

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL**

PRISCILA FIRMINO ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO PRAZO DE VIDA COMERCIAL DO ATUM
(*Thunnus atlanticus*) ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO**

**Niterói / RJ
2006**

PRISCILA FIRMINO ANDRADE

AVALIAÇÃO DO PRAZO DE VIDA COMERCIAL DO ATUM (*Thunnus atlanticus*) ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADORA: PROF^a.Dr^a. ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO.

CO-ORIENTADORA: PROF^a.Dr^a. MÔNICA QUEIROZ DE FREITAS.

Niterói/RJ

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

A 553 Andrade, Priscila Firmino

Prazo de vida comercial do atum (*Thunnus atlanticus*) armazenado sob refrigeração / Priscila Firmino Andrade. – Niterói: [s.n.], 2006.

97 f.

Dissertação (mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, 2006.

Orientadora: Eliane Teixeira Mársico.

1. Atum. 2. Análise Sensorial. 3. PH. 4. Atum - armazenamento

I. Título

CDD 664.94

PRISCILA FIRMINO ANDRADE

AVALIAÇÃO DO PRAZO DE VIDA COMERCIAL DO ATUM (*Thunnus atlanticus*)
ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 24 de Março de 2006.

BANCA EXAMINADORA

PROF^a.Dr^a. Eliane Teixeira Mársico - Orientadora.
Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

PROF^a.Dr^a. Mônica Queiroz de Freitas - Co-orientadora.
Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

PROF^a.Dr^a. Valéria Moura de Oliveira.
Instituto de Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PROF. Dr. Robson Maia Franco.
Faculdade de Veterinária - Universidade Federal Fluminense.

Niterói
2006

Dedicatória

Aos meus pais, Arinos dos Santos Andrade e Iolanda Firmino, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo. Com certeza sem vocês eu não seria quem sou e nem chegaria onde estou.

Ao meu namorado, Agostinho Sergio Scofano, pela amizade, companheirismo e pelos momentos de alegria. Sem você o mundo seria menos colorido e menos feliz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e pela oportunidade de crescimento espiritual, profissional e pessoal.

Aos meus queridos pais, Arinos e Iolanda, pela presença fundamental em toda a minha caminhada e, principalmente, pelo amor e respeito.

Ao meu namorado, Agostinho, pelo amor, companherismo e por todo o incentivo.

À minha adorada avó, Olívia Maria da Conceição Firmino e aos meus padrinhos, Moisés Alves Cezar e Guiomar Alves Cezar pelo amor e zelo.

Aos meus queridos amigos Flávia Alencar de Oliveira, Priscila Nóbrega dos Santos, Vânia Saade Vezone, Carlos Coary, Marcos Telles de Miranda Filho, Marcos Vinícius da Rocha Lopes por compartilharem comigo etapas tão importantes.

À Tatiana Pereira Cardoso, querida amiga e companheira de jornada acadêmica, pela sua valiosa ajuda ao longo deste trabalho. Obrigada por todos os momentos alegres compartilhados e por todo carinho e apoio demonstrados ao longo desses anos de convivência.

Aos amigos Vinícius Modesto, Renata Medeiros e Micheli Ferreira e aos novos amigos conquistados neste processo: Edvaldo Sampaio de Almeida Filho, Valéria Moura de Oliveira, Fernanda Martinez, Davi Oliveira, Patrícia Ridell e Lucimar Martins.

Aos “meus anjinhos” Júlia Vezone Coary e Flora Scofano que alegram e iluminam meus caminhos. Vocês são um presente de Deus!

À Jade, minha gatinha rebelde, pela alegre convivência e por todo o carinho.

À minha orientadora, Prof^a.Dr^a. Eliane Teixeira Mársico, pela sugestão do tema deste trabalho, pela amizade, pelos momentos de reflexão, pelo estímulo e pela paciência ao longo desses dois anos.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco pelos valiosos ensinamentos e pelo auxílio fundamental na elaboração das análises bacteriológicas.

À Prof^a.Dr^a. Mônica Queiroz de Freitas pela colaboração imprescindível na realização das análises sensoriais e na estatística do trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, pela oportunidade.

Aos funcionários da coordenação deste programa, Dráusio de Paiva Ferreira e José Luís Gomes de Azevedo, pela amizade e pela ajuda.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Fluminense e aos colegas do curso.

Agradeço também ao Carlos Frederico Guimarães, pelo suporte técnico no Laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos e Cristiane Platte pela ajuda nas análises bacteriológicas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 10

LISTA DE TABELAS, p. 11

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 13

RESUMO, p. 14

ABSTRACT, p. 15

1 INTRODUÇÃO, p. 16

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 19

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ATUM, p. 19

2.2 QUALIDADE E DETERIORAÇÃO DO PESCADO RESFRIADO, p. 21

2.2.1 Alterações químicas do pescado, p. 22

2.2.1.1 OTMA, TMA e formação das Bases Voláteis Totais, p. 23

2.2.1.2 pH, p. 29

2.2.1.3 Histamina e cadaverina, p. 31

2.2.2 Alteração bacteriológica do pescado, p. 35

2.2.3 Análise sensorial, p. 39

3 MATERIAL E MÉTODOS, p 44

3.1 MATERIAL p. 44

3.1.1 Reagentes utilizados, p. 44

3.1.2 Equipamentos e materiais de uso geral, p. 45

3.1.3 Material biológico, p. 46

3.2 MÉTODOS, p. 46

3.2.1 Estratégia experimental, p. 46

3.2.2 Preparo das amostras, p. 47

3.2.3 Análises físico-químicas, p. 47

3.2.3.1 Avaliação do teor de Óxido de Trimetilamina, p. 48

3.2.3.2 Avaliação da produção de Bases Voláteis Totais, p. 49

3.2.3.3 Avaliação da produção de Trimetilamina, p. 50

3.2.3.4 Avaliação do pH, p. 50

3.2.3.5 Avaliação da produção de histamina, p. 51

3.2.3.6 Avaliação da produção de cadaverina, p. 52

3.2.3.7 Avaliação do teor de umidade, p. 52

3.2.4 Análises bacteriológicas, p. 53

3.2.4.1 Preparo das soluções e meios de cultura, p. 53

3.2.4.2 Cuidados higiênico-sanitários, p. 53

3.2.4.3 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, p. 53

3.2.4.4 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotólicas, p. 54

3.2.5 Análise sensorial, p. 54

3.2.5.1 Preparo das amostras, p. 55

3.2.5.2 Procedimento adotado, p. 55

3.2.5.3 Análise dos resultados, p. 57

3.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO, p. 57

4 RESULTADOS, p. 59

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 59

4.1.1 OTMA, p. 59

4.1.2 BVT, p. 60

4.1.3 TMA, p. 62

4.1.4 pH, p. 63

4.1.5 Histamina e cadaverina, p. 64

4.1.6 Umidade, p. 66

4.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 66

4.2.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotólicas (CBHAP), p. 66

4.3 ANÁLISE SENSORIAL, p. 69

5 DISCUSSÃO, p. 71

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 71

5.1.1 OTMA, p. 71

5.1.2 BVT, p. 72

5.1.3 TMA, p. 74

5.1.4 pH, p. 76

5.1.5 Histamina e cadaverina, p. 77

5.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 80

5.2.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicrotróficas (CBHAP), p. 80

5.3 ANÁLISE SENSORIAL, p. 81

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 85

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. p. 87

8 APÊNDICES, p. 96

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1 Consumo de pescado marinho no ano de 2001, f.21.
- Fig. 2 Exemplar de atum (*Thunnus atlanticus*) utilizado neste estudo, f.46.
- Fig. 3 Localização das incisões para a obtenção das porções musculares do atum (*T. atlanticus*), f.48.
- Fig. 4 Material utilizado na análise sensorial de atuns (*T. atlanticus*) cozidos, f.56.
- Fig.5 Apresentação de amostra a julgador não treinado, f. 56.
- Fig. 6 Ficha de avaliação apresentada aos julgadores não treinados, contendo os atributos de sabor, textura e impressão global em escala hedônica estruturada de nove pontos, f.56.
- Fig. 7 Placa de sílica gel (SIGMA®) revelada com solução de ninhidrina a 3% demonstrando o deslocamento dos padrões de histamina e cadaverina das amostras com quantidade superior ao padrão de 10mg/100g, f.66.
- Fig. 8 Valores, em Logarítmo, das Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotólicas (CBHAP) em três exemplares de atuns (*T. atlanticus*), com e sem pele, armazenados sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). f.68.
- Fig. 9 Escores médios de aceitação sensorial quanto ao sabor, textura e impressão global do atum (*T. atlanticus*), f.70.
- Quadro 1 Variação do teor de Óxido de Trimetilamina nas diferentes espécies de peixes, f.25.
- Quadro 2 Microbiota dominante e bactérias especificamente deteriorantes relacionados com a deterioração de peixes frescos, f.38.
- Quadro 3 Escala para avaliação geral do frescor de atuns crus, f.41.
- Quadro 4 Valores numéricos para a pontuação dos termos hedônicos na análise dos resultados do teste de aceitação, f.57.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Valores médios de Óxido de Trimetilamina (OTMA) em mg N/100g obtidos nas porções 1, 2 e 3 dos cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), f.60
- TABELA 2 Valores médios de Bases Voláteis Totais (BVT), em mg N/100g, obtidos nas porções 1, 2 e 3 dos cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$), f.61
- TABELA 3 Valores médios de Trimetilamina (TMA), em mg N/100g, obtidos nas porções 1, 2 e 3 dos cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$), f.62
- TABELA 4 Valores médios obtidos na análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância para as variáveis Óxido de Trimetilamina (OTMA), Bases Voláteis Totais (BVT) e Trimetilamina (TMA), em mg N/100g, obtidos nos atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$), f. 63.
- TABELA 5 Valores médios de pH, obtidos nas análises de cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$), f.63
- TABELA 6 Modelos de equação de regressão dos valores de OTMA, BVT, TMA e pH (Y) em função do tempo de estocagem a uma temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (Prob.) para atum (*T. atlanticus*), f.64
- TABELA 7 Valores da formação de histamina e cadaverina (mg/100g) detectados nas análises dos cinco exemplares de atum (*T. atlanticus*) em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), f.65

- TABELA 8 Valores médios das Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas (CBHAP), em três exemplares de atuns (*T. atlanticus*) com e sem pele pelo período de 19 dias de estocagem sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), f.67
- TABELA 9 Modelos de equação de regressão dos valores de CBHAM (Y) em função do tempo de estocagem a uma temperatura de 4°C (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (Prob.) para três exemplares de atum (*T. atlanticus*), f.68
- TABELA 10 Valores médios dos escores do teste de aceitação de amostras cozidas de atum (*T. atlanticus*) com um (amostra 1) e nove (amostra 2) dias de estocagem sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para as variáveis sabor, textura e impressão global, f.69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BVT	Bases Voláteis Totais
DAO	Diaminoxidase
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DMA	Dimetilamina
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
FA	Formaldeído
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drugs Administration
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICCAT	International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
LANARA	Laboratório Nacional de Referência Animal
MAO	Monoaminoxidase
µg	Micrograma
µL	Microlitro
MMA	Monometilamina
NH ₃	Amônia
OTMA	Óxido de Trimetilamina
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	parte por milhão
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SSP	Solução Salina Peptonada
TiCl ₃	Tricloreto de Titânio
TMA	Trimetilamina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

RESUMO

O atum é um dos peixes de maior importância comercial, tanto pela sua utilização industrial, como pelo aumento do seu consumo devido à influência da gastronomia japonesa em nosso país. Entretanto, a avaliação da sua qualidade quanto aos parâmetros físico-químicos descritos na legislação brasileira ainda é motivo de controvérsias em virtude da enorme diferença bioquímica e fisiológica existente entre as espécies. Face ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar as características físico-químicas, bacteriológicas e sensoriais iniciais do atum (*T. atlanticus*) e acompanhar as alterações deste produto quando mantido sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 1$) até completa deterioração. Foram avaliados o teor inicial de OTMA, TMA, BVT, pH, histamina e cadaverina em três porções do atum, em dias alternados até ser consolidada a deterioração. Também foi realizada a contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicotróficas (CBHAP) em atuns com e sem pele, assim como um teste sensorial de aceitação com 60 julgadores não treinados nos dias zero e nove de estocagem. Com relação ao teor de OTMA, BVT e TMA não foi evidenciada diferença significativa entre as três porções analisadas. Os valores de OTMA variaram de 20,3mg N/100g no 1º dia a 5,40mg N/100g no 19º dia. Quanto aos valores de BVT, estes variaram entre 14,65 e 27,29mg N/100g no primeiro e no 19º dia, respectivamente. A produção de TMA variou de 4,1 a 5,54mg N/100g no mesmo período de armazenamento, não demonstrando variações compatíveis com os parâmetros oficiais, assim como o pH que variou de 5,79 a 5,98, mesmo com o peixe demonstrando características de deterioração. Dos cinco exemplares de atum analisados nenhum apresentou produção de histamina no 1º dia, porém o limite de 10mg/100g foi alcançado no 10º dia nos exemplares 4 e 5 e no 19º dia nos exemplares 1,2 e 3. Quanto à cadaverina, os três primeiros exemplares alcançaram valores entre 5 e 10mg/100g no 19º dia e os exemplares 4 e 5 no 10º dia. Os resultados obtidos nas CBHAM dos atuns sem pele foram 5 Log UFC até o 9º dia de estocagem e a partir do 11º dia a contagem alcançou 12 Log UFC, terminando o período de armazenamento com o valor de 18 Log UFC. Em relação às CBHAP, os valores atingidos foram 5, 7 e 18 Log UFC nos dias 1, 9 e 19, respectivamente. Na análise sensorial o teste de aceitação mostrou que as amostras frescas (dia zero) tiveram maior aceitação que as amostras apresentadas no 9º dia de estocagem. Tendo em vista as análises realizadas, conclui-se que o prazo de vida comercial da espécie *T. atlanticus* é de nove dias e que as concentrações de BVT e TMA devem ser melhor estudadas, com uma maior amostragem, para reavaliação dos padrões oficiais destas substâncias.

Palavras-chave: Atum, prazo de vida comercial.

ABSTRACT

Tuna is one of the most important commercial fish because of its industrial use and for the increase of its consumption based on the influence of Japanese gastronomy in our country. However, the evaluation of the physical-chemical parameters described in the Brazilian legislation still is a reason for controversies due the enormous physiological and biochemical differences between the species. In accordance with this, the objective of this study was to evaluate the physical-chemical, bacteriological and sensorial characteristics of tuna (*T. atlanticus*) and observe the changes in these product when kept under refrigeration ($4^{\circ}\text{C}\pm 1$) until complete deterioration. The initial content of TMAO, TVB, TMA, pH, histamine and cadaverine were evaluated in three portions of tuna, in alternated days until deterioration being consolidated. The counting of heterotrophic aerobic mesophiles (CBHAM) and psychrotrophes (CBHAP) bacteria was also carried through, as well as a sensorial test of acceptance with 60 judges not trained on day 0 and day 9 of storage. In relation to the TMAO, TVB and TMA levels, no significant difference between the three analyzed portions was noticed. The values of TMAO were 20,3mg/100g in day 1 and 5,40mg/100g in day 19. The values of TVB were 14,65mg/100g (day 1) and 27,29mg/100g (day 19). The TMA production was 4,1 to 5,54mg/100g in the same period of storage and don't show compatible variations with the official parameters, as well as pH level that varied between 5,79 to 5,98, even with the characteristic of spoil demonstrated. None of analyzed tuna presented histamine production in day 1. In the units four and five the limit was reached in day 10 and, in the others units, in day 19. In relation to cadaverine production, units 1, 2 and 3 had reached values between 5 and 10mg/100g in day 19 and, in units 4 and 5, in day 10. The results gotten in CBHAM of tunas without skin had been 5 Log UFC until day 9 of storage. After day 11 the counting reached 12 Log UFC, ending with a value of 18 Log UFC. In relation to CBHAP, the values reached had been 5 Log UFC in day 1, 7 Log UFC in day 9 and 18 Log UFC in day 19. In the acceptance test, fresh samples (day 0) was more preferred than the samples analyzed in day 9 of storage. According to the analysis produced it can be concluded that the shelf life of *T. atlanticus* is nine days and the TVB and TMA concentrations must be study with a bigger sampling and reevaluate the official standards for these substances.

Key words: tuna, shelf life.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o consumo de alimentos saudáveis e nutritivos vem crescendo em larga escala no Brasil e no mundo. Esse fato determinou uma nova tendência nutricional que preconiza uma alimentação com ingestão de muitas fibras, pouca gordura e pouco colesterol. Por esse motivo há uma inclinação ao aumento do consumo de peixes, pois este apresenta vantagens em relação à carne de outros animais, entre as quais é possível destacar: presença de uma carne mais nutritiva, com menor teor de gordura, rica em ácido linoléico (ômega 3), aminoácidos essenciais, vitaminas (A, E e D) e minerais (sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, iodo, flúor, selênio, manganês e cobalto).

Conseqüentemente, fica evidente a importância do consumo de peixe na alimentação humana uma vez que, além de ser uma fonte de proteínas de alto valor biológico, de conter todos os aminoácidos essenciais e apresentar alta digestibilidade, também possui baixo teor de colesterol devido à presença de 70% de ácidos graxos insaturados da série ômega 3 em sua composição.

Entre os produtos de origem animal, o pescado é um dos mais susceptíveis ao processo de deterioração. Alguns dos fatores que contribuem para este fato incluem as condições de higiene, transporte e armazenamento, o pH próximo à neutralidade, a elevada atividade de água nos tecidos, o alto teor de nutrientes, a quantidade de lipídios insaturados, a presença de pouco tecido conjuntivo, a ação das enzimas autolíticas presentes nos tecidos e a alta atividade metabólica da microbiota presente (FRASER; SUMAR, 1998; SOARES et al., 1998; MAUSSE, 2000).

Dentre os peixes de maior importância comercial no Brasil o atum é um gênero que merece destaque, em função de seu papel na indústria e pelo aumento do seu consumo decorrente da influência da culinária japonesa no país.

É relevante destacar a importância dos tunídeos na saúde pública, pois estes peixes pertencem à família *Scombridae* que apresenta grandes quantidades de histidina livre na musculatura e, como consequência, possuem uma grande tendência à produção de histamina a partir da descarboxilação deste aminoácido por enzimas descarboxilases de microrganismos.

A legislação brasileira considera como deteriorado e, portanto, impróprio para o consumo, o pescado com teor de bases voláteis totais (BVT) superior ou igual a 30 mg N/100 g, pH da carne externa superior ou igual a 6,8, e da carne interna superior ou igual a 6,5 e reação positiva de gás sulfídrico (BRASIL, 1981; BRASIL, 1997) e teor de histamina de 10 mg/100g (100 ppm) para algumas espécies de peixes. Entretanto, o limite preconizado para acúmulo de bases voláteis totais em pescado e derivados foi e ainda é motivo de polêmicas e controvérsias, visto que cada espécie de peixe e algumas vezes, tipos musculares e zona corporal, apresentam níveis distintos de óxido de trimetilamina (OTMA).

Os critérios estabelecidos pela legislação brasileira parecem não ser adequados para todos os tipos de peixes, pois algumas espécies apresentam níveis de BVT acima do padrão permitido, mas demonstram estar em condições microbiológicas e sensoriais favoráveis ao consumo. Da mesma forma, outros tipos de peixes mesmo contendo níveis de BVT compatíveis com a legislação, oferecem condições desfavoráveis ao consumo (TAHA, 1988).

Devido à inadequação dos valores de BVT estabelecidos pela legislação às diversas espécies de pescado, faz-se necessária a realização de estudos visando determinar os limites críticos mais adequados, coerentes com a espécie analisada. Também é importante determinar os níveis de OTMA em algumas espécies de peixes, já que seus teores variam muito entre as espécies, desde pequenas quantidades até centenas de mg de OTMA-N / 100 g.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as características físico-químicas, bacteriológicas e sensoriais iniciais do atum (*T. atlanticus*) e acompanhar as alterações deste produto quando mantido sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 1$) até completa deterioração. E como objetivos específicos, avaliar o teor inicial do OTMA, de

trimetilamina (TMA) e do conjunto das BVT, além do pH e da produção de histamina e cadaverina; acompanhar o desenvolvimento, sob as mesmas condições de estocagem, de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas e, sob aspecto sensorial, realização do teste de aceitação para acompanhamento da qualidade. Além disto, indicar o prazo de vida comercial sob as condições do estudo, procurando oferecer subsídios às autoridades sanitárias para uma readequação destes valores, de forma a torná-los mais condizentes com a realidade brasileira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ATUM

O atum é um peixe pelágico, teleósteo, da ordem dos *Perciformes*, família *Scombridae*, com grande velocidade migratória, tanto para ir à busca de alimento como para a desova. É um peixe com grande importância industrial devido a sua capacidade de formar cardumes, já que desta forma pode ser capturado em maior quantidade e em menor tempo (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

A composição química de filés de atum é basicamente de água (69%), lipídeos (4%), proteínas (25,2%) e cinzas (1,3%) (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994; HUSS, 1995). Além destas substâncias apresenta em sua composição uma quantidade significativa de fósforo (250g/100g de tecido) e de iodo, bem como uma pequena quantidade de tecido conjuntivo que o torna mais digerível (GERMANO, GERMANO e OLIVEIRA, 1998).

