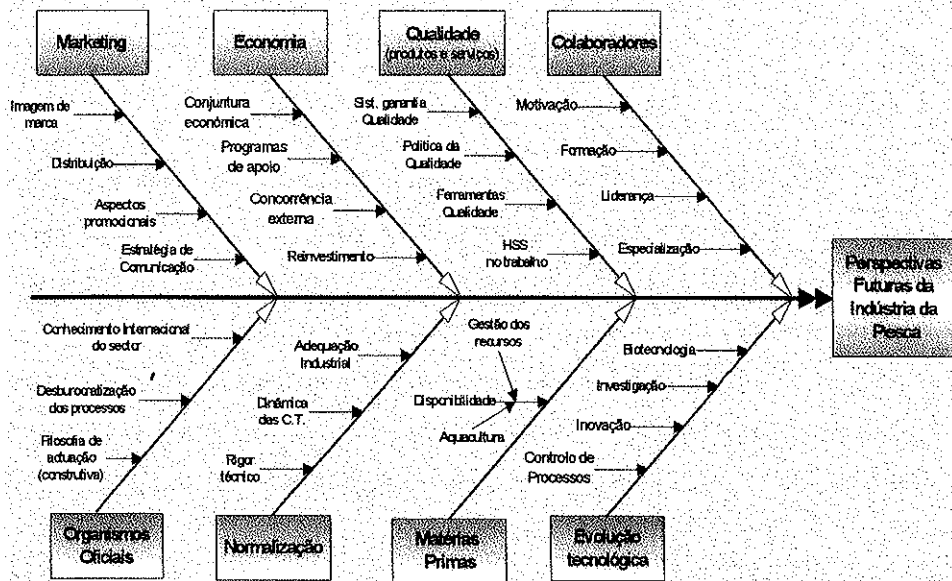
Grupo Miradouro

---

Seria sem dúvida extremamente interessante e gratificante poder contribuir para o tema desta mesa, propondo à plateia a elaboração conjunta de um diagrama casualmente designado “em espinha de peixe” (também designado “causa-efeito”), com o objectivo de tentar listar, ordenadamente, os principais factores (ou causas) que condicionarão o futuro da indústria da pesca (efeito). Auferiríamos assim, neste exercício, da experiência e do vasto conhecimento pluridisciplinar aqui reunido e as conclusões a extrair seriam, com certeza, muito abrangentes e enriquecedoras para todos.

Na impossibilidade de o fazer no tempo disponível, sintetiza-se seguidamente o que poderia ser o ponto de partida para a génese desse diagrama, no qual se encontram listados os principais factores que condicionarão, de forma mais ou menos acentuada, o futuro da indústria da pesca. De igual forma se perspectivam as que poderão ser as principais características de sucesso desta indústria, no futuro.

## Diagrama em espinha de peixe (Causa-Efeito)



## Principais Características de Sucesso da Indústria da Pesca, no futuro:

- Fortemente orientada para a satisfação das necessidades implícitas e explícitas dos clientes
- Com uma forte integração vertical com fornecedores de matérias primas
- Com uma eficiente estrutura de distribuição (até ao cliente)
- Com uma forte componente de comunicação
- Com um eficiente serviço de apoio ao cliente
- Com uma forte cultura organizacional

- Com uma fortíssima envolvente humana
- Flexível e com grande capacidade de inovação
- Com sistemas rápidos e fiáveis de avaliação da qualidade
- Com processos produtivos tecnologicamente evoluídos



## PERSPECTIVAS FUTURAS DO SECTOR DAS CONSERVAS DE PEIXE

Castro e Melo

Associação Nacional dos Industriais de Conservas de Peixe (ANICP)

R. Conde S. Salvador 352 – 6º Salas 26/30, Apartado 2006, 4451-9901 Matosinhos

---

Antes de mais queremos agradecer ao IPIMAR a oportunidade que nos dá para podermos falar um pouco da indústria de conservas de peixe e do seu futuro, neste fórum.

E começaremos por dizer que a indústria conserveira é um dos sectores mais antigos da economia portuguesa - com mais de século e meio de existência - que exporta uma fatia considerável dos seus produtos e que adquire entre 40% a 50% das capturas à frota do cerco.

As conservas de sardinha da espécie *Sardina pilchardus* (Walbaum) são o produto por excelência desta indústria, sendo o mais produzido em termos de quantidade, seguindo-se-lhe as conservas de atum, as conservas de cavala, as anchovas e outros produtos com menor expressão.