Os atuns e tunídeos são muito importantes no cenário comercial, especialmente as espécies *Thunnus alalunga* (albacora), *T. obesus* (Bigeye tuna), *T. thynnus* (Northern Bluefin tuna), *T. maccoyii* (Southern bluefin tuna) e *T. albacares* (Yellowfin tuna). Coletivamente essas são conhecidas como as principais espécies de atum no mercado mundial e são comercializadas em conservas, crus (“sashimis” e “carpaccios”) entre outros. Porém, as espécies menos conhecidas de atum não devem ser desconsideradas pois promovem um comércio considerável dentro de determinados países, além de fornecerem uma importante fonte de proteína em algumas partes do mundo, como países pobres da África (SHOMURA et al., 1993).

Segundo Shomura et al. (1995) a captura de atuns no Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo no ano de 1993 ficou em torno de 525 mil toneladas, das quais cerca

de 180 mil toneladas foram relativas a pesca de Bonito (*Katsuwonus pelamis*), 143 mil toneladas referentes à pesca de albacora (*Thunnus albacares*) e apenas 3460 toneladas referentes à pesca da albacorinha (*Thunnus atlanticus*). De acordo com os dados fornecidos pelo Comitê Internacional para a Conservação de Atuns Atlânticos (ICCAT, 2006), a quantidade de atum da espécie *Thunnus atlanticus* desembarcados no Brasil subiu de 418 toneladas em 1997, para 1.669 toneladas em 2002, demonstrando a importância desta espécie no país.

A espécie utilizada neste estudo foi a *Thunnus atlanticus* (Lesson, 1831), que é popularmente conhecido como albacorinha (ou “Blackfin tuna”). É a única espécie de atum cuja distribuição ocorre na parte oeste (Occidental) do Oceano Atlântico, sendo encontrado desde o Norte dos Estados Unidos até a parte Sudeste do Brasil. É uma espécie de hábitos extremamente migratórios, encontrada principalmente na região costeira, em águas cujas temperaturas médias ficam em torno de 20°C (VIEIRA et al., 2005). É uma espécie nativa em países como Brasil, Colômbia, Cuba, México, Venezuela e Estados Unidos. No Brasil, apresenta-se em maior quantidade no Rio de Janeiro (FISHBASE, 2006).

O atum, assim como outros gêneros de peixes que habitam águas frias, como salmão e o bacalhau, apresentam quantidades bastante relevantes de ácidos graxos da série ômega 3. O consumo desses tipos de peixes é fundamental para a saúde em função da redução do risco de doenças cardiovasculares, além de ter ação antiinflamatória, auxiliar na regeneração dos neurônios e atuar no desenvolvimento cerebral. Segundo Takahashi (2005), por essas razões o consumo de peixes é fundamental na infância e essencial para os idosos, pois pode reduzir o risco do mal de Alzheimer, demência e cansaço mental. Também atua na coagulação sanguínea, reduzindo a agregação plaquetária. Assim, segundo Deckere et al. (1998) o consumo moderado de peixe (uma ou duas porções por semana) tem sido associado à redução da taxa de mortalidade devido a doenças coronarianas e infarto agudo do miocárdio.

Apesar de todos esses dados demonstrando a importância da ingestão de peixes para uma nutrição mais saudável, o seu consumo no Brasil ainda é muito baixo se comparado a outros países do mundo, mesmo com toda a extensão costeira do país. Segundo dados da FAO (2006) o consumo de pescado por indivíduo no Brasil é de apenas 6,5 kg/ano, enquanto no Japão, China e Estados

Unidos esses números são bem superiores, de 66,1 kg/ano, 25,4 kg/ano e 21,3 kg/ano respectivamente (Figura 1).

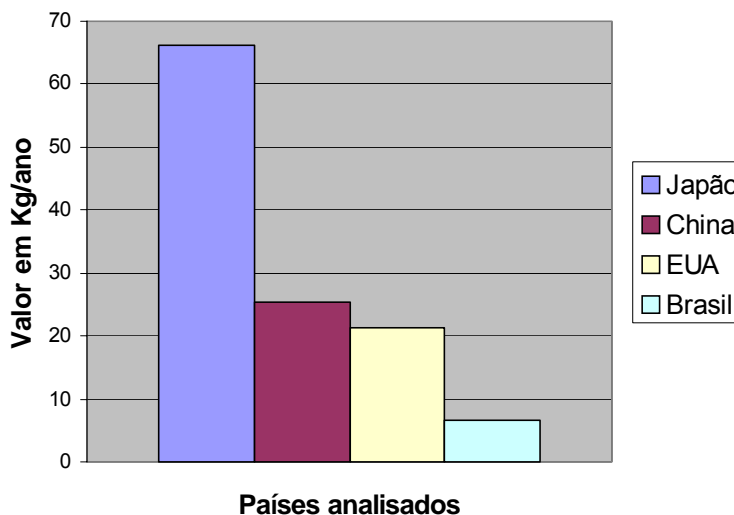


Figura 1: Consumo de pescado marinho no ano de 2001.

Fonte: FAO, 2006.

Ainda pelas estatísticas da FAO (2005), o total global de atuns e tunídeos capturados aumentaram de cerca de 0,6 milhões de toneladas em 1950 para cerca de 4,2 milhões de toneladas em 2003, sendo 2,7 milhões de toneladas capturados nos Estados Unidos e 582 mil toneladas no Brasil. Com relação ao ano de 2000, estes dados demonstram um aumento de 5,2% na captura mundial de atuns.

Embora a maior parte do atum desembarcado e comercializado no Brasil seja utilizada para a fabricação de conservas, está havendo um aumento crescente na procura por atuns frescos (resfriados) e/ou congelados. O motivo desse crescimento é a aquisição de novos hábitos de consumo devido à influência da culinária japonesa (LOPEZ-GALVES et al., 1995). Dados estatísticos da FAO (2006) comprovam indiretamente esse aumento pois o total de peixes consumidos frescos subiu de 36% em 1996 para 41% em 2003.

2.2 QUALIDADE E DETERIORAÇÃO DO PESCADO RESFRIADO

Após a captura do peixe vários eventos bioquímicos ocorrem até o aparecimento dos primeiros sinais de deterioração, podendo ser classificados como metabólicos e microbianos. Os eventos bioquímicos metabólicos ocorrem devido à

atividade de enzimas que permanecem viáveis, mesmo após a morte do peixe. Um dos primeiros produtos a ser formado a partir das alterações enzimáticas é o ácido láctico, que é proveniente da conversão do glicogênio armazenado na musculatura do peixe. Seu acúmulo no organismo faz com que haja queda do pH, com liberação e ativação de proteases e catepsinas, resultando em proteólise com liberação de aminoácidos livres que serão utilizados pelas bactérias. A degradação microbiana de aminoácidos pode produzir bases voláteis como amônia, cujos níveis estão relacionados com a quantidade de ATP inicial na musculatura, além de produzir aminas biogênicas como histamina, cadaverina e putrescina. A degradação de nucleotídeos também começa logo após a morte do peixe e resulta na formação da hipoxantina. Simultaneamente, o OTMA e o ácido láctico podem ser metabolizados pela ação bacteriana formando TMA e ácido acético. Todas essas substâncias, formadas pela ação microbiana, podem ser utilizadas para análises químicas de determinação da deterioração do produto (JACOBBER; RAND, 1982; CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

2.2.1 Alterações químicas do pescado

Os eventos bioquímicos que se iniciam no fim do *rigor-mortis* culminam com a deterioração do peixe, quando não há aceitação sensorial e nem sanitária. Na fase do pós-rigor, o maior evento bioquímico é a alteração do teor de nitrogênio não protéico (particularmente dos aminoácidos livres), produzindo amônia e outras bases voláteis totais, como TMA, dimetilamina (DMA) e traços de monometilamina (MMA) e propilamina. A amônia formada nesta fase é oriunda da descarboxilação ou desaminação dos aminoácidos. O primeiro caso é consequência da ação de bactérias descarboxilases positivas (presentes na pele e no trato digestivo), que é muito intensa sob temperatura de 20°C e pH ácido. No segundo caso, há ação de bactérias anaeróbias que realizam desaminação de aminoácidos livres (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

A partir do pós-rigor a amônia gerada pela ação microbiana soma-se à produzida anteriormente e, por isso, seus níveis aumentam significativamente após a primeira semana de estocagem. Entretanto, devido a maior facilidade analítica, costuma-se determinar o nitrogênio volátil em vez da amônia através do teste de quantificação das bases voláteis totais (BVT) (ibid).

2.2.1.1 Óxido de trimetilamina e formação das bases voláteis totais

O OTMA é um composto de natureza não protéica, solúvel em água, de baixo peso molecular e que contém nitrogênio (HUSS, 1995). É uma substância típica de peixes marinhos e invertebrados, e é originado a partir de duas fontes principais: acúmulo pela ingestão de fitoplâncton ou biosintetizado pelos próprios animais (HUSS, 1995; VOOYS, 2002). Pode ser reduzido a trimetilamina (TMA) através da degradação não enzimática (CINTRA et al., 1999), por ação de enzimas bacterianas (desaminases) ou pode sofrer decomposição enzimática, gerando uma quantidade equimolar de DMA e formaldeído (FA) (TIMM; JORGENSEN, 2002). A DMA é produzida por enzimas autolíticas (OTMA dimetilase) durante o armazenamento dos peixes congelados e pode ser usada como um índice de deterioração durante o armazenamento de pescado congelado, da mesma forma que a TMA é utilizada na alteração microbiana do pescado não congelado (GALLARDO et al., 1990b). Embora seja inodoro, o OTMA origina compostos que podem alterar o odor do pescado, como a TMA, que é uma amina volátil e que apresenta odor forte e desagradável, característico de peixes em estado de deterioração (DYER, 1945). A sua presença em peixes em decomposição está relacionada com a redução bacteriana do OTMA, geralmente associada a gêneros bacterianos típicos de ambiente marinho (como *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* e *Shewanella putrefaciens*) e também com bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* (HUSS, 1995).

Acreditava-se que qualquer produção de DMA e TMA era proveniente da degradação do OTMA e que qualquer degradação do OTMA se refletia no aumento dos níveis de DMA e/ou TMA. Porém, pesquisas indicam que a degradação do OTMA ocorrerá mais rapidamente que a formação de DMA e/ou TMA caso haja uma inibição da enzima OTMA dimetilase pela presença de oxigênio (SOTELO et al., 1995).

Contreras-Guzmán (1994) apresentou três teorias para a origem do óxido de trimetilamina:

- ✦ Origem exógena: síntese de OTMA por algas marrons, verdes e vermelhas, que ao serem ingeridas por peixes herbívoros e zooplâncton acabam passando por todos os elos da cadeia alimentar, de acordo com a quantidade necessária para cada espécie.

- ✦ Origem endógena: de acordo com a salinidade do meio os peixes podem excretar o excesso ou sintetizar o OTMA, mesmo se mantidos em jejum ou alimentados com dietas livres de OTMA.
- ✦ Origem mista: os peixes possuem um mecanismo que garante nível mínimo desta substância no organismo, eliminando o excesso ingerido pela dieta ou sintetizando-o em períodos de carência.

O OTMA constitui uma parte característica e importante da fração nitrogenada não protéica nas espécies marinhas, porém está ausente em espécies de água doce, exceto na tilápia (*Oreochromis niloticus*) (BYSTEDT, SWENNE e AAS, 1959) que, segundo estudos apresenta cerca de 150-200 mg de OTMA/100g de peixe fresco (Gram¹, 1989 apud HUSS, 1995). Pode ser encontrado em quantidade de 1 a 5% do tecido muscular e, dependendo da espécie do pescado, pode apresentar variações em sua concentração. Os teleósteos geralmente apresentam concentração de aproximadamente 1%, enquanto que nos elasmobrânquios esta concentração ultrapassa 1,5% (FRASER; SUMAR, 1998). Segundo Contreras-Guzmán (1994) o teor de OTMA entre as espécies pode ser classificado como ausente, baixo, intermediário, alto ou muito alto (Quadro 1).

Huss (1995) relatou que os crustáceos e cefalópodes podem atingir concentrações de OTMA maiores que 7% do peso seco de seus tecidos. Nos elasmobrânquios os níveis de OTMA podem chegar até 1500 mg/100 g, no atum a quantidade encontrada normalmente é abaixo de 25 mg/100 g e nos peixes demersais, varia entre 200 e 300 mg/100g (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994). O mesmo autor ainda afirma que a musculatura vermelha apresenta teores maiores de OTMA que a musculatura branca, principalmente nos escombrídeos típicos e elasmobrânquios.

¹ Gram, L. Identification, characterization and inhibition of bacteria isolated from tropical fish. Ph.D. Thesis. The Technological Laboratory of the Danish Ministry of Fisheries and The Royal Veterinary and Agricultural University.

Quadro 1: Variação do teor de Óxido de Trimetilamina nas diferentes espécies de peixes.

Teor de OTMA	Valor aproximado	Espécies
Ausente	-	Peixes de água doce típicos (pacu, tambaqui, carpa).
Baixo	< 25mg%	Escombrídeos (atum, bonito).
Intermediário	25 – 100mg%	Clupeídeos (sardinha), engraulídeos (manjuba), escombrídeos menos típicos (cavala, sororoca), peixes de água doce de comportamentos atípicos (tilápia), crustáceos eurilianos (camarão-gigante-da-malásia).
Alto	100 – 300mg%	Pleuronectídeos (linguado), trichurídeos (xixarro), sciaenídeos (corvina e pescada), a maior parte dos crustáceos peneídeos e os moluscos cefalópodos.
Muito Alto	> 300mg%	Gadídeos (merluza), elasmobrânquios (caçães e raias).

Fonte: Contreras-Guzmán, 1994.

Alguns autores acreditam que o OTMA tenha papel importante na osmorregulação dos peixes (STROEM²,1984 apud HUSS, 1995). De acordo com relatos de Vooy (2002) foram propostas, por vários pesquisadores, hipóteses de possíveis funções para o OTMA no metabolismo animal. Esta substância pode ser um produto final do metabolismo não-tóxico de proteínas, pode atuar na osmorregulação intracelular, também pode proteger o animal contra as baixas temperaturas da água, além de estabilizar as enzimas no caso de altas concentrações de uréia ou altas pressões atmosféricas. Este autor pesquisou o papel do OTMA na osmorregulação em moluscos bivalves (*Cerastoderma edule* e *C. lamarcki*) e descobriu que o OTMA não está associado à osmorregulação nas espécies estudadas. De acordo com as condições do estudo, em ambiente de baixa salinidade, se esperava um decréscimo no nível desta substância e o inverso foi achado como resultado, caracterizando que a concentração de OTMA nos tecidos foi derivada da presença de TMA na ração fornecida às espécies e não estava relacionada à osmorregulação.

² Stroem, A.R. Mikrobiologiske og biokemiskeforhold ved lagring affisk. Lecture notes, Tromsoe Univ., Tromsoe. 1984.

Quando o OTMA é reduzido à TMA várias alterações físicas ocorrem, tais como redução do potencial redox, aumento do pH e da condutância elétrica (HUSS, 1995).

Os peixes e frutos do mar apresentam rápida deterioração logo após sua captura, como conseqüência de vários mecanismos bioquímicos e microbiológicos desenvolvidos, embora a perda da qualidade dependa de outros fatores como da espécie do peixe em questão e das condições de manuseio e estocagem utilizadas. Para reduzir os mecanismos desencadeadores da perda da qualidade, o peixe deve ser refrigerado imediatamente após a captura (RODRÍGUEZ et al., 2004). Segundo Ruiz-Capillas e Moral (2005) o aumento dos níveis de BVT durante estocagem em gelo de várias espécies de peixes (incluindo o atum), foi associada com deterioração microbiológica e com a produção de substâncias deteriorantes, como TMA e amônia.

Tradicionalmente a avaliação da qualidade do peixe vem se baseando em testes sensoriais. A avaliação química da deterioração de pescado foi iniciada aproximadamente há um século quando foi comprovado através de pesquisas que a determinação dos níveis de BVT era um método padrão para a realização da inspeção de peixes e este método começou a ser muito utilizado na Alemanha (KÖNIG³, 1910 apud TIMM; JORGENSEN, 2002). Desde então, o método de determinação de BVT tem sido amplamente empregado na avaliação da qualidade dos peixes, sendo o método não-sensorial mais usado na avaliação da qualidade do pescado fresco e congelado (HUSS, 1995; PEREIRA, 2004).

Do mesmo modo, também são utilizados os níveis de TMA e DMA para esta finalidade (TIMM; JORGENSEN, 2002). A partir dos trabalhos de Dyer (1945), que apresentou um método analítico de determinação de TMA simples, a análise desta substância tornou-se de fundamental importância e vem sendo empregado amplamente em peixes e produtos marinhos (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994). De acordo com este autor, nos peixes armazenados em gelo sob condições de aerobiose há o favorecimento da formação de TMA, enquanto que o armazenamento em condições anaeróbicas ou parcialmente aeróbicas favorece a formação de DMA e FA. Ele ainda concluiu que os peixes de carne escura formam TMA no músculo ordinário em condições aeróbicas, tanto a 0°C quanto sob congelamento.

³ KONIG, J. Untersuchung von Nahrungs - Genussmitteln und Gebrauchsgegenständen, Springer, Berlin. 1910.

A amônia também está incluída no conjunto de bases voláteis totais. Como esta substância se origina da degradação de nucleotídeos no pescado assim que este é capturado é possível compreender que os valores iniciais das análises de BVT sejam bem acima de zero. Como exemplo pode-se citar a musculatura branca do pescado magro que apresenta níveis iniciais de BVT em cerca de 20 mg N/100 g, mas, à medida que o pescado se degrada ocorre um aumento exponencial no valor desta substância (PEREIRA, 2004).

Sengupta, Mandal e Mitra (1971) observaram que de uma forma geral, quando os valores de BVT estavam em cerca de 20 mg N/100g o peixe permanecia fresco e normal, entretanto quando o valor aumentava para 30 mg N/100g ou mais, o peixe começava a apresentar características mais fortes de deterioração, até a deterioração completa. Por esse motivo eles chegaram à conclusão que o valor de BVT poderia ser utilizado como um rápido parâmetro para se detectar a perda da qualidade dos peixes.

De acordo com Huss (1995), apesar da análise de BVT ser de fácil realização é uma análise que revela apenas estágios mais avançados da deterioração, além de não refletir o modo inicial do processo de deterioração (bacteriano ou autolítico).

Alguns autores consideram que, no caso da TMA, os limites máximos de aceitabilidade são de 10-15 mg N/100g de pescado e que um peixe com boas qualidades físico-químicas deve conter níveis de TMA menores que 1,5 mg N/100g de amostra (ABABOUC et al., 1996; FRASER; SUMAR, 1998). Segundo Ruiz-Capillas e Moral (2001) o limite legal para a TMA na Espanha é de no máximo 12 mg N de TMA/100g do produto. Na legislação brasileira o valor a ser adotado como limite de aceitação para a concentração de TMA na porção muscular dos peixes é de 4 mg N de TMA/100g de amostra (BRASIL, 1997a).

A presença da TMA em peixes é utilizada universalmente como um indicador de deterioração microbiana (FRASER; SUMAR, 1998). Huss (1995) afirma que a TMA não é um bom indicador de qualidade do pescado, pois não indica o estágio inicial da deterioração, porém, a vantagem de utilizar este método em vez da contagem bacteriana é a rapidez do teste e a maior exatidão que é proporcionada em relação ao estágio de deterioração.

Cardinal et al. (2004) afirmam que valores elevados de BVT e TMA são um forte indicador de baixa qualidade de peixes resfriados, estocados por duas semanas sob temperatura de 4°C.

Segundo Ababouche et al. (1996) as diferenças dos resultados entre várias espécies de peixes confirmam que a produção de TMA e de BVT não pode ser utilizada como indicadores universais de qualidade, como um padrão específico para todas as espécies. Este fato é justificado porque há diferentes concentrações de OTMA em cada uma delas, principalmente entre os elasmobrânquios e os teleósteos, e também porque foram sugeridos, por estes autores, limites críticos distintos de BVT, dependendo da espécie em questão (25 - 35mg de BVT/100g de sardinha e 30 - 35mg de BVT/100g de peixes de água fria em geral).

Kawabata (1953) ao realizar um estudo com atum (*Thunnus alalunga*) fresco e mantido sob temperatura de 8°C, determinou, entre outros parâmetros, o nível de OTMA, BVT e TMA presente nas musculaturas escura e clara. Encontrou níveis de OTMA na musculatura vermelha maiores que na musculatura branca e afirmou que essa concentração de OTMA é facilmente reduzida a TMA, justificando os valores mais elevados de TMA na musculatura vermelha.

Yamagata, Horimoto e Nagaoka (1969), realizaram estudo sobre a distribuição do OTMA na musculatura do atum (*Thunnus albacares*) armazenado em gelo. A análise foi realizada em quatro porções musculares distintas (Porção 1 cranial, porção 2 é intermediária, porção 3 é caudal e a porção 4 é a porção da cauda propriamente dita) e como resultados encontraram 17mg N/100g como um valor médio entre todas as porções analisadas. O OTMA presente na musculatura superficial (17,1mg N/100g) foi maior que na musculatura mais profunda (10,3mg N/100g). Sob as condições estudadas, não houve diferença significativa entre as partes dorsal (cerca de 14,6mg N/100g) e ventral (cerca de 14mg/100g) das musculaturas. Também evidenciaram que os níveis de OTMA na porção muscular da cauda são mais elevados que na parte do lombo e, além disto, não estão em uma proporção constante com as outras porções musculares.