Com base em cada uma daquelas matérias primas (sardinha, atum, cavala, biqueirão, polvo, lulas, bacalhau, mexilhão, truta, etc.) a indústria conserveira fabrica uma gama imensa de produtos, muitos deles, aliás, desconhecidos da generalidade dos consumidores e, nomeadamente, no mercado interno português.

A exportação é o principal destino das nossas conservas, sendo a única indústria do sector das pescas que apresenta um saldo positivo na balança comercial.

O mercado interno também tem uma importância considerável, tendo-se até verificado algum crescimento, estando hoje fortemente concentrado na grande distribuição.

No que respeita ao aprovisionamento do sector há que ter em atenção a importância decisiva do segmento da frota do cerco no abastecimento da indústria de

conservas de peixe e vice-versa também, o papel decisivo da indústria conserveira no escoamento dos produtos da pesca, nomeadamente da sardinha.

## QUALIDADE DO PESCADO NA VENDA AO CONSUMIDOR

Nuno Lima Dias

DECO, PROTESTE

R. Artilharia 1, 79, 4º, Lisboa

---

Sendo os portugueses os maiores consumidores de pescado na União Europeia, a qualidade deste alimento é um tema que muito interessa às associações que os representam. A DECO-PROTESTE realiza, regularmente, estudos ou testes comparativos a pescado, que publica nas suas revistas. Nas páginas seguintes fazemos uma breve abordagem de como preparamos os nossos testes e apresentamos alguns dos resultados obtidos.

### **Como preparamos um teste comparativo?**

Regularmente são realizados inquéritos que nos permitem conhecer os temas que os consumidores gostariam de ver publicados. Também consultamos os consumidores após publicação para saber se a forma como abordamos os assuntos vai de encontro às suas expectativas. A informação que publicamos nas nossas revistas é fruto de uma colaboração estreita entre várias equipas, tendo cada uma a sua função. Assim, antes de se realizar um teste, o departamento de estudos de mercado, o departamento técnico e a redacção reúnem-se. Começamos pelos estudos de mercado.

- **Estudos de mercado**

Os analistas de mercado têm por missão verificar o que os consumidores encontram nas lojas quando o teste for publicado. Graças a um estudo aprofundado do mercado, esta equipa esforça-se por abranger o maior número possível de produtos e/ou estabelecimentos. Uma vez definida a amostra, os nossos compradores encarregam-se de comprar os produtos de forma anónima, tal como faria o

consumidor. O objectivo é obter o produto nas mesmas condições de outra pessoa qualquer que se deslocasse ao estabelecimento. Recusamos quaisquer amostras gratuitas. Desta equipa faz igualmente parte uma vasta rede de inquiridores que faz inquéritos e mais tarde recolhe preços no terreno.

- **Departamento técnico**

Enquanto o analista de mercado prossegue o seu trabalho, o técnico encarregue do *dossier* prepara o seu esquema de teste. Este esquema é a lista de perguntas às quais o laboratório deverá responder, a definição dos métodos usados e as normas e critérios utilizados para interpretar os resultados. Não temos quaisquer laboratórios nas nossas instalações. Recorremos a laboratórios nacionais ou estrangeiro, com independência em relação aos fabricantes e de competência indiscutível. Uma vez terminadas as análises e provas (realizadas de forma anónima), o técnico interpreta os resultados e elabora um relatório técnico. O técnico tem igualmente por missão enviar os resultados aos responsáveis pelas marcas e/ou estabelecimentos, analisar as respostas obtidas e julgar a necessidade de serem ou não realizadas novas análises.

- **A redacção**

De nada serve um relatório realizado segundo os mais rigorosos critérios e com o maior detalhe, se não for compreensível para a generalidade dos consumidores. Tomar a mensagem acessível e prática, separar o essencial do acessório, eis o papel que assume a nossa equipa de jornalistas, devidamente acompanhada por técnicos. Nas nossas publicações recusamos qualquer publicidade, o que nos permite reivindicar a nossa independência. Mas esta exigência tem o seu preço. É unicamente graças às cotas dos associados, à colaboração com outras organizações europeias e subsídios comunitários conferidos a alguns estudos, que podemos informar e defender os consumidores.

- **Depois da publicação**

O nosso objectivo não se prende apenas com a publicação de informações simples e objectivas, embora elas também sejam úteis. Para dar a conhecer a nossa actividade, para chamar a atenção dos consumidores e para fazer pressão sobre os poderes públicos, realizamos com regularidade comunicados e conferências de imprensa. Por outro lado, representamos os consumidores em diversas instâncias nacionais e europeias. Exemplo: a intervenção junto do Governo e do Parlamento e a participação no BEUC (organismo europeu das organizações de consumidores). Esta actividade visa dar a conhecer as reivindicações dos consumidores.