Parkin e Hultin (1982) estudaram a produção de DMA e FA em merluza inteira e filés de merluza. Antes do congelamento mantiveram os peixes estocados por seis dias sob temperatura de 0°C. Entre outras análises, determinaram a concentração de OTMA e TMA. Para os filés, os resultados encontrados foram 10,5 mg de OTMA% e 0,1 mg de TMA%, enquanto para os peixes inteiros os valores encontrados foram 5,27 mg de OTMA% e 0,01 mg de TMA%.

Price, Melvin e Bell (1991), estudando as alterações *post-mortem* em albacora (*Thunnus alalunga*) eviscerada e armazenada em gelo (0°C) por 33 dias,

encontraram teores de TMA que variaram entre 1,1 mg N/100g e 2,6 mg N/100g durante o período de estocagem. Como esta substância não aumentou tão rapidamente como em outras espécies (como os gadóides) esses autores não recomendam utilizar os valores de TMA para avaliar a qualidade do atum.

Ben-Gigirey et al.(1998) analisaram cinco espécimes de atum (*Thunnus alalunga*) frescos no dia zero. Foram determinadas as concentrações de BVT, TMA, OTMA, pH e algumas aminas biogênicas. Como resultados encontraram uma média de 22,9 mg N/100g de BVT (valores entre 17.7 e 26.2), 0,18 mg de TMA/100g (valores entre 0,12 e 0,26) e 2,70 mg de OTMA/100g (valores entre 1,46 e 3,72). Para o pH encontraram o valor médio de 5,81 (valores entre 5,52 e 5,96) e para histamina, cadaverina, putrescina e espermina encontraram concentrações abaixo de 8ppm.

Silva, Ponte e Dapkevicius (1998) estudaram o tempo de estocagem na formação de histamina em *Thunnus obesus* por 12 dias (0,1, 2, 3, 6, 9 e 12 dias) sob temperaturas de 4, 10 e 22°C. Os teores de BVT obtiveram variação de 20 a 36 mg/100g quando estocados a 4°C, de 20 a 151 mg N/100g quando estocados a 10° (sendo o limite de 30 mg/100g alcançado no 6° dia) e de 20 a 39 mg N/100g quando estocados a 22°C (estocados somente por 3 dias).

Ruiz-Capillas e Moral (2005) realizaram experimento com *Thunnus obesus* estocados a 3°C por 25 dias. As análises físico-químicas realizadas foram pH, BVT e TMA. Os valores de TMA foram 0,4 TMA-N mg /100g no dia 0, 0,8 TMA-N mg/100g no dia 5 e, com 25 dias de estocagem esses valores chegaram a 1,8 TMA-N mg/100g. Os níveis iniciais de BVT foram elevados, cerca de 28mg N/100g, e permaneceram praticamente inalterados (30 mg N/100g no dia 25).

Gallardo et al. (1990) ao trabalharem com albacoras recém capturadas (*Thunnus alalunga*) encontraram valores de 19 mg de OTMA/100g, 0,44mg de TMA/100g e valores iniciais de BVT iguais aos descritos por Ruiz-Capillas e Moral (2005) (28 mg/100g).

2.2.1.2 pH

A legislação brasileira considera impróprio para consumo peixes que apresentem valores de pH (carne externa) superiores ou iguais a 6, 8, e valores superiores ou iguais a 6,5 (carne interna) (BRASIL, 1997). Com o acúmulo de

compostos alcalinos, como amônia e TMA, há um aumento no valor do pH indicando que está havendo um processo de deterioração (RODRIGUEZ et al., 2004). Com o início do rigor *mortis*, de uma maneira geral, o pH do peixe cai de 7,0 para 6,5, (dependendo das condições da pesca e das reservas de glicogênio) subindo rapidamente para níveis entre 6,6 e 6,8 (KAI; MORAIS, 1988). Com a deterioração do pescado, o pH alcança níveis mais elevados devido à decomposição de aminoácidos e da uréia e à desaminação oxidativa da creatina (SOARES et al., 1998).

Pérez-Villarreal e Pozo (1990) ao estudarem atum da espécie *T. alalunga* (30 dias em gelo) encontraram um valor baixo para o pH na musculatura, em torno de 5.9 ± 0.12 e estabeleceram em 20 dias o limite máximo de estocagem em gelo para esta espécie. Estes autores chegaram à conclusão que em faixas de pH baixas o prazo de vida comercial dos peixes é maior, pois o pH também influencia o desenvolvimento de bactérias deteriorantes, cujo crescimento fica mais lento que em faixas de pH mais elevadas. Isto explica por que o prazo de vida comercial de peixes desta espécie pode ser maior que o de outras espécies.

Ben-Gigirey et al.(1998) analisaram cinco espécimes de atum (*T. alalunga*) frescos e encontraram valores de pH nas amostras variando entre 5,52 e 5,96.

Silva, Ponte e Dapkevicius (1998) verificaram o armazenamento de *T. obesus* por 12 dias (0,1, 2, 3, 6, 9 e 12 dias) à diferentes temperaturas (4, 10 e 22°C), encontrando uma variação de pH entre 6,0 a 6,6 no peixe armazenado a 4°C, de 6,0 a 8,4 no atum estocado a 10°C e de 6,0 a 6,8 no armazenado a 22°C (a análise deste atum foi realizada apenas em 3 dias de armazenamento).

Em um experimento realizado com atuns (*T. obesus*) estocados a 3°C por 25 dias Ruiz-Capillas e Moral (2005) encontraram níveis iniciais de pH baixos (5,4) e, apesar desses valores aumentarem ao longo do período de estocagem, nenhuma amostra apresentou valor maior que 6,0 durante os 25 dias de estocagem.

Rodríguez et al., (2004) analisaram *Merluccius merllucius* nos dias 0, 2, 5, 8, 12, 15 e 19, armazenados em gelo sob temperatura de 2°C. Encontraram os seguintes valores para pH: valor inicial de 6,67 (dia zero), subindo para 6,98 no 5º dia e alcançando 7,71 no 19º dia de estocagem. O maior aumento foi observado a partir do 12º dia, coincidindo com uma grande elevação na contagem de bactérias.

2.2.1.3 Histamina e cadaverina

A histamina é uma amina biogênica não volátil com propriedades tóxicas que, se for ingerida, pode determinar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Esta amina pode ser produzida no pescado a partir do aminoácido histidina através da ação de enzimas descarboxilantes de origem bacteriana (SOARES et al., 1998), embora também possa ser originada a partir da aminação de aldeídos, decomposição de fosfolipídios ou decomposição térmica de aminoácidos (SILVA, PONTE e DAPKEVICIUS, 1998).

Contreras-Guzmán (1994) relatou que o atum apresenta em sua composição corporal uma alta concentração de aminoácidos livres na musculatura (dissolvidos no sarcoplasma), variando entre 600 e 1500 mg%. Dentre esses aminoácidos inclui-se a histidina, que é o precursor da histamina. Nos peixes da família *Scombridae* os níveis de histidina livre podem ser maiores que 500 mg%. Essas concentrações elevadas nos escombrídeos se justificam, entre outros motivos, pela grande atividade muscular que esses tipos de peixes apresentam. Por esse motivo, o atum e outros peixes da família *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Coriphaenidae* e *Pomatomidae* são muito incriminados quanto à formação de histamina em sua musculatura.

A contaminação do pescado geralmente ocorre após a captura, durante a manipulação sob condições inadequadas de higiene e conservação sob temperaturas elevadas. Consequentemente ocorre ação de enzimas bacterianas descarboxilantes que determinam a formação de histamina em peixes. As espécies bacterianas mais incriminadas deste processo fazem parte da família *Enterobacteriaceae*. Nesta família destacam-se os seguintes gêneros: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* (ARNOLD; BROWN, 1978; HALÁSZ et al., 1994; SILVA, PONTE e DAPKEVICIUS, 1998). As espécies representantes desta família que apresentam maior importância quanto à formação de histamina são: *Morganella morganii*; *Hafnia alvei*; *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*.

As bactérias Gram positivas dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus* apresentam grande capacidade de formação de histamina a partir de sua enzima histidina descarboxilase, principalmente as da espécie *C. perfringens*. Também é possível verificar a formação de histamina através de bactérias halofílicas, como

Photobacterium histaminum sp., bem como em halotolerantes a partir de peixes marinhos (HALÁSZ et al., 1994; SHALABY, 1996).

Devido à estabilidade da molécula de histamina, sua destruição por métodos físicos (congelamento ou aquecimento) torna-se extremamente dificultada, inclusive em produtos que sofreram o processo de apertização, como no caso de conservas de sardinha e atum (FAO, 1985; BERSOT, 1996). O perigo da histamina em pescado é intensificado pela sua característica de não volatilidade, pois a histamina pode conferir toxicidade ao produto mesmo antes deste ser considerado deteriorado ou sensorialmente inaceitável (SOARES et al., 1998).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1997a) não faz referência ao limite máximo de histamina permitida no pescado nacional. Porém, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado) (BRASIL, 1997b) estabelece o limite máximo de 100ppm (10 mg/100g) de histamina na musculatura das espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Coriphaenidae* e *Pomatomidae*. Em outros países, limites ou níveis máximos aceitáveis desta substância em pescado também foram estabelecidos. Nos Estados Unidos, o FDA (1996) estabeleceu, para espécies susceptíveis à formação de histamina, o limite máximo de 5 mg de histamina/100 g de produto (50 ppm) no porto e 10 mg/100 g de produto (100 ppm) nos peixes em conserva. A Comunidade Européia determinou o limite de 10 mg/100 g de histamina para atum e peixes pertencentes às famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae*. No Mercosul, o limite adotado na musculatura das espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Coriphaenidae* e *Pomatomidae* é 10 mg /100 g.

Desta forma, dentre os índices químicos para avaliar a qualidade do pescado, também se inclui a produção de histamina, uma vez que baixos níveis são detectados em peixes recém-capturados, normalmente teores menores que 1 ppm, aumentando com a sua deterioração (LÓPEZ-SABATER et al., 1994; SOARES et al., 1998). Então, a determinação dos níveis de histamina também pode ser empregada como um dos parâmetros de avaliação da qualidade do atum, visto que sua formação pode ser detectada com o avanço da deterioração dos peixes, sendo um bom índice químico para a deterioração bacteriana (LÓPEZ-SABATER et al., 1994; VECIANA-NOGUÉS, MARINÉ-FONT E VIDAL-CAROU, 1997), embora,

sozinho, não seja um bom índice de qualidade para o atum (LÓPEZ-SABATER et al., 1996).

Contreras-Guzmán (1994) comenta que algumas espécies de pescado que apresentam baixas concentrações de histidina livre (como bagres, trutas de água doce, camarões marinhos, peixes fermentados ou defumados) foram associadas à intoxicações por histamina. Nestes casos, provavelmente a falta de higiene e de refrigeração correta podem ter sido a causa do problema.

Segundo Naguib, Ayesh e Shalaby (1995) outras aminas biogênicas, como a cadaverina e a tiramina, são consideradas potencializadoras dos efeitos da histamina.

Arnold e Brown (1978) relataram que os níveis de histamina apresentam grande variação de acordo com a porção do peixe. Nos tunídeos a histamina apresenta uma distribuição irregular na musculatura, com níveis elevados na região anterior e níveis mais baixos próximo a nadadeira caudal (porção posterior). Essa irregularidade na distribuição da histamina associada com as diferenças entre indivíduos quanto à sensibilidade a este composto podem explicar a razão de algumas pessoas se intoxicarem, e outras não, ao ingerirem o mesmo alimento (peixe). Entretanto, López-Sabater et al.(1996) acreditam que a sensibilidade de cada indivíduo seja a melhor explicação para a intoxicação, já que em seu estudo foi encontrada uma distribuição de níveis de histamina uniforme entre as seções analisadas.

López-Sabater et al.(1996) estudaram a qualidade sensorial e a formação de histamina em amostras de atum (*T. thynnus*) mantidas sob temperatura de 0, 8 e 20°C. A 0°C a histamina não foi detectada até o 12º dia de estocagem, mas a partir do 18º dia apresentava teores acima do permitido pelo FDA (100 ppm). Nas amostras estocadas a 8°C as concentrações de histamina estavam maiores que o permitido logo a partir do 4º dia. Então, concluíram que a estocagem do atum sob a temperatura de 8°C não previne a formação de histamina e seu consumo após algum tempo de refrigeração é muito perigoso para a saúde dos consumidores. Devido a esta conclusão aconselham aos consumidores que os atuns mantidos sob esta temperatura de armazenamento (8°C) devem ser consumido o mais rapidamente possível, de preferência antes de três dias de estocagem.

Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) comprovaram que a histamina foi a amina biogênica que prevaleceu durante a estocagem do atum (*T.*

thynnus) nas temperaturas de 0, 8 e 20°C. Em seu estudo, a 0°C, encontraram valores baixos de histamina até o 9º dia de armazenamento (5 ppm), e depois esses níveis aumentaram para 20 ppm no 12º dia, passando para 135 ppm no 15º dia e terminando em 107 ppm no 21º dia.

Silva, Ponte e Dapkevicius (1998) estudaram a formação de histamina durante a estocagem de *T. obesus* por 12 dias (0,1, 2, 3, 6, 9 e 12 dias) sob temperaturas de 4, 10 e 22°C. A quantidade de histamina atingiu os níveis tóxicos que podem causar perigo aos consumidores (5 mg/100g) no 1º dia de estocagem a 22°C; 3º dia de estocagem a 10°C e 6º dia de estocagem a 4°C.

Emborg, Laursen e Dalgaard (2005) analisou amostras de lombo de atum congelados (*Yellowfin tuna*) coletadas em supermercado e descongeladas a 5°C “overnight”. Os resultados encontrados foram 1,6 a 4,5 mg/100g de cadaverina e 7 a 23,6mg/100g de histamina. O pH das amostras variou de 6.1 a 6.4 e a contagem de bactérias aeróbias foi de 7,6 a 8,2 Log UFC/g. Este estudo só verificou a qualidade deste peixe, não sendo estudada nenhuma outra variável.

Ruiz-Capillas e Moral (2005) realizaram experimento com *T. obesus* estocados a 3°C por 25 dias. Dentre outros parâmetros, pesquisaram a formação de histamina nesta espécie, encontrando valores iniciais menores que 10µg/g. A partir do 18º dia a concentração desta amina chegou a 45µg/g, alcançando 78,1µg/g no último dia de armazenamento.

De acordo com a sensibilidade de cada indivíduo a concentração de histamina capaz de provocar uma intoxicação irá variar. Em indivíduos sensíveis, valores entre 5 e 10mg/100g são capazes de provocar efeitos tóxicos (ARNOLD; BROWN, 1978). A sintomatologia da intoxicação histamínica dependerá de vários fatores, sendo considerados os mais importantes a quantidade de histamina ingerida e a susceptibilidade individual à ação das aminas biogênicas.

A histamina manifesta seus efeitos ligando-se a receptores na membrana celular da pele e dos sistemas respiratório, cardiovascular, gastrintestinal e imunológico (SHALABY, 1996).

Os sinais clínicos são mais severos em pessoas que tomam medicações que inibem as enzimas detoxificantes da histamina no intestino (MAO, DAO e N-metil transferase), em imunossuprimidos e indivíduos que fazem uso de drogas e álcool. Os sintomas da intoxicação histamínica geralmente aparecem pouco depois da ingestão do alimento, com duração de aproximadamente 24 horas (FDA, 2001). O

período de incubação típico é menor que uma hora, embora possa haver uma variação grande de indivíduo para indivíduo (ARNOLD; BROWN, 1978).

Os sintomas da intoxicação histamínica são náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, hipotensão, erupção de pele, urticária, prurido intenso, edema (principalmente dos lábios), cefaléia, tontura e desmaios (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994; HALÁSZ, 1994; BARDÓCZ, 1995; SHALABY, 1996; SILVA, PONTE, e DAPKEVICIUS, 1998). Pode haver também dificuldade de deglutição, sensação de queimaduras na cavidade oral e orofaringe. Em casos graves, podem ocorrer choque cardiovascular, broncoespasmos, sufocamento e dispnéia severa (ARNOLD; BROWN, 1978).

A única forma segura de se evitar a formação de histamina nos peixes é através da correta utilização da cadeia de frio logo após a captura. Assim, deve-se manter o peixe sob temperaturas inferiores a 4°C até que este seja processado (HUSS, 1995).

Contreras-Guzmán (1994) relata que os valores normais para a concentração de cadaverina em atum armazenado sob temperatura de 21°C por três dias são de 14,2 mg/100g, porém, quando estes peixes são submetidos a uma temperatura de 0°C há uma grande redução no teor desta poliamina. Também concluiu que, nos peixes deteriorados, a concentração de cadaverina encontra-se entre 10 e 50 mg/100g.

2.2.2 Alterações bacteriológicas do pescado

Cerca de 1/3 da produção mundial de alimentos é perdida anualmente como resultado da atividade microbiana, que é responsável pela deterioração da maioria dos alimentos provenientes do mar (tanto frescos como os levemente preservados). Provavelmente por essa razão a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotólicas têm sido utilizadas como um padrão de qualidade em alguns países europeus, no Japão e Estados Unidos para determinar níveis típicos de contaminação e padrão de crescimento de microrganismos deteriorantes nos produtos de origem marinha (DALGAARD, 2000).

Devido as suas características, o pescado é extremamente vulnerável a proliferação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, aparecendo como um dos principais alimentos associados a Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA),

podendo se deteriorar em um curto período de tempo, mesmo quando submetido à refrigeração (QUINTAES, 2003).

Como a multiplicação microbiana ocorre principalmente na superfície dos peixes e apenas um número limitado de microrganismos invade a musculatura provavelmente a deterioração seja conseqüência da difusão e ação de enzimas bacterianas na musculatura (HUSS, 1995).

López-Gálvez, Hoz e Ordóñez (1995) relataram que a microbiota dominante presente no atum resfriado é formada por bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas.

A musculatura interna de peixes vivos e saudáveis é considerada bacteriologicamente estéril, porém é possível encontrar uma grande concentração de microrganismos no intestino (10^3 - 10^8 UFC/g), brânquias (10^3 - 10^6 UFC/g), pele e muco superficial (variando de 100 a milhões por centímetros quadrados). O número e o tipo de microrganismos encontrados em peixes recém capturados variam de acordo com o local da pesca (qualidade da água, salinidade, etc), a temperatura da água, a sazonalidade e o método de captura (ICMSF, 1974; NICKELSON, McCARTHY e FINNE, 2001).

O prazo de vida comercial dos peixes é determinado pela quantidade e o tipo de bactérias presentes, bem como pela temperatura empregada no armazenamento dos mesmos (NICKELSON, McCARTHY e FINNE, 2001). Liston (1980) afirma que a quantidade de bactérias encontrada no pescado em processo de deterioração é alta. Porém, apenas uma parte pode ser denominada de bactérias especificamente deteriorantes.

A microbiota responsável pela deterioração em peixes frescos varia com as mudanças na temperatura de armazenamento (Quadro 2). Em peixes refrigerados (0-5°C), *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. são as principais bactérias relacionadas com a deterioração. Esta, quando causada por *Shewanella putrefaciens* é caracterizada pela produção de TMA e gás sulfídrico, enquanto que a deterioração causada por *Pseudomonas* spp. é caracterizada pela ausência destes compostos e ocorrência de odores adocicados, fétidos e sulfidrílicos. Entretanto, em temperaturas altas de armazenamento (15-30°C) os principais responsáveis pela deterioração são as diferentes espécies da família *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, bem como bactérias Gram positivas (HUSS, 1995).

Lopes-Sabater et al. (1996) não consideram a família *Enterobacteriaceae* e coliformes totais como parte da microbiota normal do peixe fresco, pois não foram detectadas antes do 3º dia de estocagem a temperatura de 0°C e 24 horas a 8°C.

A microbiota em peixes de água temperada é constituída em grande parte por psicrotroficos Gram negativos, tais como os do gênero *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* e *Flavobacterium*, também sendo comuns bactérias da família *Vibrionaceae* (*Vibrio* e *Photobacterium*) e *Aeromonadaceae* (*Aeromonas* spp.). As bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e coryneformes também podem ser encontradas em proporções menores. Entretanto, a microbiota de peixes tropicais apresenta maior quantidade de *Pseudomonas* spp, *Shewanella putrefaciens* e enterobactérias (LISTON, 1980; HUSS, 1995).

De acordo com Nickelson, McCarthy e Finne (2001) grande parte da deterioração de peixes ocorre pela ação de bactérias do gênero *Pseudomonas*, que metabolizam várias substâncias no tecido muscular originando produtos relacionados à formação de “off-flavours” e “off-odours”, tais como metil mercaptano, dimetil-dissulfeto, gás sulfídrico e trimetilamina. Estas bactérias ao serem quantificadas no pescado recém capturado apresentam-se em quantidades muito menores que as de outros gêneros. Possivelmente a grande capacidade de multiplicação ou de metabolização de moléculas protéicas, bem como suas atividades bioquímicas fazem com que esse gênero bacteriano tenha tanta importância na deterioração do pescado (ibid).