**Quais os testes realizados e os resultados obtidos?**

Os resultados dos testes realizados nos últimos 10 anos são apresentados nos quadros 1 a 9. Nestes apenas salientamos alguns dos vários parâmetros analisados, indicando para cada caso, segundo critérios utilizados por nós, as percentagens de amostras que obtiveram uma apreciação negativa.

- **Teste a pescada congelada**

*Ano de publicação: 1993*

*Amostragem: 5 marcas de pescada em posta nº 2; 5 marcas de pescada em posta nº 3; pescada inteira a granel em 16 pontos de venda*

*Quadro 1. Resultados*

| Produto              | Amostras com apreciação negativa (%) |                  |          |               |
|----------------------|--------------------------------------|------------------|----------|---------------|
|                      | Peso líquido                         | Água de vidragem | Frescura | Microbiologia |
| Pescada pré-embalada | 27                                   | 10               | 0        | 0             |
| Pescada a granel     | -                                    | 50               | 0        | 0             |

- **Teste a camarão congelado**

*Ano de publicação:* 1994

*Amostragem:* 13 marcas de camarão inteiro; 8 marcas de miolo inteiro a granel em 11 pontos de venda

*Quadro 2. Resultados*

| Produto                       | Amostras com apreciação negativa (%) |                  |          |               |          |
|-------------------------------|--------------------------------------|------------------|----------|---------------|----------|
|                               | Peso líquido                         | Água de vidragem | Frescura | Microbiologia | Aditivos |
| Camarão inteiro pré-embalado  | 38                                   | 15               | 0        | 0             | 0        |
| Miolo de camarão pré-embalado | 75                                   | 75               | 0        | 0             | 0        |
| Camarão a granel              | -                                    | 27               | 0        | 0             | 0        |

- **Teste a amêijoas e berbigão**

*Ano de publicação:* 1995

*Amostragem:* 3 marcas de amêijoas e 1 de berbigão, com casca congelados; 6 marcas de miolo de amêijoas e 7 de miolo de berbigão; amêijoas e berbigão vivos em 6 pontos de venda.

*Quadro 3. Resultados*

| Produto                                    | Amostras com apreciação negativa (%) |                  |          |               |           |                 |
|--|--------------------------------------|------------------|----------|---------------|-----------|-----------------|
|  | Peso líquido                         | Água de vidragem | Frescura | Microbiologia | DSP e PSP | Bivalves mortos |
| Amêijoas e berbigão inteiros pré-embalados | 75                                   | 50               | 0        | 0             | 25        | -               |
| Miolo de amêijoas e berbigão pré-embalados | 38                                   | 46               | 0        | 15            | 15        | -               |
| Amêijoas e berbigão vivos                  | -                                    | -                | 17       | 83            | 17        | 34              |

- **Teste a peixe fresco e congelado**

*Ano de publicação: 1995*

*Amostragem:* 10 marcas de filetes de pescada; peixe inteiro fresco (pescada, carapau e peixe espada) em 50 pontos de venda.

*Quadro 4. Resultados*

| Produto                          | Amostras com apreciação negativa (%) |                  |          |               |          |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------------|----------|---------------|----------|
|                                  | Peso Líquido                         | Água de vidragem | Frescura | Microbiologia | Espinhas |
| Filetes de pescada pré-embalados | 50                                   | 20               | 10       | 0             | 10       |
| Peixe fresco                     | -                                    | -                | 1        | 43            | -        |

- **Teste a sardinha em lata**

*Ano de publicação: 1997*

*Amostragem:* 12 marcas de sardinhas em óleo; 12 marcas de sardinhas em tomate.

*Quadro 5. Resultados*

| Produto                    | Amostras com apreciação negativa (%) |                   |          |               |     |
|----------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------|---------------|-----|
|                            | Exame da embalagem                   | Exame do conteúdo | Frescura | Microbiologia | Sal |
| Sardinhas em óleo e tomate | 12                                   | 0                 | 0        | 29            | 8   |

- **Teste a bacalhau**

*Ano de publicação: 1998*

*Amostragem:* 4 marcas de bacalhau salgado seco em postas; 6 marcas de bacalhau salgado seco desfiado; 3 marcas de bacalhau demolido ultracongelado; bacalhau crescido inteiro a granel em 22 pontos de venda.