Quando os peixes armazenados apresentam alterações avançadas e são inaceitáveis sensorialmente é possível encontrar uma população bacteriana bastante heterogênea, formada por vários gêneros e espécies bacterianas. Esta população heterogênea é formada à medida que a produção de substâncias provenientes da atividade de *Pseudomonas* spp. aumenta (LISTON, 1980).

Quadro 2: Microbiota dominante e bactérias especificamente deteriorantes relacionados com a deterioração de peixes frescos.

Temperatura de estocagem	Tipo de ambiente	Microbiota dominante	Bactérias especificamente deteriorantes
0°C	Aeróbico	Psicrotróficos Gram-negativos, <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i>	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i>
5°C	Aeróbico	Psicrotróficos Gram-negativos da Família <i>Vibrionaceae</i> , <i>S. putrefaciens</i>	<i>Aeromonas spp.</i> <i>S. putrefaciens</i>
20-30°C	Aeróbico	Mesófilos Gram-negativos, Família <i>Vibrionaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Aeromonas spp.</i> (<i>A. hydrophila</i>)

Fonte: Huss, 1995.

Após a captura, nos peixes tropicais mantidos sob refrigeração o crescimento bacteriano passa por um período denominado de fase de latência, ou fase “lag”, que perdura por uma ou duas semanas, antes que a fase de crescimento exponencial seja atingida. A composição da microbiota também é muito alterada durante a estocagem. Assim, sob resfriamento em meio aeróbico, a microbiota dos peixes tropicais é composta basicamente por *Pseudomonas spp* e *S. putrefaciens* após uma a duas semanas. Ambas são consideradas como bactérias especificamente deteriorantes de peixes armazenados sob refrigeração (HUSS, 1995).

Leitão (1988) afirma que o período de armazenamento em gelo do pescado de origem tropical é maior que aqueles que se originam em águas temperadas. Isto ocorre porque sua microbiota é caracteristicamente composta por bactérias mesofílicas que apresentam reduzida capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração e menor aptidão para produção de compostos de degradação. Outro fator relevante é que em temperaturas tropicais a ação da água de degelo durante o armazenamento realiza a lavagem dos peixes, contribuindo para o aumento do período de armazenamento.

O limite máximo aceitável para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas em musculatura de peixe é de 7 Log UFC ou 10^7 UFC/g de produto analisado (ICMSF, 1974). A legislação brasileira não menciona nenhum valor para

ser adotado como o limite de aceitação para essa contagem na porção muscular dos peixes, adotando o padrão internacional.

Price, Melvin e Bell (1991), estudando as alterações *post-mortem* em albacora (*T. alalunga*) eviscerada e armazenada em gelo (0°C) por 33 dias, encontraram crescimento gradual na contagem de bactérias aeróbias mesófilas até o 9º dia de estocagem (10^3 UFC/g). Porém, no 12º dia foram alcançadas contagens de 10^6 UFC/g e o limite de aceitação estabelecido pela legislação (10^7 UFC/g) foi ultrapassado no 16º dia de estocagem.

Com relação aos odores anormais (“off-odors”) Huss (1995) relacionou esse atributo a uma contagem de mesófilos e/ou psicotróficos de 10^8 - 10^9 UFC/g.

Ben-Gigirey et al.(1998) analisaram 37 espécimes de atum (*T. alalunga*) frescos, realizando a contagem de bactérias aeróbias mesófilas (72 horas a 31°C) e psicotróficas (10 dias a 5°C) em Ágar padrão para a contagem, entre outras análises. Como resultados encontrou uma média de 280 UFC/g nas contagens dos mesófilos (valores variando entre 30 e 500 UFC/g) e 827 UFC/g nas contagens de psicotróficos (valores variando entre 40 e 1700 UFC/g).

Silva, Ponte e Dapkevicius (1998) analisaram *T. obesus* por 12 dias sob temperaturas de 4 e 10°C. As contagens de bactérias aeróbias mesófilas variaram de $<10^2$ UFC/g (dia zero) até 10^7 UFC/g (12º dia) nos atuns armazenados a 4°C, enquanto nos exemplares armazenados a 10°C as contagens alcançaram 10^8 UFC/g no 10º dia de estocagem.

2.2.3 Análise sensorial

A análise sensorial é uma disciplina científica que utiliza os sentidos visuais, olfativos, gustativos, táteis e auditivos para avaliar as características de aparência, odor, sabor e textura dos alimentos. A qualidade destas avaliações depende da amostra em questão, do método de avaliação utilizado e dos julgadores (STONE; SIDEL, 1993; HUSS, 1995). Os métodos de análise sensorial podem ser subjetivos ou objetivos. Os subjetivos são baseados na aceitação ou preferência dos julgadores por um produto podendo ser aplicados em pesquisa de mercado, em teste de consumidor ou desenvolvimento de produto. Por outro lado, os métodos

objetivos podem ser utilizados em inspeções, controle de qualidade e determinação do prazo de vida comercial dos produtos (HUSS, 1995).

De acordo com a finalidade do teste, com o critério de seleção dos julgadores e com a tarefa específica de cada julgador, os métodos sensoriais são classificados em discriminativos, descritivos (sendo ambos testes objetivos) e afetivos (teste subjetivo). Os testes discriminativos são utilizados para determinar se há diferença entre as amostras, enquanto os descritivos são usados para determinar a natureza e a intensidade das características sensoriais das mesmas. Nos testes afetivos ocorre a mensuração de atitudes subjetivas do julgador, como a aceitação ou preferência dos produtos, podendo ser analisados de forma individual ou relacionados a outros produtos (STONE; SIDEL, 1993; HUSS, 1995; CHAVES; SPROESSER, 1996).

Nos testes afetivos os métodos mais empregados para a avaliação de preferência são comparação pareada e ordenação, enquanto na avaliação de aceitação são utilizadas as escalas hedônicas e a escala de atitude (CHAVES; SPROESSER, 1996). De acordo com Stone e Sidel (1993) o método mais utilizado nos testes de aceitação é a escala hedônica estruturada em nove pontos.

Os testes de aceitação requerem equipes com grande número de participantes (acima de 30) que representem a população de consumidores atuais ou potenciais do produto. Na escala hedônica, os provadores expressam a sua aceitação seguindo uma escala previamente estabelecida, que varia gradativamente desde “gostar” até “desgostar”. O objetivo do uso dessa escala é a obtenção de informações sobre a aceitação de produtos pelo consumidor nas fases iniciais de desenvolvimento, além de determinar a aceitação em caso de alteração nas formulações do produto, modificações nos processamentos, nas matérias, nas embalagens, nas condições de estocagem e no tempo de conservação dos alimentos (CHAVES; SPROESSER, 1996).

Birch et al. (1977) relatam que os atributos de aparência, aroma, sabor e textura são importantes na avaliação da qualidade do pescado quando se empregam métodos descritivos, com julgadores treinados. Nos métodos afetivos, com julgadores não treinados, o sabor tem mais influência que a textura na aceitação do produto pelos consumidores.

Ruivo (1988) relatou que o grau de confiança das respostas da análise sensorial está ligado à experiência e capacidade do analista, bem como ao seu treinamento e seu estado emocional. Segundo este autor, as atitudes anteriores ao

processo de análise também são relevantes, pois ao ingerir bebidas pungentes ou fumar, o julgamento pode ficar prejudicado. As informações obtidas devem ser interpretadas em conjunto com as da análises físico-químicas e microbiológicas.

As primeiras alterações sensoriais que acontecem no peixe durante o armazenamento estão relacionadas com o odor, a aparência e a textura, sendo as mudanças no odor desenvolvidas no início da estocagem (CHURCH, 1998). De acordo com Huss (1995) as alterações das características sensoriais dos peixes variam consideravelmente dependendo da espécie e do método de armazenamento utilizado. O quadro 3 mostra uma escala para a avaliação do frescor em atuns crus.

Quadro 3: Escala para avaliação geral do frescor de atuns crus.

Grau de frescor	Aparência geral (pele)	Olhos	Guelras	Textura
Ótimo	Brilho intenso; Intensa pigmentação da pele, com muco transparente.	Olhos convexos e brilhantes; Córnea transparente; Pupilas negras e brilhosas.	Coloração vermelho-brilhosa; Lâmina bem separada, longa e uniforme.	Presença ou parcial desaparecimento do rigor <i>mortis</i> .
Bom	Pequenas perdas na pigmentação e brilho da pele.	Olhos com menor grau de convexidade; Córnea perde levemente sua transparência.	Coloração vermelho-escura; Lâmina aderida em grupos.	Firme e elástica; À pressão digital a pele retorna rápida e completamente ao normal.
Intermediário	Descoloração da pigmentação e perda do brilho; Muco opaco; Pequenas lesões.	Olhos planos; Córneas e pupilas de turvas a levemente opacas;	Coloração vermelho-amarronzada; Lâmina aderida em grupos e com diferentes tamanhos.	Redução na elasticidade e pequenas deformações no corpo.
Ruim	Grandes alterações na pigmentação; Superfície quase sem brilho; Importantes lesões corporais; Muco amarelo; Pele ressecada.	Olhos côncavos; Córnea opaca;	Coloração variando de marrom a marrom-acinzentado; Lâmina totalmente aderida, parcialmente destacada e notavelmente mais curta.	Alterações importantes no formato do peixe

Fonte: Pérez-Villarreal e Pozo (1990); Ben-Gigirey et al., (1999).

Leitão (1988) afirma que é possível verificar uma alteração sensorial no sabor do pescado quando este apresenta altos níveis de histamina, pois sua carne apresenta sabor picante ou apimentado.

Pérez-Villarreal e Pozo (1990) estudaram o atum da espécie *T. alalunga* sendo avaliados os atributos de aparência da pele, olhos, brânquias, musculatura e textura da pele no peixe cru e odor, sabor e textura no peixe cozido. Para estas análises foi utilizada uma equipe treinada composta por oito pessoas que avaliaram os peixes através de escalas previamente elaboradas. Pelo escore obtido nas análises sensoriais, estes autores relataram que 20 dias é o limite de qualidade aceitável para a estocagem de atum em gelo e, com 30 dias o mesmo se apresentava inadequado para o consumo. Isto indicou uma boa correlação entre a avaliação sensorial e o tempo de estocagem em gelo e por isso, concluíram que os escores obtidos nas análises sensoriais (especialmente em peixe cozido) são melhores indicadores de frescor que os parâmetros químicos.

Ababouche et al. (1996) ao determinarem as alterações da qualidade de sardinhas (*Sardina pilchardus*) estocadas sob temperatura de refrigeração (2-4°C) utilizaram uma equipe de quatro a cinco julgadores treinados para avaliar o sabor do peixe cozido, utilizando uma escala hedônica estruturada de nove pontos. Este estudo revelou que a partir do 9º dia de estocagem a rancificação ficou evidenciada, porém a deterioração bacteriana só ficou evidente a partir do 11º dia de armazenamento.

López-Sabater et al.(1996) estudaram a qualidade sensorial objetivando a determinação da formação de histamina durante a decomposição controlada de atuns (*T. thynnus*) mantidos sob temperatura de 0, 8 e 20°C. As análises foram realizadas por três julgadores treinados, que utilizaram uma escala hedônica estruturada em 11 pontos em um intervalo de 21, 6 e 3 dias, respectivamente. Na análise sensorial, os autores definiram que 15 dias é o limite de aceitação para o atum estocado sob temperatura de 0°C, cinco dias para o atum estocado sob temperatura de 8°C e 36 horas para o atum à 20°C. Como nos atuns estocados a 8°C a produção de histamina ultrapassa o limite de 100 ppm no 4º dia de estocagem (antes de alcançar o limite de aceitação sensorial), os autores concluíram que a aparência física não é um bom critério de avaliação para determinar o perigo da formação de histamina neste produto. Assim, aconselharam aos consumidores que o atum, estocado sob temperatura de 8°C, deve ser consumido antes de 3 dias.

Dalgaard (2000) embora confirme que os métodos sensoriais sejam essenciais, relata a importância de serem utilizados métodos instrumentais como forma de complementar a avaliação sensorial, principalmente devido ao custo, ao tempo gasto (principalmente quando se usa julgadores treinados) e à dificuldade de padronização.

Mausse (2000) afirma que a qualidade das avaliações sensoriais depende da amostra a ser analisada, do método de avaliação e dos julgadores utilizados e por isto não é aconselhável empregar os testes sensoriais isoladamente para a avaliação da qualidade do produto, sendo necessário o emprego de outros métodos tais como determinação de BVT, de TMA e de nucleotídeos e seus metabólitos.

Soccol (2002) estudou a determinação do prazo de vida comercial de filés de tilápia *in natura*, que foram separados em dois grupos (controle e embalado em atmosfera modificada). Ambos foram refrigerados a temperatura de 1°C (± 1) e foram armazenados por 1, 7, 13 e 20 dias. A análise sensorial foi realizada com 30 julgadores, que avaliaram os atributos de cor, aroma, textura e aparência com auxílio de uma escala estruturada de 9 pontos. O resultado do estudo revelou que até 20 dias de armazenamento os filés estavam bons para o consumo em ambos os tratamentos e por isso considerou este período como limite de validade.

Borges (2005) realizou um estudo com corvina (*Micropogonias furnieri*) estocada em gelo por 15 dias. Como método sensorial para a avaliação da qualidade foi utilizado o teste de aceitação, sendo testados os atributos de aroma, sabor, textura e impressão global. Os peixes foram avaliados nos dias 0, 7 e 15. O autor concluiu que a corvina analisada no 7º dia obteve maior aceitação, em todos os atributos, que a corvina testada no dia 0. Além disso, a corvina avaliada no dia 0 obteve maior aceitação que a avaliada no 15º dia, exceto para o atributo aroma.

Ruiz-Capillas e Moral (2005) realizaram experimento com *T. obesus* estocados a 3°C por 25 dias. Utilizaram uma equipe de cinco julgadores treinados para avaliação do atum cru e do atum cozido, baseados em uma escala cujos pontos variavam entre 0 e 10. Como resultados descobriram que a rejeição do peixe cru ocorreu no 13º dia de estocagem, enquanto que no peixe cozido a rejeição se estabeleceu no 18º dia. As análises não se relacionaram claramente com os índices bioquímicos encontrados, pois nenhum lote foi rejeitado com base nas análises bioquímicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será relacionado todo material empregado para o desenvolvimento da parte experimental deste estudo, assim como a metodologia utilizada.

3.1 MATERIAL

Os materiais utilizados foram subdivididos em material de consumo, material permanente e material biológico e são assim discriminados.

3.1.1 Reagentes utilizados

- ✦ Acetona P.A.- Proquimios;
- ✦ Agar Padrão para Contagem - Merck;
- ✦ Álcool Metílico P.A.- Merck;
- ✦ Cadaverina 2 HCl - Sigma;
- ✦ Hidróxido de Amônio P.A.- Reagen;
- ✦ Histamina 2HCl - Sigma;
- ✦ Solução de Ácido Bórico de Conway;
- ✦ Solução de Ácido Clorídrico 0,1 N;
- ✦ Solução de Ácido Tricloroacético a 4%;
- ✦ Solução de Ácido Tricloroacético a 10%;
- ✦ Solução de Formaldeído a 35%;
- ✦ Solução de Ninhidrina 3%;
- ✦ Solução de Tricloreto de Titânio a 1%;

- ✦ Solução Salina Peptonada a 0,1%;
- ✦ Solução saturada de Carbonato de Potássio;
- ✦ Solução tampão pH 4,0;
- ✦ Solução tampão pH 7,0;

3.1.2 Equipamentos e materiais de uso geral

- ✦ Agitador de tubos tipo Vortex – Braun Biotech International;
- ✦ Autoclave - Fabee;
- ✦ Balança de precisão – Mettler AE 200;
- ✦ Centrífuga - Hermle Z 360 K;
- ✦ Contador de Colônias marca Quebec Darkfield;
- ✦ Cuba Cromatográfica;
- ✦ Dessecador;
- ✦ Destilador - Quimis;
- ✦ Envelopes plásticos de homogeneização para Stomacher;
- ✦ Erlenmeyer de Kitasato;
- ✦ Espátula;
- ✦ Estufa regulada a 35-37°C;
- ✦ Estufa regulada a 105°C;
- ✦ Forno elétrico – Firenzi Nardelli
- ✦ Funil de Büchner;
- ✦ Geladeira Brastemp regulada a 4°C;
- ✦ Homogeneizador (Waring Blender);
- ✦ Homogeneizador Stomacher - Seward (modelo 80);
- ✦ Máquina fotográfica – Olympus D-425;
- ✦ Microbureta de 5 μ L;
- ✦ Microseringa de 10 μ L – Terumo UMS 10;
- ✦ Papel filtro Wathman n° 5;
- ✦ Pinça;
- ✦ Pipeta automática de 100-1000 μ L - Eppendorf;
- ✦ Placa de microdifusão de Conway com tampa;
- ✦ Placa de Petri descartável;

- ✦ Placa de Sílica gel em poliéster – Sigma - Aldrich;
- ✦ Potenciômetro – Schott Gerate;
- ✦ Tesoura;
- ✦ Tubos de Eppendorf;
- ✦ Vidraria comum de laboratório.

3.1.3 Material biológico

Foram utilizados dez exemplares de atum da espécie *Thunnus atlanticus* (fig. 2).



Figura 2: Exemplar de atum (*Thunnus atlanticus*) utilizado neste estudo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estratégia experimental

As amostras de atum utilizadas para a realização deste estudo foram obtidas diretamente de barcos pesqueiros provenientes da Região dos Lagos do Rio de Janeiro (entre as cidades de Arraial do Cabo e Cabo Frio) no período de agosto de 2005 a janeiro de 2006.

Imediatamente após a obtenção, os peixes foram acondicionados em recipientes isotérmicos de poliestireno expandido com gelo e transportados à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde foram realizados os procedimentos analíticos previstos, para cada grupo de análises.

Para as análises bacteriológicas foram utilizados três exemplares de atum, sendo um com pele e dois sem pele. Para as análises físico-químicas e sensoriais foram utilizados cinco e dois exemplares de atum respectivamente.

As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da UFF e constavam de Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas (CBHAP). As análises físico-químicas, realizadas no Laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos da UFF, determinaram os valores de OTMA, BVT, TMA, pH, umidade e a produção das aminas biogênicas histamina e cadaverina. Para as análises sensoriais, realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da UFF, foi feito teste de aceitação com 60 julgadores não treinados.

3.2.2 Preparo das amostras

Todas as amostras utilizadas, independente do destino analítico, foram lavadas em água corrente, evisceradas e armazenadas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por um período que variou entre 10 e 19 dias.

As análises físico-químicas e bacteriológicas ocorreram no dia da recepção e acompanhadas pelos testes propostos em dias alternados, até o aparecimento de características de deterioração. Todas estas análises foram realizadas em duplicata. Na análise sensorial, os atuns foram avaliados no dia da recepção (dia zero) e no 9º dia de armazenamento por julgadores não treinados.

3.2.3 Análises físico-químicas

Cada atum foi dividido em três porções, seguindo as orientações de Yamagata, Horimoto e Nagaoka. (1969). Para a obtenção destas porções musculares foram feitos cortes perpendiculares (Figura 3) na margem do opérculo

(a), na sétima espinha da primeira nadadeira dorsal (b), no ânus (c) e na quarta nadadeira dorsal (d) (YAMAGATA, HORIMOTO E NAGAOKA, 1969).

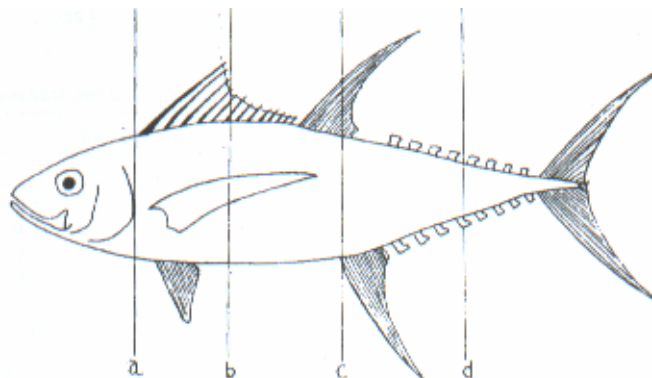


Figura 3: Localização das incisões para a obtenção das porções musculares do atum.

Fonte: Yamagata, Horimoto e Nagaoka, 1969.

Após a obtenção de cada porção muscular, foram separadas alíquotas para as análises de OTMA (cinco gramas), BVT (50 gramas), TMA (50 gramas), pH (10 gramas), histamina e cadaverina (um grama cada). Cada amostra foi devidamente identificada e mantida sob refrigeração até o momento das análises.

3.2.3.1 Avaliação do teor de Óxido de Trimetilamina

A determinação do OTMA foi realizada segundo a técnica descrita por Yamagata Horimoto e Nagaoka (1969), utilizando as modificações sugeridas por Parking e Hulting (1982).

Para a determinação do valor de OTMA a alíquota de cinco gramas foi homogeneizada com uma solução de 20mL de ácido tricloroacético a 4% por um minuto com auxílio de homogeneizador Waring Blender. A seguir, a mistura obtida ficou em repouso para então ser filtrada em papel filtro com o auxílio de uma bomba a vácuo. Após a filtração foi obtido um extrato que foi utilizado para o desenvolvimento da técnica.

Para a realização da técnica utilizou-se 2mL do extrato previamente obtido e a este adicionou-se 1mL de solução de $TiCl_3$ a 1%. Esta mistura foi imediatamente levada à banho-maria a $80^\circ C$ por um minuto e meio com o intuito de completar totalmente a redução do OTMA a TMA. A seguir, esta solução foi submetida à análise de TMA, que foi quantificada pelo método de microdifusão em placas de

Conway (método descrito a seguir no item 3.2.3.3). Para determinar o valor de OTMA presente na amostra foi calculada a diferença entre os valores de TMA do extrato reduzido (obtido nesta etapa) e do extrato não reduzido (obtido na análise de TMA).

3.2.3.2 Avaliação da produção de Bases Voláteis Totais

A determinação de BVT foi realizada através do método de microdifusão em placas de Conway. Este método tem como princípio a liberação do nitrogênio volátil presente na amostra através da adição de solução de carbonato de potássio. O nitrogênio volátil liberado irá se difundir em uma solução de ácido bórico que, posteriormente, sofrerá uma titulação com ácido clorídrico (CONWAY; BYRNE, 1933).

Para a determinação dos valores de BVT foi realizada a homogeneização da alíquota de 50 gramas da porção muscular adicionando 50mL de ácido tricloroacético a 10% por um minuto em Waring Blender. A mistura obtida ficou em repouso sendo a seguir filtrada à vácuo para obtenção do extrato, que foi utilizado para as análises.

Para o desenvolvimento da técnica mencionada foi adicionado 2mL de solução de ácido bórico de Conway no compartimento central da placa de microdifusão e 2mL de extrato de pescado no compartimento externo. A placa foi parcialmente tampada com tampa de vidro, deixando apenas uma pequena abertura no compartimento externo para que posteriormente fosse adicionado 2mL de solução saturada e filtrada de carbonato de potássio. A placa foi fechada e o conteúdo externo foi homogeneizado suavemente, sendo a seguir colocada em estufa regulada a 35-37°C por duas horas. Para finalizar, as bases voláteis que se difundiram no ácido bórico foram tituladas com uma solução de ácido clorídrico a 0,1N.

Para o cálculo do valor de BVT utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{mg de N - BVT/100 g} = \frac{V \times N \times 14 \times 100 \times (T + U)}{V_a \times P}$$

Onde:

V = mL de HCL 0,01 N gastos na titulação de BVT.

N = normalidade da solução de HCL.

T = volume da solução de ácido tricloroacético usado.

U = umidade da amostra.

Va = volume da alíquota analisada.

P = peso da amostra utilizada no preparo do extrato.

3.2.3.3 Avaliação da produção de Trimetilamina

A TMA foi determinada pelo método de microdifusão em placas de Conway (CONWAY; BYRNE, 1933) seguindo as modificações preconizadas pelo Manual do LANARA (BRASIL, 1981).

O procedimento adotado nesta análise foi semelhante ao utilizado na análise de BVT, porém com a particularidade da adição de formol ao extrato antes da adição do álcali. O objetivo desta adição foi permitir apenas a difusão da TMA na placa, pois ao reagir com o formol a amônia se converte em hexametenotetramina e, conseqüentemente, não se difunde na placa.

Para cada análise de TMA realizada foram utilizadas 20 gotas de formol, previamente neutralizado, à concentração de 35%. Essas gotas foram adicionadas no compartimento externo da placa logo após a adição do extrato. Somente após esta adição foi acrescentado o carbonato de potássio ao extrato.

O cálculo do valor de TMA foi efetuado da mesma maneira já citada para quantificação das BVT.

3.2.3.4 Avaliação do pH

Para avaliação do pH foi utilizado o método potenciométrico descrito no Manual do LANARA (BRASIL, 1981).

Inicialmente o pHmetro foi aferido utilizando-se uma solução tampão pH 7 a 20°C. A seguir, foi realizada a homogeneização da amostra utilizando-se 10mL de água destilada e posteriormente introduziu-se o eletrodo do pHmetro e realizou-se a leitura direta.

3.2.3.5 Avaliação da produção de Histamina

A determinação dos níveis de histamina nos peixes analisados foi realizada segundo metodologia descrita por Schutz, Chang e Bjeldanes (1976), utilizando as modificações sugeridas por Bersot, São Clemente e Santos, (1996).

Foi adicionado 2mL de metanol a um tubo de ensaio contendo 1g de amostra. O tubo foi homogeneizado em agitador tipo Vortex com o auxílio de uma espátula e depois foi aquecido em banho-maria a 100°C, para facilitar a coagulação das proteínas e liberação das aminas biogênicas no metanol. A seguir, o tubo foi encaminhado para a centrifuga, onde permaneceu por 2 minutos, e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da histamina.

Paralelamente foi preparado o tanque de cromatografia com a adição de uma mistura de solventes constituído por acetona e hidróxido de amônio na proporção de 20:1 v/v. Após a adição dos solventes, o tanque foi fechado para equilíbrio da atmosfera interna.

Para a avaliação da produção de histamina foram utilizadas placas de 5 x 10cm e nelas foram aplicados os padrões e as amostras em locais previamente determinados. Os padrões de histamina de 2 μ L, 5 μ L, e 10 μ L foram aplicados à placa com o auxílio de uma microseringa. As quantidades aplicadas correspondiam, respectivamente, a 2, 5 e 10mg de histamina/100g de amostra. Em relação a amostra, foi aplicada a placa 10 μ L do sobrenadante obtido na centrifugação da amostra através de uma pipeta automática.

Logo após seu preparo, a placa foi inserida verticalmente no interior do tanque de cromatografia que foi imediatamente fechado para que houvesse a corrida cromatográfica. Ao término desta, a placa foi retirada do tanque com uma pinça e secada com fluxo de ar quente e contínuo para a retirada do excesso de hidróxido de amônio e a seguir colocada em estufa regulada a 35°C por cerca de uma hora. Após este período a placa foi retirada da estufa e recebeu asperção uniforme com solução de ninhidrina a 3% seguida por novo fluxo de ar quente e contínuo. Este procedimento faz-se necessário para que o processo de revelação e de obtenção das manchas correspondentes aos padrões de histamina e da amostra fosse apropriado.

O resultado foi obtido comparando-se as manchas dos padrões de histamina com as manchas de mesmo deslocamento das amostras.

3.2.3.6 Avaliação da produção de Cadaverina

A determinação dos níveis de cadaverina nos peixes analisados foi realizada segundo a mesma metodologia já descrita para a histamina, porém o padrão utilizado na aplicação das placas foi o padrão de cadaverina.

3.2.3.7 Avaliação do teor de Umidade

Esta determinação foi realizada com objetivo de obter o valor exato de umidade nas amostras para o cálculo da produção de BVT. Esta prova é baseada na metodologia descrita no Manual do LANARA (BRASIL, 1981), que se fundamenta na perda de umidade e substâncias voláteis a 105°C.

Foram pesadas cerca de 5 gramas de amostra previamente homogeneizadas que foram acondicionadas em uma cápsula de porcelana e levadas para estufa regulada a 105°C durante três horas. Após este período, a cápsula foi retirada da estufa passando a um dessecador onde permaneceu por cerca de 30 minutos. A seguir a cápsula foi pesada e retornou para a estufa.

Esse processo (aquecimento, resfriamento e pesagem) foi repetido até a obtenção de peso constante e a diferença entre o peso final e o peso inicial da amostra foi anotado para que posteriormente o resultado fosse calculado, a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ umidade a } 105^{\circ}\text{C} = \frac{100 \times p}{p'}$$

Onde:

p = perda de peso em gramas.

p' = peso da amostra em gramas.

3.2.4 Análises bacteriológicas

3.2.4.1 Preparo das soluções e meios de cultura

As soluções e os meios de cultura utilizados durante as análises foram preparados segundo metodologia descrita por Mossel e Quevedo (1967) e Midura (2001) respectivamente. Para o meio de cultura comercial foram seguidas as recomendações do fabricante (MERCK, 1996).

3.2.4.2 Cuidados higiênico-sanitários

Antes de executar as análises propriamente ditas foram adotados alguns cuidados higiênico-sanitários evitando a contaminação da amostra e conseqüentemente mantendo as características próprias do produto. Foi realizada a lavagem correta das mãos (com sabonete líquido inodoro, seguido por enxágüe abundante), sanificação da bancada utilizada na câmara asséptica com álcool a 70%, flambagem de todos os utensílios usados (como bisturi, tesoura, pinça e bandeja de aço inox).

3.2.4.3 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas

A metodologia utilizada foi a descrita por Morton (2001).

Trabalhando sob condições de esterilidade, foram coletadas 25 gramas de amostra de forma representativa apenas da porção muscular do atum (*T. atlanticus*) sendo depositadas em envelopes plásticos para homogeneização. A seguir, foi acrescentado 225mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1% à amostra, que posteriormente foi homogeneizada em *Stomacher* na velocidade normal por 120 segundos.

Após a realização da homogeneização foi obtida a diluição de 10^{-1} que foi a base para a obtenção das demais diluições, as quais foram realizadas com a utilização da técnica de miniaturização (FRANCO; MANTILLA, 2004). Com base nesta técnica, foram transferidos 100 μ L da diluição 10^{-1} para tubos tipo Eppendorf

contendo 900 µL de SSP a 0,1%, e assim foi obtida a diluição de 10^{-2} . As demais diluições foram obtidas através do mesmo método. A seguir realizou-se o plaqueamento das amostras em meio Ágar Padrão para Contagem utilizando a técnica "Pour-Plate".

Após a distribuição das alíquotas das diluições nas placas, o meio de cultura vertido foi homogeneizado. Após a solidificação do Agar as placas foram incubadas em estufa à temperatura de 35-37°C por 24-48 horas. Com o término da incubação foram selecionadas as placas que apresentavam entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para procedimento da contagem (SWANSON, PETRAN e HANLIN, 2001).

O resultado final das contagens foi corrigido, multiplicando o valor obtido por 10, que é o fator de correção para obtenção do número de UFC presente em 1 g de amostra, na técnica empregada (miniaturização das diluições).

3.2.4.4 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicotróficas

A metodologia utilizada foi a mesma descrita para as bactérias aeróbias mesófilas. O que diferiu entre ambas foi o local, a temperatura e o tempo de incubação (geladeira regulada a aproximadamente 4°C por 10 dias), seguindo as recomendações descritas por Cousin, Jay e Vasavada (2001). O plaqueamento, a contagem das UFC nas placas selecionadas e a obtenção dos resultados também seguiram a mesma metodologia anteriormente descrita para as bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas.

3.2.5 Análise Sensorial

Os atuns utilizados para as análises sensoriais foram avaliados por 60 julgadores não treinados. Para a realização da análise sensorial foi empregado o teste de aceitação realizado no dia zero (30 julgadores) e no nono dia de armazenamento (30 julgadores). O grau de aceitação foi demonstrado em escala hedônica estruturada de nove pontos para os atributos de sabor, textura e impressão global (STONE; SIDEL, 1993).

Os pontos da escala variaram desde o termo hedônico “gostei extremamente”, passando pelo “indiferente” até o termo “desgostei extremamente”.

3.2.5.1 Preparo das amostras

O atum foi envolto em papel alumínio e cozido em forno elétrico a uma temperatura de cerca de 250°C por uma hora e trinta minutos. Ao final desse período pele e escamas foram retirados, obtendo-se apenas as porções musculares. Estas foram filetadas e cortadas em cubos de cerca de dois centímetros, para serem servidas aos julgadores logo a seguir.

3.2.5.2 Procedimento adotado

As análises foram realizadas sob condições laboratoriais (cabine individual equipada com luz branca) utilizando julgadores não treinados, consumidores selecionados ao acaso.

As amostras foram previamente identificadas com números aleatórios de três dígitos e posteriormente apresentadas de forma monádica aos julgadores em pratos descartáveis, acompanhadas por um copo contendo água para a higiene bucal e a ficha de avaliação (figuras 4 e 5). Nesta foram assinalados os julgamentos em relação aos atributos requeridos. O modelo de ficha utilizada no teste de aceitação e entregue aos degustadores se encontra na figura 6.

O teste de aceitação foi realizado com 60 consumidores em potencial do produto, sendo 37% do sexo masculino e 73% do sexo feminino, com idade variando entre 20 e 54 anos.



4 5
 Figura 4 e 5: Material utilizado na análise sensorial de atuns (*T. atlanticus*) cozidos e apresentação de amostra a julgador não treinado.

Nome: _____ Sexo: F() M() Idade: _____

Nº da amostra _____

Por favor, avalie a amostra utilizando as escalas abaixo. Marque a posição que melhor reflita seu julgamento em relação à característica discriminada no alto de cada escala.

SABOR		TEXTURA		IMPRESSÃO GLOBAL	
<input type="checkbox"/>	Gostei Extremamente	<input type="checkbox"/>	Gostei Extremamente	<input type="checkbox"/>	Gostei Extremamente
<input type="checkbox"/>	Gostei Muito	<input type="checkbox"/>	Gostei Muito	<input type="checkbox"/>	Gostei Muito
<input type="checkbox"/>	Gostei Moderadamente	<input type="checkbox"/>	Gostei Moderadamente	<input type="checkbox"/>	Gostei Moderadamente
<input type="checkbox"/>	Gostei Ligeiramente	<input type="checkbox"/>	Gostei Ligeiramente	<input type="checkbox"/>	Gostei Ligeiramente
<input type="checkbox"/>	Indiferente	<input type="checkbox"/>	Indiferente	<input type="checkbox"/>	Indiferente
<input type="checkbox"/>	Desgostei Ligeiramente	<input type="checkbox"/>	Desgostei Ligeiramente	<input type="checkbox"/>	Desgostei Ligeiramente
<input type="checkbox"/>	Desgostei Moderadamente	<input type="checkbox"/>	Desgostei Moderadamente	<input type="checkbox"/>	Desgostei Moderadamente
<input type="checkbox"/>	Desgostei Muito	<input type="checkbox"/>	Desgostei Muito	<input type="checkbox"/>	Desgostei Muito
<input type="checkbox"/>	Desgostei Extremamente	<input type="checkbox"/>	Desgostei Extremamente	<input type="checkbox"/>	Desgostei Extremamente

Figura 6: Ficha de avaliação apresentada aos julgadores não treinados, contendo os atributos de sabor, textura e impressão global em escala hedônica estruturada de nove pontos.

3.2.5.3 Análise dos resultados

As fichas de avaliação devidamente preenchidas pelos julgadores foram analisadas separadamente para cada tratamento e a classificação obtida foi transformada em valores numéricos. Cada termo recebeu uma pontuação que variou de um (“desgostei extremamente”) a nove (“gostei extremamente”), como indicado no quadro 4, e posteriormente esse números foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) em delineamento em blocos casualizados ao nível de 5% de significância para obtenção dos resultados.

Quadro 4: Valores numéricos para a pontuação dos termos hedônicos na análise dos resultados do teste de aceitação.

Classificação na escala	Escore
Gosta Extremamente	9
Gosta Muito	8
Gosta Moderadamente	7
Gosta Ligeiramente	6
Indiferente	5
Desgosta Ligeiramente	4
Desgosta Moderadamente	3
Desgosta Muito	2
Desgosta Extremamente	1

Fonte: Chaves; Sproesser, 1996.

3.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados obtidos nas análises de OTMA, BVT e TMA foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) em fatorial 9³(nove dias e três porções musculares diferentes) para testar principalmente a diferença entre as porções musculares dos atuns e a interação entre fatores. Em seguida, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) para testar o efeito de tempo de estocagem, seguido de teste de Tukey ao nível de

5% de significância para a comparação das médias. Os valores de pH foram tratados estatisticamente em DIC, conforme citado anteriormente.

Ainda em relação aos valores obtidos nas análises de OTMA, BVT, TMA e pH, foram ajustadas equações de regressão linear em função do tempo de estocagem (19 dias sob temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Com os valores encontrados nas contagens bacterianas (CBHAM e CBHAP) empregou-se análise de regressão, no modelo linear.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises bacteriológicas, físico-químicas e sensoriais, realizadas durante o período de estocagem sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$), em exemplares de atum (*T. atlanticus*) se encontram relacionados nas tabelas e representações gráficas a seguir.

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS:

4.1.1 OTMA

Os valores médios obtidos nos 19 dias de estocagem a 4°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) nas porções estudadas encontram-se na tabela 1. Como previsto e, considerando o grau de frescor dos exemplares, os maiores valores foram observados no primeiro dia de armazenamento e foram semelhantes nas três porções (20,57, 20,16 e 20,16 mg%). De acordo com os dias de estocagem estes valores foram decrescendo e, no 19º dia foram evidenciados valores inferiores nas três porções (5,40; 5,81 e 4,99 mg%).

Tabela 1: Valores médios de Óxido de Trimetilamina (OTMA) em mg N/100g obtidos nas porções 1, 2 e 3 dos cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Dias de estocagem	OTMA		
	Porção 1*	Porção 2*	Porção 3*
Dia 1	20,57	20,16	20,16
Dia 3	12,00	11,60	13,05
Dia 5	10,29	11,16	11,78
Dia 7	9,64	9,87	10,73
Dia 10	7,53	7,91	7,30
Dia 12	6,25	6,25	7,1
Dia 14	6,45	6,66	6,25
Dia 17	6,04	5,81	5,84
Dia 19	5,40	5,81	4,99

* Correspondem às porções anatômicas cranial (porção 1), média (porção 2) e caudal (porção 3) dos atuns analisados.

A partir dos valores encontrados em cada porção estudada pode-se afirmar que houve efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de estocagem sobre os valores de OTMA. Entretanto, estatisticamente não houve efeito significativo ($p > 0,05$) dentre as porções estudadas sobre estes valores de OTMA. Além disso, não foi verificado efeito significativo ($p > 0,05$) na interação entre tempo e porção, indicando que o tempo de estocagem não depende do local de coleta, ou seja, os efeitos são independentes entre si (tempo e porção analisada).

4.1.2 BVT

A produção de BVT na musculatura do atum foi acompanhada nos 19 dias de estocagem sob refrigeração ($4^\circ \pm 1^\circ\text{C}$) objetivando avaliar o prazo de vida comercial. Os valores médios encontrados estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2: Valores médios de Bases Voláteis Totais (BVT), em mg N/100g, obtidos nas porções 1, 2 e 3 dos cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Dias de estocagem	BVT		
	Porção 1*	Porção 2*	Porção 3*
Dia 1	14,78	14,59	14,59
Dia 3	17,45	16,63	17,04
Dia 5	16,83	17,24	18,68
Dia 7	18,68	20,53	19,29
Dia 10	20,32	20,93	19,71
Dia 12	20,32	22,58	21,76
Dia 14	20,94	22,79	22,99
Dia 17	23,19	23,81	24,84
Dia 19	26,06	25,25	29,96

* Correspondem às porções anatômicas cranial (porção 1), média (porção 2) e caudal (porção 3) dos atuns analisados.

Também não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os valores de BVT nas três porções estudadas. Entretanto, o tempo de estocagem influenciou significativamente ($p < 0,05$) sobre os valores de BVT.

Os valores observados no dia 1 nas três porções foram semelhantes (14,78; 14,59 e 14,59 mg N/100g) e estes aumentaram gradativamente até o 19º dia de estocagem (26,06; 25,25 e 29,96 mg N/100g). É importante salientar que como estes valores não alcançaram o limite preconizado pela legislação vigente (30 mg N/100g) foi efetuada uma análise no 21º dia de estocagem, cujos valores obtidos foram 27,72; 25,87 e 37,57 mg N/100g, respectivamente para as porções 1, 2 e 3. Como na porção 3 o valor ultrapassou o limite de 30 mg N/100g, considerou-se como limite o prazo de 19 dias de estocagem.

Assim como para os valores de OTMA, também foi possível afirmar com segurança, que houve efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de estocagem sobre os valores de BVT e que não houve efeito estatístico significativo ($p > 0,05$) entre as porções analisadas sobre os valores de BVT. Também não foi verificado efeito estatístico significativo ($p > 0,05$) na interação entre tempo e porção, indicando que o tempo de estocagem não depende do local de coleta, evidenciando que os efeitos são independentes entre si.

4.1.3 TMA

A TMA é produzida essencialmente no peixe refrigerado e está relacionada com a degradação bacteriana do OTMA com conseqüente modificação no odor.

Os valores médios observados durante os 19 dias de estocagem estão inclusos na tabela 3.

Tabela 3: Valores médios de Trimetilamina (TMA), em mg N/100g, obtidos nas porções 1, 2 e 3 dos cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Dias de estocagem	TMA		
	Porção 1*	Porção 2*	Porção 3*
Dia 1	3,89	4,31	4,31
Dia 3	4,92	5,13	3,69
Dia 5	4,51	4,92	4,31
Dia 7	4,51	4,93	4,72
Dia 10	5,34	4,93	4,93
Dia 12	5,34	5,34	5,13
Dia 14	5,13	4,93	5,33
Dia 17	5,54	5,13	5,74
Dia 19	5,54	5,13	5,95

* Correspondem às porções anatómicas cranial (porção 1), média (porção 2) e caudal (porção 3) dos atuns analisados.

Houve efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) entre o tempo de estocagem sobre a produção de TMA. Entretanto, não houve efeito significativo ($p > 0,05$) entre as três porções analisadas sobre estes valores. Também não foi verificado efeito estatístico significativo ($p > 0,05$) na interação entre tempo e porção, indicando que o tempo de estocagem não depende do local de coleta, evidenciando que os efeitos são independentes entre si.

Nos apêndices 8.1 e 8.2 é possível visualizar as análises de variância realizadas com os resultados das pesquisas de OTMA, BVT e TMA.