*Quadro 6. Resultados*

| Produto               | Amostras com apreciação negativa (%) |                  |          |     |                        |                         |               |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------|----------|-----|------------------------|-------------------------|---------------|
|                       | Peso líquido                         | Água de vidragem | Humidade | Sal | Defeitos de preparação | Defeitos de conservação | Microbiologia |
| Bacalhau Salgado Seco | 0                                    | -                | 22       | 22  | 6                      | 12                      | 34            |
| Bacalhau demolido     | 67                                   | 33               | 0        | 0   | -                      | -                       | 0             |

- **Atum em conserva**

*Ano de publicação: 1999*

*Amostragem: 19 marcas de atum em óleo vegetal.*

*Quadro 7. Resultados*

| Produto                  | Amostras com apreciação negativa (%) |                   |          |               |     |               |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------|---------------|-----|---------------|
|                          | Exame da embalagem                   | Exame do conteúdo | Frescura | Microbiologia | Sal | BADGE e BFDGE |
| Atum em posta e sangacho | 27                                   | 0                 | 0        | 0             | 37  | 94            |

- **Amêijoa**

*Ano de publicação: 2000*

*Amostragem: 5 marcas de amêijoa com casca congelada; 8 marcas de miolo de amêijoa congelada; amêijoa viva em 12 pontos de venda.*

*Quadro 8. Resultados*

| Produto                       | Amostras com apreciação negativa (%) |                  |          |               |                |                 |
|-------------------------------|--------------------------------------|------------------|----------|---------------|----------------|-----------------|
|                               | Peso líquido                         | Água de vidragem | Frescura | Microbiologia | DSP, PSP e ASP | Amêijoas mortas |
| Amêijoa inteira pré-embalados | 40                                   | 60               | 0        | 25            | 0              | -               |
| Miolo de amêijoa pré-embalado | 50                                   | 50               | 0        | 20            | 0              | -               |
| Amêijoa viva                  | -                                    | -                | 17       | 75            | 8              | 33              |

- Truta e dourada

Ano de publicação: 2001

Amostragem: truta e dourada fresca em 30 pontos de venda.

Quadro 9. Resultados

| Produto                  | Amostras com apreciação negativa (%) |               |            |          |              |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------|------------|----------|--------------|
|                          | Frescura                             | Microbiologia | Fungicidas | Hormonas | Antibióticos |
| Truta e dourada a granel | 0                                    | 0             | 0          | 0        | 0            |

#### Que conclusões tirar?

- No peso líquido do pescado congelado têm subsistido, ao longo dos anos, numerosos problemas. O peso indicado na embalagem frequentemente não é respeitado: uma boa parte da água de vidragem não é descontada e os desvios para menos chegam a atingir os 30%.
- Com alguma frequência, a água de vidragem não está presente em quantidade suficiente ou, pelo contrário, é excessiva.
- Em geral, o pescado apresenta bons índices de frescura.
- A qualidade microbiológica:
  - ✓ no pescado congelado é geralmente boa, apesar de no miolo de bivalves surgirem contagens elevadas de mesófilos e *S. aureus*;
  - ✓ no pescado fresco aparecem igualmente contagens elevadas de mesófilos, estando estas normalmente associadas a temperaturas elevadas nos locais de venda;
  - ✓ nos bivalves vivos surgem números altos de coliformes fecais, *S. aureus* e *Vibrio alginolyticus*;
  - ✓ no bacalhau salgado seco, encontram-se quantidades significativas de bolores

- e leveduras;
- ✓ no teste de sardinhas em lata tivemos oportunidade de encontrar problemas de estabilidade e esterilidade.
  
  - O problema das biotoxinas (DSP e PSP) encontradas em 1995, parecem ter-se minimizado, de acordo com os resultados do nosso último teste.
  - No teste realizado a atum em conserva encontramos quase sempre resíduos de **BADGE** - éter bis (2,3 - epoxipropílico) de bisfenol A e **BFDGE** - éter bis (2,3 - epoxipropílico) de bisfenol F e derivados, sobre os quais existem suspeitas de serem cancerígenos.