Por não ter sido observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as porções analisadas, foram utilizados os valores médios obtidos das três porções do atum em cada dia de avaliação (1° ao 19° dia) para compor os resultados estatísticos. Estes valores estão inseridos na tabela 4.

Tabela 4: Valores médios obtidos na análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância para as variáveis Óxido de Trimetilamina (OTMA), Bases Voláteis Totais (BVT) e Trimetilamina (TMA), em mg N/100g, obtidos nos atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem pelo período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Dias de estocagem	ANÁLISES		
	OTMA	BVT	TMA
Dia 1	20,29 ^a	14,65 ^g	4,10 ^c
Dia 3	12,15 ^b	16,28 ^{f, g}	4,17 ^c
Dia 5	11,08 ^b	17,31 ^{e, f}	4,58 ^{b, c}
Dia 7	10,08 ^{b, c}	19,50 ^{d, e}	4,92 ^a
Dia 10	7,38 ^{c, d}	20,05 ^{b, c}	5,06 ^{a, b}
Dia 12	6,53 ^d	21,55 ^{c, d}	5,27 ^{a, b}
Dia 14	6,38 ^d	21,96 ^{b, c}	5,13 ^{a, b, c}
Dia 17	5,90 ^d	23,95 ^b	5,47 ^a
Dia 19	5,33 ^d	27,09 ^a	5,54 ^a

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$) na análise de variância (ANOVA).

4.1.4 pH

Avaliou-se o pH das amostras nos diferentes dias de estocagem sob refrigeração sendo os resultados apresentados na tabela 5. Esses valores variaram entre 5,79 no 1º dia a 5,98 no 19º dia, não demonstrando aumento significativo ($p > 0,05$) e não alcançando o limite oficial preconizado pela legislação vigente.

Tabela 5: Valores médios de pH, obtidos nas análises de cinco exemplares de atuns (*T. atlanticus*) analisados em nove tempos de estocagem por um período de 19 dias em temperatura de 4°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Dias de estocagem	pH
1	5,79
3	5,87
5	5,84
7	5,87
10	5,92
12	5,92
14	5,97
17	5,96
19	5,98

Na tabela 6 estão apresentados os modelos de equação linear para os valores de OTMA, BVT, TMA e pH para o atum em função dos tempos de estocagem. Os resultados observados nesta tabela indicam que houve correlação linear significativa nos valores de OTMA, BVT, TMA e pH em função do tempo de estocagem do atum a uma temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Tabela 6: Modelos de equação de regressão dos valores de OTMA, BVT, TMA e pH (Y) em função do tempo de estocagem a uma temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (Prob.) para atum (*T. atlanticus*).

Determinações	Modelo de regressão	R^2	Prob>F
OTMA	$Y=15,90 - 0,66.X$	0,66	0,0001
BVT	$Y=14,24 + 0,62.X$	0,79	0,0001
TMA	$Y=4,13 + 0,08.X$	0,51	0,0001
pH	$Y=5,78 + 0,01.X$	0,69	0,0001

4.1.5 Histamina e cadaverina

As cinco amostras de atum foram estudadas com relação à produção de histamina e cadaverina em 19 dias de estocagem a 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e os resultados podem ser visualizados na tabela 7.

Quanto à produção de histamina verificou-se que no 1º dia de estocagem esta amina não foi detectada em nenhum dos cinco peixes, fato que se repetiu até o 3º dia nos três primeiros peixes estudados. A produção de níveis compatíveis com perda de qualidade foi alcançada a partir do 7º dia de estocagem nos peixes 4 e 5, enquanto que os outros peixes só alcançaram esses níveis a partir do 14º dia de estocagem. Esses valores podem ser explicados pelo período de captura dos peixes (sazonalidade), pois os exemplares 4 e 5 foram capturados no verão, enquanto os outros três exemplares foram capturados no inverno (peixe 1) e outono (peixes 2 e 3).

Nos exemplares 4 e 5 as concentrações de histamina ultrapassaram o limite estabelecido pela legislação (10mg/100g) no 10º dia de armazenamento, enquanto

que os exemplares 1, 2 e 3 chegaram ao último dia de estocagem com níveis entre 5 e 10mg/100g de amostra.

Quanto à produção de cadaverina, esta foi analisada em função da possibilidade de potencializar a ação da histamina, sendo sua presença importante sob este ponto de vista e para o controle de qualidade e serviços das indústrias. Verificou-se que no 1º dia de estocagem esta amina também não foi detectada em nenhum dos cinco peixes estudados. Esta situação se repetiu até o 3º dia nos exemplares 2 e 3 e até o 7º dia no exemplar 1.

A cadaverina atingiu níveis entre 5 e 10 mg/100g de amostra a partir do 7º dia de estocagem no caso do exemplares 4, a partir do 10º dia no exemplar 5 e, nos outros exemplares, esses níveis foram alcançados a partir do 14º dia.

Todos os peixes chegaram ao final do período de estocagem com o mesmo nível de cadaverina.

Tabela 7: Valores da formação de histamina e cadaverina (mg/100g) detectados nas análises dos cinco exemplares de atum (*T. atlanticus*) em nove tempos de estocagem por um período de 19 dias em temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Dia	Histamina					Cadaverina				
	Atum 1	Atum 2	Atum 3	Atum 4	Atum 5	Atum 1	Atum 2	Atum 3	Atum4	Atum 5
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	ND	ND	ND	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$
5	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	ND	<2	<2	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$
7	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	ND	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 2 \leq 5$
10	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	>>10	>10	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$
12	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	*	*	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 2 \leq 5$	*	*
14	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	*	*	$\geq 2 \leq 5$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	*	*
17	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	*	*	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	*	*
19	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	*	*	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	$\geq 5 \leq 10$	*	*

* Peixes não analisados devido às características sensoriais de deterioração.

ND: não detectado

Na figura 7 observa-se o resultado da cromatografia de camada delgada realizada neste estudo. É possível visualizar deslocamento dos padrões de histamina e cadaverina nas amostras analisadas.

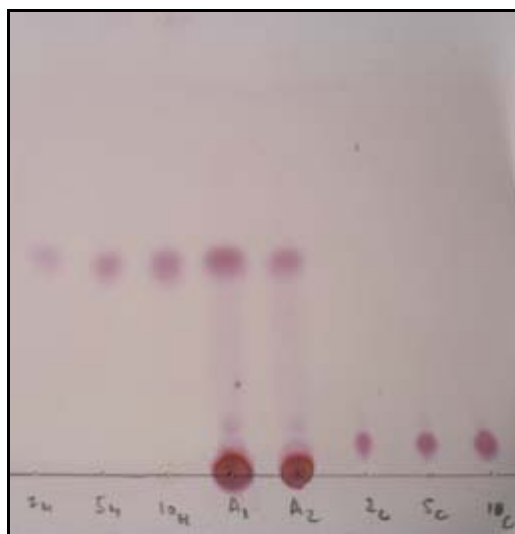


Figura 7: Placa de sílica gel (SIGMA®) revelada com solução de ninhidrina a 3% demonstrando o deslocamento dos padrões de histamina e cadaverina das amostras com quantidade superior ao padrão de 10mg/100g.

4.1.6 Umidade

O teor de umidade foi realizado somente nas amostras frescas com objetivo de encontrar o valor exato para ser utilizado na fórmula para calcular a produção das BVT. A média obtida entre as cinco amostras foi de 76%.

4.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Neste item serão descritos os resultados obtidos nas análises bacteriológicas realizadas nos três exemplares de atum.

4.2.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicotróficas (CBHAP)

Os resultados obtidos nas contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) e psicotróficas (CBHAP) dos atuns com pele e sem pele armazenados por um período de 19 dias em temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) podem ser visualizados na tabela 8.

De acordo com os valores expostos nesta tabela, observa-se que a contagem inicial de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas dos atuns com pele se encontrava fora do padrão estabelecido pela legislação vigente (7 Log UFC), alcançando valores muito elevados no final do período de armazenamento em ambos os casos (16 Log UFC).

Com referência à contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas dos atuns sem pele pode-se observar que até o 9º dia de estocagem os valores estavam dentro do limite de aceitação (5 Log UFC). Porém, a partir do 11º dia a contagem alcançou níveis elevados (12 Log UFC), acima do padrão permitido pela legislação.

A partir dos valores inseridos na tabela 8 é possível verificar que o crescimento das bactérias psicrotróficas no atum sem pele foi semelhante ao crescimento das bactérias mesófilas (atum sem pele), pois até o 9º dia de estocagem o valor da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas encontrava-se dentro do limite aceitável (7 Log UFC/g), porém, a partir do 11º dia a contagem alcançou níveis elevados (12 Log UFC/g), acima do padrão permitido pela legislação. No final do período de estocagem, o valor da contagem foi de 18 Log UFC/g, bem acima do valor estipulado como limite (7 Log UFC/g).

Tabela 8: Valores médios das Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrotróficas (CBHAP), em três exemplares de atuns (*T. atlanticus*) com e sem pele por um período de 19 dias de estocagem sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Dias de estocagem	Atum com pele		Atum sem pele	
	CBHAM (Log)	CBHAP (Log)	CBHAM (Log)	CBHAP (Log)
1	8	9	4	5
3	11	11	4	5
6	15	17	5	6
9	14	15	5	7
11	12	12	12	12
13	11	12	17	17
15	16	16	21	19
17	- *	- *	23	19
19	- *	- *	18	18

* Peixes não analisados devido às características sensoriais de deterioração

A figura 8 mostra a correlação entre a CBHAM e CBHAP nos atuns, com e sem pele durante um período de 19 dias de armazenamento.

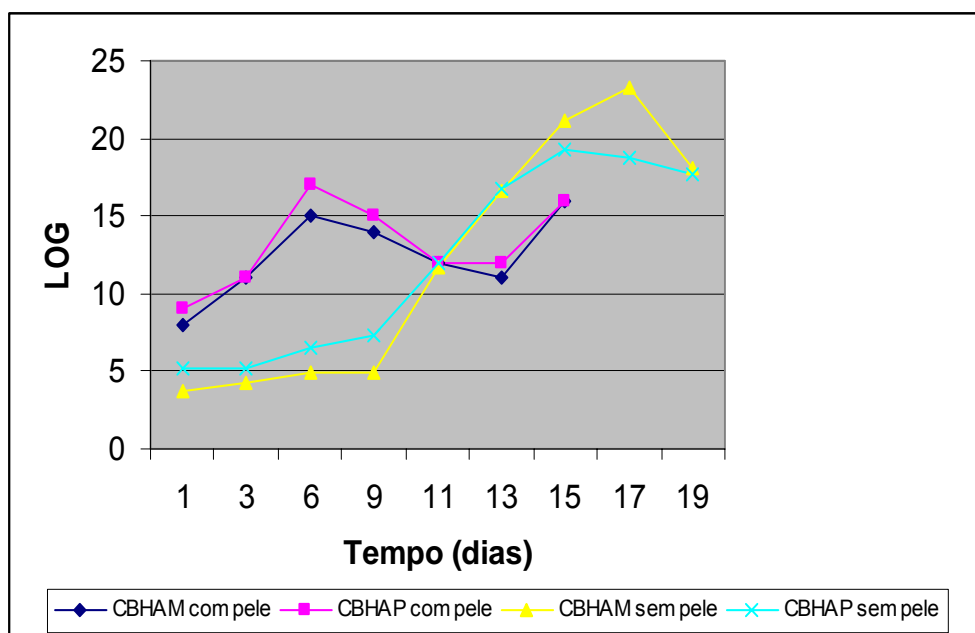


Figura 8: Valores, em Logarítmo, das Contagens de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Bactérias Heterotróficas Aeróbias Psicrótróficas (CBHAP) em três exemplares de atuns (*T. atlanticus*), com e sem pele, armazenados sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Na tabela 9 estão apresentados os modelos de equação linear para os valores de CBHAM e CBHAP para o atum com e sem pele em função dos tempos de estocagem. Os resultados observados nesta tabela indicam que houve correlação linear significativa entre estes valores para o atum em função do tempo de estocagem à temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Tabela 9: Modelos de equação de regressão dos valores de CBHAM (Y) em função do tempo de estocagem a uma temperatura de 4°C (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (Prob.) para três exemplares de atum (*T. atlanticus*).

Determinações	Modelo de regressão	R^2	Prob>F
CBHAM sem pele	$Y = -1,14 + 2,64.X$	0,84	0,0005
CBHAP sem pele	$Y = 1,58 + 2,09.X$	0,88	0,0002

4.3 ANÁLISE SENSORIAL

Foi realizada análise de variância (ANOVA) em blocos casualizados, ao nível de 5% de significância, testando efeito de estocagem sobre a aceitação quanto ao sabor, textura e impressão global. Foram analisadas duas amostras diferentes, uma foi submetida à análise sensorial imediatamente após a obtenção do exemplar (amostra 1) e outra mantida sob condições de refrigeração por nove dias (amostra 2).

Os valores médios dos escores obtidos nos testes de aceitação encontram-se na tabela 10, bem como foram demonstrados graficamente na figura 9.

Tabela 10: Valores médios dos escores do teste de aceitação de amostras cozidas de atum (*T. atlanticus*) com um (amostra 1) e nove (amostra 2) dias de estocagem sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para as variáveis sabor, textura e impressão global.

	Sabor	Textura	Impressão global
Amostra 1	7,10 ^a	6,83 ^a	6,86 ^a
Amostra 2	5,83 ^b	6,30 ^a	6,20 ^a

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$) na análise de variância (ANOVA).

Após analisar esses resultados pode-se concluir que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras quanto ao sabor. A amostra 1 variou entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito”, enquanto que a amostra 2 variou entre os termos hedônicos “indiferente” e “gostei ligeiramente”.

Quanto a textura e impressão global não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras 1 e 2. Ambas variaram entre os termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”.

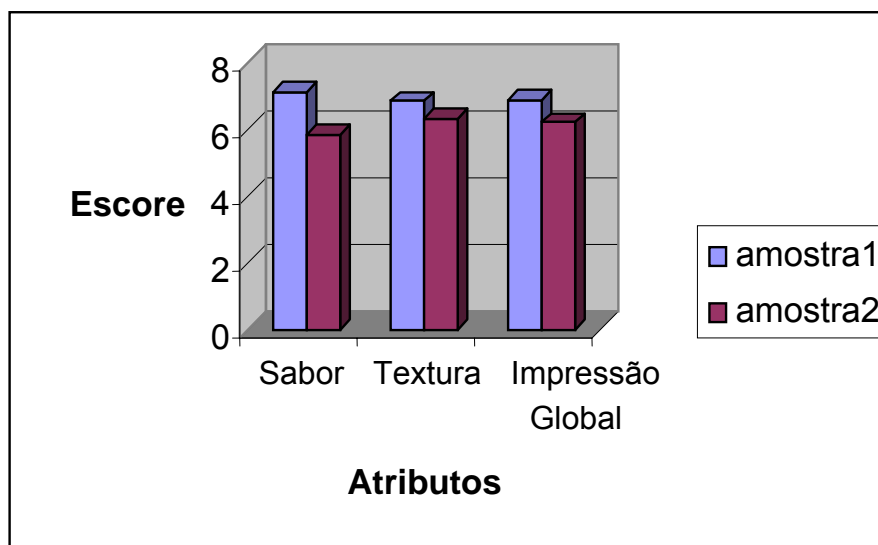


Figura 9: Escores médios de aceitação sensorial quanto ao sabor, textura e impressão global do atum (*T. atlanticus*).

No apêndice 8.3 é possível visualizar a análise de variância realizada com os resultados do teste de aceitação.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.1.1 OTMA

Existe uma enorme dispersão dos valores de OTMA entre as espécies de peixes marinhos, variando desde quantidades menores que 25 mg N/100g (nos escombrídeos) até valores maiores de 300 mg N/100g nos gadídeos e elasmobrânquios e, uma vez sendo utilizado como substrato bacteriano em aerobiose, sofrerá degradação formando TMA, que está diretamente relacionada com as modificações do odor e perda de qualidade.

A concentração de OTMA encontrada neste estudo foi decrescendo ao longo do período de estocagem, com valores médios entre as porções analisadas de 20,3mg N/100g no dia 1 e 5,3mg N/100g no 19º dia de estocagem. Este fato pode ser explicado através da redução do OTMA à TMA, determinada pela ação de enzimas bacterianas, principalmente as do gênero *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* spp e *Shewanella putrefaciens* que atuam no produto mantido sob refrigeração (0 - 5°C) (HUSS, 1995).

Os valores iniciais de OTMA encontrados neste estudo estão de acordo com os valores descritos por Contreras-Guzmán (1994), que afirma que os peixes da família *Scombridae* apresentam baixo teor inicial de OTMA, com níveis menores que 25mg N/100g, assim como os valores encontrados por Gallardo et al. (1990), cujos teores médios observados nesta espécie foram de 19 mg N/100g.

Kawabata (1953) ao realizar um estudo com atum (*Thunnus alalunga*) fresco e mantido sob temperatura de 8°C determinou, entre outros parâmetros, o nível de

OTMA, BVT e TMA presente nas musculaturas escura e clara. Encontrou níveis de OTMA na musculatura vermelha (18,8mg N/100g) maiores que na musculatura branca (2,1mg N/100g) e afirmou que essa concentração de OTMA é facilmente reduzida a TMA, justificando os valores mais elevados de TMA na musculatura vermelha.

Yamagata, Horimoto e Nagaoka (1969), estudando a espécie *T. albacares*, armazenada sob temperatura de 4°C, encontraram teor médio de OTMA de 17mg N/100g no peixe fresco (dia zero), valor próximo aos evidenciados nos exemplares de atum deste estudo que, entretanto, não apontou diferença significativa entre os valores obtidos nas diferentes porções analisadas. Este resultado difere do relatado pelos autores supracitados, que verificaram valores distintos nas porções estudadas.

Ben-Gigirey et al. (1998) relataram, em atum fresco analisado no dia zero, níveis de OTMA bem abaixo dos encontrados neste estudo (2,70 mg N/100g). Os resultados encontrados por estes autores discordam tanto dos resultados deste estudo quanto dos valores descritos pela literatura (KAWABATA (1953); YAMAGATA, HORIMOTO e NAGAOKA (1969); GALLARDO et al. (1990); CONTRERAS-GUZMÁN (1994); OGAWA; MAIA (1999)).

Há uma forte relação entre a redução dos níveis de OTMA com a produção de BVT. De acordo com os resultados deste estudo foi possível verificar que enquanto os níveis de OTMA decresceram ao longo do período de estocagem, os teores de BVT aumentaram gradativamente nesse período. Explica-se essa relação através da alcalinização do meio realizada pela formação das bases voláteis totais, que favorece a atividade das enzimas desaminases, que reduzem o OTMA à TMA (JACOBBER; RAND, 1982; CONTRERAS-GUZMÁN, 1995).

5.1.2 BVT

Com referência à produção de BVT, este estudo encontrou teores de 14,65 mg N/100g no primeiro dia de análise e 27,29 mg N/100g no 19º dia de estocagem. Estes valores mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (30 mg N/100g) ao longo de todo o período de estocagem. Os valores iniciais são bem maiores que zero devido à presença da amônia no conjunto de BVT, pois esta substância se origina da degradação de nucleotídeos no pescado

fresco. Porém, à medida que o pescado é degradado, ocorre um maior aumento no teor de BVT (PEREIRA, 2004).

Ben-Gigirey et al. (1998) analisaram atuns frescos da espécie *T. alalunga*, no dia zero, e encontraram níveis iniciais de BVT um pouco mais elevados que os encontrados neste estudo (17,7mg N/100g). Silva, Ponte e Dapkevicius (1998) também relataram valores superiores aos valores de BVT encontrados neste estudo, variando entre 20 mg/100g no 1º dia e 36 mg/100g no 12º dia de estocagem.

Gallardo et al. (1990); Pérez-Villarreal e Pozo (1990) e Ruiz-Capillas e Moral (2005) relataram valores iniciais de BVT mais elevados que os valores encontrados nesta pesquisa (cerca de 28mg N/100g nos dois primeiros casos e 29mg N/100g no último caso), o que pode indicar que os peixes analisados por estes autores apresentavam-se com grau de qualidade inferior aos peixes utilizados neste estudo.

Em relação aos valores de BVT encontrados neste estudo houve um aumento mais pronunciado a partir do 17º dia de estocagem, concordando com Contreras-Guzmán (1994). Este autor relata que a amônia gerada a partir do pós-rigor soma-se a amônia produzida por ação bacteriana no armazenamento, aumentando significativamente após a primeira semana de estocagem, fato evidenciado através da análise de determinação do nitrogênio volátil.

Segundo Huss (1995), a elevação no nível de BVT em algumas espécies de peixe está totalmente associada com a deterioração microbiológica e com a formação de substâncias oriundas deste processo, como amônia e TMA. A ascensão gradativa dos valores pode ser explicada a partir da decomposição bacteriana do produto, cuja consequência é a conversão do OTMA, inicialmente abundante, em TMA, que é um dos principais substratos para a produção das BVT pela desaminação dos aminoácidos gerando amônia.

Os resultados de BVT indicam que o atum, nas condições deste estudo, chegou ao 19º dia de estocagem com baixa qualidade, fato também ressaltado por Cardinal et al. (2004). Estes autores afirmam que valores elevados de BVT e TMA são um forte indicador de baixa qualidade de peixes resfriados, estocados por duas semanas sob temperatura de 4°C.

O limite máximo de BVT permitido em pescado é de 30 mg N/100g de amostra, valor que não foi atingido, neste estudo, em nenhum dia de estocagem. Entretanto, estes valores precisam ser revistos, visto que outros autores (GALLARDO, 1990 E RUIZ-CAPILLAS e MORAL, 2005) encontraram teores muito

elevados desta substância no primeiro dia de armazenamento do atum fresco. Segundo Contreras-Guzmán (1994) e Ababouche et al. (1996) este fato pode ser explicado através das diferentes concentrações de OTMA encontradas nas espécies. Estas discrepâncias em relação aos valores de BVT mostram que esse limite estabelecido pelo RIISPOA não deve ser utilizado como indicador de qualidade sem estar associado a outros parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e sensoriais. Além dos fatos expostos anteriormente, há outro motivo para que haja confusão em relação à avaliação de BVT, pois o capítulo do RIISPOA que aborda o tema apresenta uma informação equivocada quanto às unidades de peso (utiliza o termo 0,030 centigramas de N/100g equivocadamente).

5.1.3 TMA

A formação de TMA nos exemplares de atum analisados neste estudo variou muito pouco ao longo do período de estocagem, sendo 4,10 mg N/100g o teor produzido no primeiro dia de análise e 5,54 mg N/100g no 19º dia. Estes resultados estão em desacordo com o RIISPOA (BRASIL, 1997), pois neste regulamento o nível máximo de TMA permitido em peixes para o consumo é de 4,0 mg N/100g. Entretanto, alguns autores afirmam que esses valores devem ser revistos e que novos limites de aceitação sejam estabelecidos. Contreras-Guzmán (1994) afirma que o valor de 4 mg N/100g adotado no Brasil é baixo demais quando comparado aos níveis máximos permitidos em outros países e sugere um novo valor, entre 5 e 7mg N/100g, a ser adotado para as espécies comercializadas no país, excetuando-se os elasmobrânquios, que necessitariam de um valor mais elevado devido ao seu teor inicial de OTMA. Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) também sugeriram a revisão dos valores para o limite de aceitação de espécies de atum e sugeriu que novos limites fossem adotados.

Em outros países os limites de TMA adotados são distintos e por esta razão Ababouch et al. (1996) e Huss (1988) relataram que o limite de aceitabilidade varia entre 10 e 15 mg N/100g de amostra. Segundo Ruiz-Capillas e Moral (2001) o limite legal para a TMA na Espanha é de no máximo 12 mg N/100g do produto. De acordo com El Marrakchi et al. (1990) peixes com teor de TMA entre 3 e 5 mg N/100g

apresentam grau intermediário de frescor embora a legislação brasileira considere este valor inadequado.

Resultado semelhante aos encontrados neste trabalho foi descrito por Kawabata (1953), cuja espécie estudada foi o *T. alalunga*. Este autor encontrou no dia zero, sob temperatura de 8°C, teores de 4,0 mg N/100g de TMA.

Yamagata, Horimoto e Nagaoka (1969) analisaram a espécie *T. albacares* recém capturadas e mantidas em gelo em condições bem próximas as do presente estudo (quatro porções diferentes) e encontraram os seguintes resultados: porções 1 e 2 apresentaram valores de 4,2 mg N/100g; porção 3 continha níveis de 7,25 mg N/100g e na porção 4 foram encontrados 2,2 mg N/100g. Apesar das porções 1 e 2 apresentarem níveis de TMA semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, as outras porções diferem bastante, pois apresentam níveis bastante superiores no caso da porção 3 e níveis bem inferiores no caso da porção 4. Em relação aos valores de TMA encontrados neste estudo não foi evidenciada diferença estatística significativa entre as porções, diferindo, entretanto do resultado exposto pelo autor supracitado.

Segundo Ogawa e Maia (1999) a volatilidade da TMA depende dos valores de pH da amostra. Em valores de pH entre 5,8 e 6,4 apenas 0,2 a 0,5% de TMA se volatiliza, enquanto em pH entre 6,8 e 7,7 esta porcentagem sobe para 2 a 3%. Talvez isto ajude a explicar a diferença entre os valores de TMA encontrados por outros autores (Pérez-Villarreal e Pozo, 1990; Gallardo et al., 1990; Price, Melvin e Bell, 1991; Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou, 1997 e Ruiz-Capillas e Moral, 2005) cujos valores de pH foram superiores aos encontrados neste estudo e bem próximos ao valor descrito por Ogawa e Maia (1999) que viabilizaria a volatilização da TMA, com conseqüente aumento de seus valores.

Kawabata (1953) afirma que existe uma grande quantidade de TMA livre na porção muscular escura (vermelha) de peixes pelágicos, inclusive no atum. Além disto, esta musculatura tem a capacidade de catalisar a formação de TMA a partir do OTMA, provavelmente devido à grande atividade enzimática da OTMA dimetilase nesta musculatura. Segundo Sotelo et al. (1995) acreditava-se que qualquer produção de DMA e TMA fosse proveniente da degradação do OTMA e que qualquer degradação do OTMA se refletia no aumento dos níveis de DMA e/ou TMA. Porém, caso haja uma inibição da enzima OTMA dimetilase pela presença de oxigênio, a degradação do OTMA ocorrerá mais rapidamente que a formação de

DMA e/ou TMA. Isto pode ajudar a entender os valores de TMA encontrados neste estudo, pois as amostras estavam acondicionadas em ambiente aeróbio e o contato com o oxigênio pode ter ocasionado a inibição desta enzima. Como consequência encontrou-se valores de OTMA em ordem decrescente, indicando que esta substância foi degradada mais rapidamente e a formação de TMA foi mais lenta devido a maior produção de amônia.

É importante ressaltar a necessidade da realização de novos estudos para determinar os níveis de TMA e BVT de forma mais coerente devido à discrepância encontrada nos resultados deste estudo, bem como nos resultados descritos na literatura. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Ruiz-Capillas e Moral (2005) que encontrou níveis elevados de BVT (28-30 mg N/100g) desde o primeiro até o 25º dia de estocagem, porém, contrariando o esperado relatou concentrações de TMA muito baixas (0,4-1,8mg N/100g) ao longo de 25 dias de estocagem. Gallardo et al. (1990) também encontrou valores polêmicos em seu estudo, pois os níveis de BVT no 1º dia de armazenamento do atum foram muito elevados (28mg N/100g), entretanto os teores de OTMA (19mg N/100g) concordam com os valores iniciais descritos neste estudo e também com os valores descritos por Contreras-Guzmán (1994) como característicos da espécie.

5.1.4 pH

Os valores de pH obtidos neste estudo sofreram um ligeiro aumento ao longo do período de armazenamento, variando entre 5,79 a 5,99, e, portanto, não alcançando o limite estabelecido pela legislação de 6,5 para a musculatura interna (BRASIL, 1997).

Segundo Jay (1986) o valor do pH pode influenciar no prazo de vida comercial dos peixes, pois as bactérias deteriorantes crescem melhor em faixas de pH mais alcalinas. Neste estudo foi observado maior aumento nos valores de pH a partir do 10º dia de estocagem, sendo possível correlacionar este parâmetro (pH) com as contagens bacterianas, pois estas também sofreram uma grande elevação a partir deste dia de armazenamento.

Pérez-Villarreal e Pozo (1990) e Ben-Gigirey et al. (1998), estudaram a espécie *T.alalunga* no dia zero. Os primeiros autores relataram valores de pH de 5,9

$\pm 0,12$, resultado superior ao encontrado nesta pesquisa. Já Ben-Gigirey et al. (1998) encontraram valores de 5,81, resultado mais compatível ao encontrado no primeiro dia deste estudo.

Ruiz-Capillas e Moral (2005) ao avaliarem atuns da espécie *T. obesus* encontraram baixos valores iniciais de pH (5,4) e nenhuma amostra alcançou valores de pH superiores a 6,0, diferindo dos valores iniciais deste estudo. Porém, quanto ao aumento de pH observado ao longo do tempo de armazenamento, houve semelhança entre ambos os resultados.

Por outro lado, Silva, Ponte e Dapkevicius (1998) e Rodríguez et al. (2004) obtiveram resultados distintos, que discordam dos apresentados neste estudo devido a uma variação maior entre os resultados. No primeiro caso os autores, ao estudarem a espécie *T. obesus* por 12 dias sob temperatura de 4°C, encontraram no primeiro dia de estocagem valores de pH iguais a 6,0, os quais estavam bem acima dos valores encontrados neste estudo (5,79). No último dia de armazenamento os valores de pH ultrapassaram os limites da legislação alcançando 6,6, sendo bastante superiores aos encontrados neste estudo no último dia de estocagem (5,9). Em relação ao estudo realizado por Rodríguez et al. (2004), que avaliaram merluzas por 19 dias sob temperatura de 2°C, foram observados valores de pH entre 6,67 no primeiro dia de armazenamento e 7,71 no 19º dia. Estes valores discordam bastante dos valores encontrados neste estudo, inclusive ultrapassando o limite estabelecido pela legislação brasileira.

5.1.5 Histamina e cadaverina

É possível observar que os resultados obtidos neste estudo para a produção de histamina variaram de acordo com a sazonalidade de captura dos atuns. Os peixes capturados no verão apresentaram valores de histamina acima de 5 mg/100g, níveis considerados críticos segundo FDA (2006), mais precocemente (7º dia de estocagem) que os atuns capturados no outono (14º dia de estocagem) e no inverno (17º dia de estocagem).

Neste estudo, apesar da maioria dos atuns analisados não ter ultrapassado o valor estipulado pela legislação como limite de aceitação (10 mg de histamina /100g de amostra), foi possível utilizar este parâmetro como um dos critérios de avaliação

da qualidade do atum visto que a partir do 7º dia de estocagem os níveis considerados como seguros (5 mg/100g), segundo o FDA (1996), foram ultrapassados. Como o limite de aceitação sensorial estabelecido neste estudo foi o 9º dia de estocagem, foi possível confiar nos valores de histamina em relação à qualidade do atum estudado.

Ruiz-Capillas e Moral (2005) realizaram experimento com *T. obesus* estocados a 3°C por 25 dias, pesquisando a formação de histamina nesta espécie. Como resultados encontraram valores iniciais menores que 10µg/g, alcançando 78,1µg/g no último dia de armazenamento. Sendo assim, concluíram que os níveis de histamina aumentaram proporcionalmente com a diminuição do frescor do atum, concordando com os resultados deste estudo, pois a concentração da histamina determinada também foi utilizada como um índice de qualidade do atum estocado em gelo.

López-Sabater et al.(1996) concluíram, analisando atuns da espécie *T. thynnus* armazenados sob temperatura de refrigeração (8°C), que a formação de histamina ainda continua ao longo do período de estocagem e por isso aconselharam aos consumidores a consumir o produto em no máximo três dias. Neste estudo também ficou evidenciada a formação de histamina ao longo dos 19 dias de armazenamento e, devido a este perigo, não é aconselhável utilizar a aparência física como único critério de avaliação para determinar o perigo da formação de histamina neste produto.

Os dados encontrados neste estudo, em dois exemplares de atum, também são semelhantes aos relatados por Silva, Ponte e Dapkevicius (1998), que encontraram níveis tóxicos de histamina a partir do 6º dia de armazenamento sob temperatura de 4°C. Entretanto discordam dos valores evidenciados por Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) cujos resultados foram muito baixos (variando de 0,005mg/100g entre os dias zero e nove a 0,11mg/100g no 21ºdia de estocagem). Também discordam de Emborg, Laursen e Dalgaard (2005) cujos valores foram maiores que os deste estudo (níveis de 7 a 23 mg/100g foram alcançados já no primeiro dia de estocagem) e López-Sabater et al (1996) que até o 12º dia de estocagem ainda não tinham detectado a presença de histamina e a partir do 18º dia seus valores ultrapassaram 10mg/100g.

Em relação aos resultados da produção de cadaverina, observou-se ao longo dos 19 dias de estocagem a 4°C que no primeiro dia de armazenamento esta amina

não foi detectada em nenhum dos cinco peixes estudados. Esta situação se repetiu até o 3º dia nos exemplares 2 e 3 e até o 7º dia no exemplar 1. Os teores de 5 a 10 mg/100g de amostra foram alcançados a partir do 7º dia de estocagem no caso dos exemplares 4 e 5, enquanto nos outros exemplares esses níveis só foram alcançados a partir do 14º dia.

A importância do estudo desta amina é a sua capacidade em potencializar os efeitos da histamina (NAGUIB, AYESH e SHALABY, 1995), sendo então avaliada ao longo dos 19 dias de estocagem deste estudo.

Ben-Gigirey et al.(1998) analisaram 5 espécimes de atum (*T. alalunga*) frescos no dia zero, realizando pesquisa de produção de histamina, cadaverina e espermina e encontraram concentrações abaixo de 0,8mg/100g para todas as aminas. A concentração de cadaverina encontrada foi em torno de 0,4mg/100g. Estas concentrações são baixas e são próximas aos teores de cadaverina encontrados no primeiro dia de análise deste estudo (teores não detectados).

Contreras-Guzmán (1994) concluíram que, nos peixes deteriorados, a concentração de cadaverina encontra-se entre 10 e 50 mg/100g. Também relataram que os valores normais para a concentração de cadaverina em atum armazenado sob temperatura de 21°C por 3 dias são de 14,2mg/100g, porém, quando estes peixes são submetidos a uma temperatura de 0°C há uma grande redução no teor desta poliamina. Este fato pode ser explicado através da inibição das bactérias descarboxilantes do aminoácido lisina, que ocorre em temperaturas mais baixas como neste caso.

Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) estudaram as aminas biogênicas como indicador de qualidade do atum (*T. thynnus*) armazenado a 0°C por 21 dias e 8°C por 9 dias. Encontraram como resultado um teor de cadaverina muito baixo até o 9º dia de estocagem a 0°C (0,002 mg% no dia zero e 0,041 mg% no 9º dia). a partir do 12º dia, nesta mesma temperatura, houve um aumento nos níveis desta amina (1,38 mg%) atingindo concentrações de 2,4 mg% no 21º dia. Em relação às amostras estocadas a 8°C as concentrações também foram baixas no dia zero (0,002 mg%), chegando a 5,6mg% no 9º dia de estocagem. Os resultados iniciais em ambas as temperaturas são parecidos com os encontrados neste estudo, pois os teores de cadaverina em ambos os casos foram muito baixos. Os autores supracitados utilizaram uma técnica mais sensível (HPLC) que a utilizada nesta pesquisa e por isso conseguiram detectar níveis tão baixos desta amina. Em relação

aos teores finais de cadaverina, os resultados deste estudo (5 e 10 mg%) correspondem aos encontrados pelos autores no 9º dia de estocagem(5,6 mg%).

5.2 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

5.2.1 Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) e Psicotróficas (CBHAP)

A contagem inicial de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CBHAM) e psicotróficas (CBHAP) dos exemplares de atum sem pele obtidas neste estudo foram respectivamente 3,76 Log UFC e 5,13 Log UFC. As CBHAM permaneceram dentro do limite até o 7º dia de estocagem, enquanto as CBHAP alcançaram um valor de 7,33 Log UFC neste mesmo dia. Estes resultados indicam que entre os dias 1 e 7 do armazenamento o crescimento bacteriano passou por uma fase de latência (fase “lag”), coincidindo com os relatos de Huss (1995). Este autor afirma que a fase “lag” perdura cerca de uma ou duas semanas antes que a fase de crescimento exponencial seja atingida. No caso deste estudo a fase exponencial foi atingida no 11º dia de armazenamento, onde as CBHAM alcançaram valores de 11,66 Log UFC e 11,99 Log UFC para as CBHAP.

Entretanto as CBHAM e CBHAP dos atuns com pele no dia zero foram respectivamente 8 e 9 Log UFC. Estes resultados demonstram que logo no primeiro dia de estocagem, mesmo com ótimas características sensoriais, o atum ultrapassou o limite máximo aceitável de 7 Log UFC estipulado pelo ICMSF (1974). Os valores alcançados no último dia de estocagem foram muito acima do padrão (16 Log UFC). Este fato pode ser justificado pela intensa contaminação da pele do peixe, demonstrando que o ambiente marinho onde o atum foi capturado apresentava alto nível de contaminação bacteriana, fato também alertado por Dalgaard (2000). Este autor afirma que os valores das contagens bacterianas em amostras com pele são extremamente elevados se comparados com amostras de musculatura apenas. O resultado deste estudo também demonstra que a evisceração e lavagem da superfície do atum antes da realização das análises bacteriológicas não evitaram que as contagens bacterianas fossem elevadas.

Segundo López-Gálves, Hoz e Ordóñez (1995) a decomposição do atum em temperatura entre 0 e 20°C foi associada principalmente com bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas, fato que foi comprovado neste estudo, tanto no atum com pele quanto no sem pele.

As contagens iniciais de bactérias obtidas nesta pesquisa concordam com as contagens iniciais apresentadas por Price, Melvin e Bell (1991), López-Gálves, Hoz e Ordóñez (1995), Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) e Ben-Gigirey et al. (1998). Porém, discordam dos valores encontrados Rodríguez et al. (2004) para merluzas, devido às altas contagens alcançadas (8 Log UFC). Em relação ao dia de estocagem em que foram alcançados os limites máximos de 7 Log UFC, esta pesquisa apresenta similiaridade com os valores obtidos por López-Gálves, Hoz e Ordóñez (1995), entretanto vai de encontro aos valores encontrados por Price, Melvin e Bell (1991), Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) e Silva, Ponte e Dapkevicius (1998).

Huss (1995) relacionou os “off-odors” encontrados nos peixes em deterioração com uma contagem de mesófilos e/ou psicrotróficos de 10^8 - 10^9 UFC/g. Esta afirmação coincide com os dados observados neste estudo, pois quando as contagens alcançaram estes valores (11º dia) o atum já tinha ultrapassado o seu limite de aceitação.

5.3 ANÁLISE SENSORIAL

No teste de aceitação sensorial para o exemplar de atum (*T. atlanticus*) analisado imediatamente após a chegada ao laboratório (amostra 1) foram obtidos os escores 7,1 para o atributo sabor e 6,8 para os atributos textura e impressão global. Em relação ao exemplar estocado em temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) por nove dias (amostra 2) os escores obtidos foram 5,8 para o atributo sabor, 6,3 para o atributo textura e 6,2 para a impressão global da amostra. Estes resultados comprovaram que a amostra 1 obteve maior aceitação que a amostra 2 no atributo sabor. Em relação aos outros atributos testados, não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras 1 e 2. Logo, quanto à textura e impressão global as duas amostras foram consideradas iguais pelos julgadores. Estes resultados são justificados através do relato dos autores Birch et al. (1977).

Segundo estes pesquisadores, os atributos de aparência, aroma, sabor e textura são importantes na avaliação da qualidade do pescado quando se empregam métodos descritivos, com julgadores treinados. Porém, quando são empregados métodos afetivos, com julgadores não treinados, como no caso deste estudo, o sabor tem mais influência que a textura na aceitação do produto pelos consumidores, fato que foi confirmado neste teste.

A partir desses resultados, foi possível concluir que ambas as amostras obtiveram boa aceitação pelos julgadores, apesar da amostra 1 ter obtido melhor aceitação no atributo sabor.

O limite sensorial de aceitação para atum (*T. atlanticus*) mantido sob temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) foi estabelecido, neste estudo, em nove dias. Chegou-se a esta conclusão após a análise das contagens de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, que ultrapassaram o limite máximo permitido (7 Log UFC/g) no 11º dia de estocagem e, portanto, deixando as amostras inaptas para o consumo a partir deste dia. Também foi levado em conta o perigo de formação de histamina nesta espécie, pois em alguns exemplares estudados o limite máximo (10 mg/100g) foi atingido no 10º dia de estocagem.

Ababouche et al. (1996) determinaram as alterações da qualidade de sardinhas (*Sardina pilchardus*) empregando as mesmas condições de estocagem utilizadas neste estudo (temperatura de refrigeração entre 2 e 4°C) e utilizaram uma equipe de julgadores treinados para avaliar o sabor do peixe cozido, utilizando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos. O resultado deste estudo evidenciou que a partir do 9º dia de estocagem foi constatada a rancificação do produto, porém, a deterioração bacteriana só ficou evidente a partir do 11º dia de armazenamento. Os resultados encontrados por este autor são semelhantes aos encontrados neste estudo, pois a deterioração bacteriana foi evidenciada no 11º dia de estocagem em ambas as pesquisas, porém os limites de qualidade encontrados nesta pesquisa (nove dias de estocagem sob refrigeração) diferiram dos limites determinados no estudo desses autores (11 dias de armazenamento).

Veciana-Nogués, Mariné-Font e Vidal-Carou (1997) realizaram análise sensorial, com julgadores treinados, em atuns (*Thunnus thynnus*) estocados a 0°C (por 21 dias) e 8°C (por 9 dias). Como limite de aceitação obtiveram 12 e 5 dias para os atuns armazenados a 0 e 8°C , respectivamente. Os resultados obtidos neste

estudo são semelhantes a estes, pois os limites de aceitação são bem próximos aos limites relatados para a temperatura de 0°C.

Rodríguez et al., 2004 realizaram análise sensorial de merluza (*Merluccius merluccius*) armazenada sob uma temperatura de 2°C por 19 dias, utilizando uma equipe de julgadores treinados. O limite de aceitação encontrado, para esta espécie, foi de 12 dias. Este resultado demonstra que esta espécie apresentou limites de aceitação bem próximos aos encontrados por este estudo, levando-se em conta que as temperaturas de estocagem foram distintas.