## A PESCANOVA: SITUAÇÃO ACTUAL E PERSPECTIVAS

Carlos Henriques

PESCANOVA

Docapesca Armazém 2, Av. Brasília, 1400 Lisboa

---

- **AGRADECER**
  
- Compromisso de responsabilidade social da Pescanova para com os clientes, o público e as autoridades, no tocante a segurança e controlo de qualidade.
- A importância da segurança alimentar para todos. Para as Empresas, tal como para as pessoas individualmente, representa proteger o valor mais apreciado de uma Companhia, que é a sua credibilidade e a sua reputação.
- A evolução do Pescado congelado em Portugal:
  - a) a mudança de atitude do consumidor nos últimos 15 anos, de peixe barato (antigamente só na falta de pescado fresco...), para qualidade e conveniência;
  - b) O mercado de ultracongelados, que continua a crescer 5% ao ano em volume e a influência da adesão à União Europeia;
  - c) O contributo da Pescanova para o dinamismo de mercado, pela qualidade/ pela inovação/ pela educação (formas de uso, espécies, bancos de pesca /origem, campanhas publicitárias institucionais) e prestígio (somos uma referência).
- Uma Indústria e um Sector no seu conjunto, mais sensível à qualidade. Exemplo ISO, que no caso do Grupo Pescanova temos implementados, não só o HACCP desde 1993, como actualmente a ISO 9001 (versão ano 2000) e a ISO 14000 do Meio Ambiente. As primeiras Normas de Qualidade da Pescanova datam do início dos anos 60.
- Envolvente:

Um consumidor cada vez mais preocupado com a saúde

Um enquadramento legal cada vez mais exigente

Uma crescente capacidade de influência dos meios de comunicação e das associações de consumidores

- A importância da segurança alimentar para o consumidor, mais ainda com as recentes experiências das carnes, em mercados sem fronteira e onde o produtor e o consumidor são impessoais. Mas evitando os alarmes sociais, quando não sejam necessários.
- Em Portugal, poderemos e deveremos melhorar, no tocante à qualidade, em conjunto: Autoridades, Consumidores, Comércio e Indústria:
  - a) HACCP - sua implantação na Indústria Nacional. Desde 1995 que é obrigatório, tendo sido reforçada durante o ano 2000 pela Comunidade Europeia, a necessidade de validar pelas Autoridades locais o seu seguimento pela Indústria;
  - b) Controlo do Peso Líquido Escorrido - em tudo, mas em especial nos individuais e no marisco - Decreto-Lei 560/99;
  - c) Controlo de temperaturas em todo o circuito, nos camiões, nas descargas, nas lojas, vital para a segurança e qualidade.

Esta aposta nas melhorias vai favorecer o consumo e o comércio Internacional.

- No tocante a inovação, temos:
  - a) A adaptação de todos os produtos ao Microondas e à conveniência, não perdendo o sabor;
  - b) Precisamos de apoio de todas as Entidades, para a introdução de novas espécies, que estão a ser colocadas no mercado pela primeira vez e que temos 2 alternativas:
    - i- serem comercializadas e consumidas como outras espécies "com que se parecem";
    - ii- acrescentar valor ao mercado, comercializando-as com os seus novas designações e apresentações, o que irá incrementar o consumo através desta oferta mais alargada (mais variedade).

## PUBLICAÇÕES AVULSAS DO IPIMAR

### 1994

- Nº 1 - SEMINÁRIO SOBRE RECURSOS HALIÉUTICOS, AMBIENTE, AQUACULTURA, E QUALIDADE DO PESCADOR DA PENÍNSULA DE SETÚBAL - Setúbal, 26 - 27 Abril 1994

### 1996

- Nº 2 - CATÁLOGO DOS PEIXES DO ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE - F. Reiner

### 2000

- Nº 3 - MANUAL SOBRE DOENÇAS DE PEIXES ÓSSEOS - Jaime Menezes
- Nº 4 - CLASSIFICAÇÃO DE ARTES E MÉTODOS DE PESCA - Fernando Rui Rebordão
- Nº 5 - CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DAS ARTES DE PESCA UTILIZADAS NO RIO MINHO - Rogélia Martins; Fernando Rui Rebordão; Miguel Carneiro
- Nº 6 - CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DAS ARTES DE PESCA UTILIZADAS NO RIO GUADIANA - Miguel Carneiro; Fernando Rui Rebordão; Rogélia Martins

### 2002

- Nº 7 - CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DAS ARTES DE PESCA UTILIZADAS NO RIO LIMA - Rogélia Martins; Fernando Rui Rebordão; Miguel Carneiro
- Nº 8 - CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DAS ARTES DE PESCA UTILIZADAS NA RIA DE AVEIRO - Miguel Carneiro; Rogélia Martins; Fernando Rui Rebordão; Manuel Sobral



**IPIMAR**  
Instituto de Investigação  
das Pescas e do Mar