Borges (2005) realizou teste de aceitação em corvinas (*Micropogonias furnieri*) mantidas em gelo por 15 dias, avaliando os atributos de sabor, aroma, textura e impressão global. O autor constatou que a corvina analisada no 7º dia obteve maior aceitação em relação à corvina testada no dia 0, em todos os atributos. Estes resultados discordam dos encontrados neste estudo, pois o atum analisado no dia zero obteve maior aceitação em relação ao atum analisado no dia nove quanto ao atributo sabor. E, em relação aos atributos textura e impressão global, não houve diferença entre o dia zero e o dia nove, sendo ambos avaliados com o termo hedônico “gostei ligeiramente”. Além disso, o autor supracitado ressaltou que a amostra avaliada no dia 0 obteve maior aceitação que a avaliada no 15º dia, exceto para o atributo aroma.

Os valores encontrados por outros autores (Pérez-Villarreal e Pozo, 1990; López-Sabater, 1996; Ruiz-Capillas e Moral, 2005) como limite de aceitação para o atum e outras espécies (Soccol, 2002) diferiram do limite estabelecido neste estudo. Pérez-Villarreal e Pozo (1990) encontraram um limite de 20 dias para atum (*T. alalunga*) estocado em gelo; o limite estipulado por López-Sabater (1996) para atum (*T. thynnus*) armazenado a 0°C foi de 21 dias; Ruiz-Capillas e Moral (2005) determinaram como 18 dias o limite para atum (*T. obesus*) estocado a 3°C; Soccol (2002) determinou como sendo 20 dias o prazo limite para tilápias (*Oreochromis niloticus*) armazenada a 3°C. A explicação mais provável para essa diferença está no método de avaliação sensorial, pois todos esses autores mencionados utilizaram uma equipe de julgadores treinados para avaliar o produto ao longo do período de estocagem. Desta forma puderam determinar paralelamente os limites encontrados nas análises sensoriais, bacteriológicas e físico-químicas. Como o teste de avaliação sensorial deste estudo se baseou nos valores encontrados nas análises

bacteriológicas (CBHAM e CBHAP), o limite de 9 dias estipulado por este estudo ficou bem abaixo dos limites encontrados em outros estudos.

Assim como os resultados de Ruiz-Capillas e Moral (2005), as análises sensoriais realizadas neste estudo não se relacionaram claramente com os índices bioquímicos de BVT, pois os níveis destas substâncias não ultrapassaram a concentração máxima permitida (30 mg de BVT/100g de amostra) em nenhum dia de estocagem do atum. Se este resultado fosse analisado separadamente o limite de aceitação do produto seria estendido.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- ✦ Considerando as condições deste estudo, o prazo de vida comercial do atum (*T. atlanticus*) foi estabelecido em nove dias, visto que a produção de histamina e as contagens bacterianas alcançaram limites inaceitáveis no 10º dia de estocagem sob temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$);
- ✦ A avaliação sensorial utilizada neste estudo (teste de aceitação) associada às contagens bacterianas (CBHAM e CBHAP) mostrou ser útil como critério de qualidade;
- ✦ Os níveis de trimetilamina encontrados diferiram em muito dos níveis propostos pela legislação e por isso há a necessidade de aprofundar este estudo com maior número de exemplares, onde sejam utilizadas amostragens maiores que as utilizadas neste estudo, para que as dúvidas que permaneceram sejam sanadas;
- ✦ Os parâmetros físico-químicos não devem ser empregados sozinhos como método de avaliação da qualidade, visto que isoladamente podem provocar equívocos devido à variação de resultados encontrados;
- ✦ Mesmo utilizando-se temperaturas de 4°C foi possível detectar a formação de histamina e cadaverina na musculatura dos exemplares estudados, o que aumenta a necessidade de estipular um prazo de vida comercial seguro para o consumo;
- ✦ É importante considerar que devido às formas de consumo do atum, a estocagem dos exemplares sem a pele aumenta a segurança quanto ao desenvolvimento bacteriano, pois as contagens de bactérias heterotróficas

aeróbias mesófilas e psicrotróficas dos atuns com pele foram bem superiores ao padrão fixado na legislação vigente desde o primeiro dia de armazenamento;

- ✦ Os atuns frescos obtiveram maior aceitação pelos consumidores, comprovando a necessidade de se consumir este produto o mais rapidamente possível após a captura;
- ✦ Sugere-se que o atum, ao ser armazenado sob temperatura de refrigeração, seja consumido o mais rapidamente possível para evitar a produção de histamina em sua musculatura e conseqüentemente evitar danos à saúde do consumidor;
- ✦ Em função da influência da culinária nipônica no Brasil, sugere-se o armazenamento do atum sob refrigeração sem a pele para aumentar a segurança no consumo deste alimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABABOUC, L.H.; SOUIBRI, L.; RHALIBY, K.; OUAHDI, O.; BATTAL, M.; BUSTA, F.F. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiology*, v.13, p. 123 -132, 1996.

AUBOURG, S.P.; SOTELO,C.G.; GALLARDO, J.M. Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 2, p. 295-298, 1997.

ARNOLD, S.H.; BROWN, W.D. Histamine (?) toxicity from fish products. *Advances in Food Research*, v.24, p.113-154, 1978.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequence for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, 1995.

BEN-GIGIREY, B.; SOUSA, J.M.V.P.; VILLA, T.G.; BARROS-VELAZQUEZ, J. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 5, p. 608-615, 1998.

BEN-GIGIREY, B.; SOUSA, J. M. V. B.; VILLA, T. G.; BARROS-VELASQUEZ, J. Chemical changes and visual appearance of albacore tuna as related to frozen storage. *Journal of Food Science*, v. 64, n. 1, p.20-24, 1999.

BERSOT, L.S.; SÃO CLEMENTE, S. C.; SANTOS, N.N. Avaliação dos teores de histamina em sardinha enlatada (*Sardinella aurita*, Valenciennes, 1847). *Higiene Alimentar*, v. 10, n. 45, p. 38-43, 1996.

BIRCH, G.C. Sensory properties of foods. *Appl.Sci. Publ.* England, 1977

BORGES, A. *Qualidade da corvina (Micropogonias furnieri) eviscerada e inteira em diferentes períodos de estocagem à temperatura de 0°C*. Niterói, 2005. 81 f.

Dissertação de mestrado – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para o controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos. LANARA, Brasília, DF, 1981, 123 p.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto número 30.691 de 29 de Março de 1952, alterado pelo decreto número 1255 de 25 de Junho de 1962, número 1.236 de 02 de setembro de 1994, número. 1.812 de 08 de fevereiro de 1996 e número 2.244 de 04 de junho de 1997. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - R.I.I.S.P.O.A. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1997a.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº185, de 13 de Maio de 1997 aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.6, 1997b.

BYSTED, J.; SWENNE, L.; AAS, H.W. Determination of trimethylamine oxide in fish muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 10, p. 301-304, 1959.

CARDINAL, M.; GUNNLAUGSDOTTIR, H.; BJOERNEVIK, M.; OUISSE, A.; VALLET, J. L.; LEROI, F. Sensory characteristics of cold-smoke salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Research International*, v. 37, p. 181-193, 2004.

CHAVES, J.B.P.; SPROESSER, R.L. *Práticas de Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas*. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV, 1996. 81p.

CHURCH, N. Feature MAP fish and crustaceans-sensory enhancement. *Food Science and Technology Today*, v. 12, n. 2, p. 73-82, 1998.

CINTRA, I.H.A.; OGAWA, N.B.P.; SOUZA, M.R.; DINIZ, F.M.; OGAWA, M. Decomposition of trimethylamine oxide related to the use of sulfites in shrimp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas: SBCTA, v.19, n.3, 1999.

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. *Bioquímica de pescados e derivados*. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409 p.

CONWAY, E.J.; BYRNE, A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I. The micro-determination of ammonia. *Biochemistry Journal*, v.27, p.419-429, 1933.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microorganisms. DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington. APHA, 2001. 676 p. Cap. 13 p.159-166.

DALGAARD, P. Freshness, quality and safety in seafoods. *Danish Institute for Fisheries Research. Technical Manual*, Lyngby, Denmark, 2000. 31p.

DECKERE, E.A.M.; KORVER, O.; VERSCHUREN, P.M.; KATAN, M.B. Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin. *European Journal of Clinical Nutrition*; v. 52, p. 749-753, 1998.

DYER, W.J. Amines in fish muscle. I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *Journal of the Fish Research Board of Canada*, v.6, p.351-358, 1945.

EL MARRAKCHI, A.; BENNOUR, M.; BOUCHRITI, N; HAMAMA, A; TAGAFAIT, H. Sensory, chemical and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 600 -605, 1990.

EMBORG, J.; LAURSEN, B.G.; DALGAARD, P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2° C—effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.101, p. 263-279, 2005.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. *Fishery Technical Paper*, 252.Rome, 1985.

FAO . FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Fisheries and global information system. Disponível em <http://www.fao.org/figis> Acesso em 18 dez. 2005.

FAO . FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Yearbook of Fishery Statistics. Disponível em: <<http://www.fao.org/statistic/summtab/default.asp>>. Acesso em: 16 jan. 2006.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide. Washington, D.C.: Office of Seafood. 1996, 244 p.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance, third edition, jun, 2006.

FISHBASE. A global information system on fishes. Disponível em: <http://www.fishbase.org/home.htm>. Acesso em 20 nov. 2005.

FRANCO, R.M.; MANTILLA, S.P.S. *Escherichia coli* em corte de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade antimicrobiana aos sorovares predominantes. XIV Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia, 08-12-2004. CD. 1º Lugar na área de Ciências Agrárias.

FRASER, O.P.; SUMAR, S. Compositional changes and spoilage in fish (part II) – microbiological induced deterioration. *Nutrition and Food Science*, n.6, p.325-329, 1998.

GALLARDO, J.M.; PEREZ-MARTIN, R.I.; FRANCO, J.M.; AUBOURG, S.; SOTELO, C.G. Changes in volatile bases and trimethylamine oxide during the canning of albacore (*Thunnus alalunga*). *International Journal of Food Science and Technology*, Spain: Instituto de Investigaciones Marinas, v.25, p. 78-81, 1990.

GALLARDO, J.M.; PEREZ-MARTIN, R.I.; SOTELO, C.G.; AUBOURG, S.; BANGA, J.R. Nota. Evolución de aminas volátiles en dos tipos de merluza (*Merluccius australis* y *Merluccius capensis*) y en rosada (*Xiphirus capensis*) durante el almacenamiento a -18°C. *Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos*, v.31, n.1, p.103-110, 1990b.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.O; OLIVEIRA, C. A.F. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. *Revista Higiene Alimentar*, v. 12, n. 53, p. 30-37, 1998.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, v.5, p. 42-49, 1994.

HUSS, H.H. Fresh fish quality and quality changes. *FAO Fisheries series*, n.29, Rome, 1988.

_____. Assessment of fish quality. In: _____. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, n. 348, Rome, 1995.

ICCAT. INTERNATIONAL COMMISSION FOR THE CONSERVATION OF ATLANTIC TUNAS. Disponível em: < [http:// www.iccat.es/scrs.htm](http://www.iccat.es/scrs.htm)> Acesso em: 01 fev. 2006.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD. *Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. University of Toronto Press, Toronto. 1974.

_____. *Ecología microbiana de los alimentos 2: Productos alimenticios*. Zaragoza: Acribia, 1980. 989p.

JACOBBER, L.F.; RAND, A.G.J. Biochemical evaluation of seafood. MARTIN, R.E. *Chemistry and biochemistry of marine food products*. Connecticut: Westport, 1982. Cap. 16 p.347-365.

JAY, J.M. *Modern food microbiology*. 3ª ed., New York. 1986.

KAI, M.; MORAIS, C. Vias de deterioração do pescado. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos - São Paulo. *Anais...* Santos: Leopoldianum, 1988. p. 13-20.

KAWABATA, T. Studies on the trimethylamine oxide-reductase – I. Reduction of trimethylamine oxide in the dark muscle of pelagic migrating fish under aseptic condition. *Bulletin of Japanese Society of Scientific fisheries*, v. 19, n. 4, p. 505-512, 1953.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial e marinha. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos - São Paulo. *Anais...* Santos: Leopoldianum, 1988. p. 40-58.

LISTON, J. Microbiology in fishery science. CONNELL, J.J. *Advances in fishery science and technology*. Farnham, England. 1980, p. 138-157.

LÓPEZ-GÁLVES, D.; HOZ, L.L.; ORDÓÑEZ, J.A. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical changes in refrigerated tuna (*Thunnus alalunga*) steaks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 483-490, 1995.

LÓPEZ-SABATER, E.I.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J.; ROIG-SAGUÉS, A.X; MORA-VENTURA, M.A.T. Bacteriologic quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection*, v. 57, n. 4, p. 318-323, 1994.

LÓPEZ-SABATER, E.I.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J.; HÉRNANDEZ-HERRERO, M.; Roig-Sagués, A.X; Mora-Ventura, M.A.T. Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Food Protection*, v. 59, n. 2, p. 167-174, 1996.

MAUSSE, E. C. J. Shelf life of red fish stored in ice and modified atmosphere (MA) and some aspects on the development of a Quality Index Method (QIM) scheme for red fish stored in MA. Fisheries Training Programme. The United Nations University. Final Project 2000. Beira, Mozambique.

MERCK. *Microbiology Manual Culture Media*. Dormstadt, Germany, 405p., 1996.

MIDURA, T.F.; BRYANT, R.G.. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington. APHA, 2001. 676 p. Cap. 2 p.13-23.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington. APHA, 2001. 676 p. Cap. 7 p.63-67.

MOSSEL, D.A.A.; QUEVEDO, F. *Control microbiológico de los alimentos: métodos recomendados*. Lima, Universidade Nacional Mayor de San Marcos, 1967. 96p.

NAGUIB, K.; AYESH, A.M.; SHALABY, A.R. Studies on the determination of biogenic amines in foods. 1. Development of a TLC method for the determination of eight biogenic amines in fish. *Journal of Agriculture in Food Chemistry*, v.43, p. 134-139, 1995.

NICKELSON, R.; McCARTHY, S.; FINNE, G. Fish, crustaceans and precooked seafoods. DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington. APHA, 2001. 676 p. Cap. 48 p.497-505.

NORT, E. Importância do Controle Físico na Qualidade do pescado. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos - São Paulo. *Anais...* Santos: Leopoldianum, 1988, p. 135-144.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. *Manua da pesca: Ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Livraria Varela, 1999, 430p.

PARKIN, K.L.; HULTIN, H.O. Some facts influencing the production of dimethylamine and formaldehyde in minced and intact red hake muscle. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.6, p. 73-97, 1982.

PEREIRA, A.G.F. *Avaliação de condições de consumo da sardinha fresca, descongelada e processada através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e do nitrogênio de bases voláteis totais*. São Paulo, 2004. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PÉREZ-VILLARREAL, B.; POZO, R. Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Science*, v. 55, n.3, p. 678-682, 1990.

PRICE, R.J. *Compendium of fish and fishery product. Processing methods, hazards and controls*. National seafood HACCP alliance for training and education. FDA, 1997. Disponível em: < <http://www-seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/compend.htm> > Acesso em: 30 mar. 2004.

PRICE, R.J.; MELVIN, E.F.; BELL, J.W. Postmortem changes in chilled round, bled and dressed albacore. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 2, p. 318-321, 1991.

PROCÓPIO, R.C.O. *Ocorrência de bactérias formadoras de histamina em tunídeos utilizados para enlatamento*. Niterói, 2000, 91 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000.

QUINTAES, V. Potencial perigo microbiológico resultante do uso de caixas plásticas tipo monobloco, no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.3, p.517-522. 2003.

RODRÍGUEZ, O.; LOSADA, V.; AUBOURG, S.P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Enhanced shelf -life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, v. 37, p. 749-757, 2004.

RUIVO, E.U. A análise sensorial na avaliação da qualidade do pescado. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos - São Paulo. *Anais...* Santos: Leopoldianum, 1988. p. 69-80.

RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, A. Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Research International*, v.34, p. 441–447, 2001.

RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, A. Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*. Vigo: Instituto de investigaciones Marinas, v. 89, p. 347-354, 2005.

SENGUPTA, P.; MANDAL, A.; MITRA, S.N. Studies on the total volatile bases (TVB) of fish for indicating the degree of spoilage. *J. Inst. Chemists*, v. 63, p. 126-128, 1971.

SHALABY, AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, v.29, n.7, p. 675-90. 1996.

SCHUTZ, D.E.; CHANG, G.W.; BJELDANES, L.F. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. *Journal of the AOAC*, v. 59, n. 6, p.1224-1225, 1976.

SHOMURA, R.S.; MAJKOWSKI, J.; LANGI, S. Interactions of Pacific tuna fisheries. *FAO Fisheries Technical Paper*, v. 2, n. 336. Rome, FAO. 1993. 439p.

SHOMURA, R.S.; MAJKOWSKI, J.; HARMAN, R. F. Status of interactions of Pacific tuna fisheries in 1995. *FAO Fisheries Technical Paper*, n. 365. Rome, FAO. 1995.

SILVA, C.C.G.; PONTE, D.J.B.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E. Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. *Journal of Food Science*, v. 63, n. 4, p. 644-647, 1998.

SOARES, V.F.M.; VALE, S.R.; JUNQUEIRA, R.G.; GLÓRIA, M.B.A. Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.18, n. 4, p.462-467, 1998.

SOCCOL, M.C.H. *Otimização da vida útil da tilápia cultivada (Oreochromis niloticus), minimamente processada e armazenada sob refrigeração*. São Paulo, 2002, 124 f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SOTELO, C.G., GALLARDO, J.M., PINEIRO, C.; PÉREZ-MARTIN, R., Trimethylamine oxide and derived compounds changes during frozen storage of hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chemistry*. Vigo: Instituto de Investigaciones Marinas, v.53, n. 1, p.61-65, 1995.

STONE, H.; SIDEL, J.L. *Sensory evaluation practices*. 2ª ed. Academic Press, 1993. 337p. Cap. 7, p. 243-270.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington. APHA, 2001. 676 p. Cap. 6 p.53-62.

TAHA, P. Microbiologia e deterioração do pescado exercido pela WEG – Penha Pescados S.A. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos - São Paulo. *Anais...* Santos: Leopoldianum, 1988. p. 210-216.

TAKAHASHI, N.S. Importância dos ácidos graxos essenciais. Instituto de pesca, Outubro de 2005. Disponível em:
<[www.pesca.sp.gov.br/arquivos/TextoPqNeusaSiteIP%C3%81cidos Graxos.doc](http://www.pesca.sp.gov.br/arquivos/TextoPqNeusaSiteIP%C3%81cidos%20Graxos.doc)>
Acesso em: 30 jan. 2006.

TAVARES, M.; AUED, S.; BANCETTI, L.B.; ZAMBONI, C.Q. Métodos sensoriais, físicos e químicos para análise de pescado. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO, 1988, Santos - São Paulo. *Anais...* Santos: 1988. p.117-134.

TIMM, M.; JORGENSEN, B.M. Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food Chemistry*, Denmark, v.76, n.4, p.509-518, 2002.

VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP- related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.2036-2041, 1997.

VIEIRA, K.R.; LINS OLIVEIRA, J.E.; BARBALHO, M.C.; ALDATZ, J.P. Aspects of the dynamic population of blackfin tuna (*Thunnus atlanticus* - Lesson, 1831) caught in the northeast Brazil. *Colection of Scientific Papers, ICCAT*, v. 58, n.5, p. 1623-1628, 2005.

VOOYS, C.G.N. Occurrence and role of a Quaternary base, trimethylamine oxide, in two cockle species, *Cerastoderma edule* and *Cerastoderma lamarcki*. *Journal of Sea Research*, v. 76, n. 4, p.69-73, 2002.

YAMAGATA, M.; HORIMOTO, K.; NAGAOKA, C. Assessment of green tuna: determining trimethylamine oxide and its distribution in tuna muscle. *Journal of Food Science*, v. 34, p. 156-159, 1969.

8 APÊNDICES

APÊNDICE 8.1 Análise de Variância executada em fatorial 9^3 (nove dias e três porções musculares diferentes) dos resultados obtidos nas análises de OTMA, BVT e TMA ao nível de 5% de significância.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Prob. > F		
		OTMA	BVT	TMA
Dia	8	0,0001	0,0001	0,0001
Porção	2	0,9250	0,1608	0,9381
Dia * Porção	16	0,9829	0,6185	0,2872

APÊNDICE 8.2 Análise de Variância executada em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) dos resultados obtidos a partir das médias das três porções inicialmente analisadas com a finalidade de testar o tempo de estocagem. Análises com grau de significância de 5%.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Prob. > F		
		OTMA	BVT	TMA
Dia	8	0,0001	0,0001	0,0001
Repetição	8	0,0145	0,7162	0,0872

APÊNDICE 8.3 Análise de Variância executada em delineamento de blocos casualizados (julgadores) dos resultados obtidos a partir dos escores obtidos no teste de aceitação.. Análises com grau de significância de 5%.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Prob. > F		
		Sabor	Textura	Impressão global
Amostra	1	0,0059	0,2024	0,0693
Julgador	29	0,3213	0,0306	0,0732