

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

RAQUEL LIMA SALGADO

EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA
MODIFICADA SOBRE A CONSERVAÇÃO DE PARGO
(*Pagrus pagrus*)

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

Niterói/RJ
2006

RAQUEL LIMA SALGADO

EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE A
CONSERVAÇÃO DE PARGO (*Pagrus pagrus*).

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

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO - UFF

Co-orientador: Prof. Dr. ROGERIO TORTELLY - UFF

Niterói/RJ
2006

RAQUEL LIMA SALGADO

EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE A
CONSERVAÇÃO DE PARGO (*Pagrus pagrus*).

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

Aprovado em 05 / 09 / 2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Borges Mano
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Rogério Tortelly
Universidade Federal Fluminense

Profª. Dra. Manuela Fernández Álvarez
Universidad Complutense de Madrid

Niterói/RJ
2006

A todos os meus amigos porque sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo seu amor, dedicação e compreensão, e por estarem sempre ao meu lado torcendo por mim.

AOS MEUS PAIS, POR ME APOIAREM E INCENTIVAREM, POR PERDOAREM OS MEUS MOMENTOS DE AUSÊNCIA, E POR NÃO POUPAREM SACRIFÍCIOS PARA O MEU SUCESSO. AMO VOCÊS!

Ao Bruno, pela paciência, pelo amor, pela compreensão, por ser meu companheiro e um excelente amigo.

Ao meu Orientador Prof. Sérgio Borges Mano, pela oportunidade, confiança, orientação, atenção e grande amizade, que foram fundamentais em todos os momentos. Obrigada por tudo.

Aos amigos Carlos Adam, Patrícia Riddell, Fernanda Martinez e Fernanda Lima, por estarem sempre comigo, aturando o meu mau humor, e ainda assim serem meus melhores amigos. Sem vocês nada disso seria possível.

Às minhas eternas amigas Mariana Martins e Patrícia Navarro pelo apoio e incentivo.

À equipe do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, em especial à Juliana Beltrão da Costa, pela ajuda preciosa em todas as etapas deste trabalho. Agradeço também ao professor Dr. Robson Maia Franco pela atenção, estímulo e aconselhamentos.

Ao professor Rogerio Tortelly pela sua eterna amizade, apoio e incentivo, e por ter sempre acreditado em mim. Espero ainda te dar muito orgulho.

Ao professor e amigo, Francisco Carlos de Lima, pela confiança desde o primeiro contato, pela dedicação, carinho e atenção.

Ao amigo Drausio de Paiva Ferreira, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos da Universidad Complutense de Madrid, agradeço pela oportunidade e experiência adquirida.

À CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, p.7

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.8

RESUMO, p.10

RESUMEN, p.11

1 INTRODUÇÃO, p.12

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.18

2.1 DETERIORAÇÃO DO PESCADO REFRIGERADO, p.18

2.1.1 Microbiota do pescado e sua ação no processo de deterioração, p.19

2.1.2 Alterações físico-químicas, p.21

2.1.2.1 pH, p.21

2.1.2.2 Bases voláteis totais, p.22

2.1.3 Propriedades sensoriais, p.24

2.1.4 Aspectos histológicos, p.25

2.2 EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA, p.26

2.2.1 Breve histórico, p. 27

2.2.2 Gases utilizados, p.28

2.2.3 Características do material de envase, p.31

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.32

3.1 MATERIAL PERMANENTE, p.32

3.2 MATERIAL DE CONSUMO, p.33

3.3 MÉTODOS, p.33

3.3.1 Aquisição, transporte e colheita de amostras, p.33

3.3.2 Análises bacteriológicas, p.35

3.3.3 Análise histológica, p.36

3.3.4 Análises físico-químicas, p.37

3.3.5 Análise sensorial, p.39

3.3.6 Análise estatística, p.39

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p.40

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p.40

4.1.1 Contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, p.40

4.1.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*, p.43

4.2 ANALISES FISICO-QUIMICAS, p.45

4.2.1 pH, p.45

4.2.2 Bases Voláteis Totais, p.47

4.3 ANÁLISE SENSORIAL, p.48

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA, p.51

5 CONCLUSÕES, p.55

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.56

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Valores médios dos logarítimos das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias, f.63
- TABELA 2 - Valores médios dos logarítimos das contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias, f.64.
- TABELA 3 - Valores médios de pH em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias, f.65.
- TABELA 4 - Valores médios de bases voláteis totais, expressos em mg N/100gr, de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*) embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias, f.66.
- TABELA 5 – Avaliação sensorial do estado de degradação de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*) embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 22 dias, f.50.
- TABELA 6 - Avaliação histológica do estado de degradação de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*) embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 22 dias, f.51.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1 Representação gráfica da evolução da produção pesqueira no Brasil, f.13.
- Fig. 2 Representação gráfica da posição do Brasil em relação a outros países no ano de 2001, f.13.
- Fig. 3 Representação gráfica da produção total de pescado (t) estimada por ano, segundo as regiões e unidades da federação, f.14.
- Fig. 4 Peixe da espécie *Pagrus pagrus*, f.16.
- Fig. 5 Esquema da redução do OTMA em TMA, f.23.
- Fig. 6 Esquema do desdobramento endógeno do OTMA ate DMA e formoldeído, f.23.
- Fig. 7 Embalagem plástica de polietileno com baixa permeabilidade a gases, contendo fragmento de 50 gramas de pargo, f.34.
- Fig. 8 Termoseladora a vácuo (TECMAQ, modelo AP 450), f.35.
- Fig. 9 Contador de Colônias (LEICA Quebec Darkfield Colony Counter), f.36.
- Fig. 10 UFC (setas) em meio Agar Padrão para Contagem e VRBG, f.36.
- Fig. 11 Esquema de acondicionamento de amostras em gaze para posterior imersão em formoldeído, f.37.
- Fig. 12 pHmeter utilizado para aferição do pH, f.38.
- Fig. 13 Esquema de quantificação de BVT através do método de Microdifusão de Conway, com ênfase na viragem do indicador após a titulação, f.39.

- Fig. 14 Representação gráfica dos valores médios dos logarítimos das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2±2°C) durante 23 dias, f.42.
- Fig. 15 Representação gráfica dos valores médios dos logarítimos das contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2±2°C) durante 23 dias, f.44.
- Fig. 16 Representação gráfica dos valores médios de pH em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2±2°C) durante 23 dias, f.46.
- Fig. 17 Representação gráfica dos valores médios de bases voláteis totais, expressos em mg N/100gr, de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2±2°C) durante 23 dias, f.48.
- Fig. 18 Corte histológico de tecido muscular íntegro de Pargo (*Pagrus pagrus*). Observa-se morfologia celular preservada e ausência de colônias bacterianas. (10X) (H.E.), f.53.
- Fig. 19 Corte histológico de tecido muscular moderadamente degradado de Pargo (*Pagrus pagrus*). Observa-se perda da morfologia celular, com dissolução protéica da fibra, e presença de desenvolvimento bacteriano. (10X) (H.E.), f.53.
- Fig.20 Corte histológico de tecido muscular de Pargo (*Pagrus pagrus*) intensamente degradado, apresentando focos de colônias bacterianas, que ocasionam dissolução de segmentos fibrilares, representada por perda da atividade tintorial, apresentando aspecto acidófilo e granular (20X) (H.E.), f.53.
- Fig.21 Corte histológico de tecido muscular de Pargo (*Pagrus pagrus*) apresentando presença de material protéico acelular e granular, de aspecto acidófilo e eosinofílico (40X) (H.E.), f.54.

RESUMO

Os peixes são alimentos altamente perecíveis, e como tais exigem cuidados especiais em sua manipulação, estando sujeitos a contaminação por diversos microrganismos. Em condições normais de refrigeração, o prazo de vida útil destes produtos está limitado pelos processos de deterioração enzimática e microbiológica, o que limita seu prazo de distribuição e comercialização. O presente estudo teve como objetivo estabelecer as concentrações e mesclas de gases mais adequados na conservação de Pargo (*Pagrus pagrus*). As amostras foram obtidas em um entreposto de pesca em Niterói. No laboratório, estas foram seccionadas em fragmentos de 50g de lombo cada. Os fragmentos foram embalados em diferentes atmosferas: 100% ar, vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂. As embalagens foram mantidas sob refrigeração (3,0±1,0 C°) por 23 dias. Para contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e de bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram utilizados os meios Agar Padrão para Contagem (APC) e VRBG (violet red bile glucose), respectivamente, incubados a 35°C durante 24/48 horas. Na determinação da concentração de bases voláteis totais (BVT), foi utilizado o método de microdifusão de Conway. O pH foi mensurado pelo método potenciométrico. Os resultados obtidos demonstram um maior crescimento microbiano no pargo acondicionado em 100% ar, seguido pelo acondicionado a vácuo. As contagens de bactérias totais mais baixas foram observadas em atmosferas com a presença de dióxido de carbono. As amostras embaladas sob condições de aerobiose tiveram um aumento de seu pH alcançando um valor de 6,47 no 3° dia, resultados semelhantes foram encontrados nas amostras estocadas a vácuo. Os pargos armazenados em diferentes concentrações de CO₂ apresentaram um aumento mais gradual de seu pH. As amostras embaladas em 100% ar e vácuo tiveram elevadas quantidades de BVT a partir do 3° e 12° dia, respectivamente. A evolução de BVT foi bastante semelhante em todas as amostras enriquecidas com CO₂, apresentando resultados superiores a 30 mg BVT/100g a partir do 19° dia de estocagem, com exceção do 80/20% CO₂/N₂, que se manteve baixo até o final. Estas análises demonstraram que, mesmo nos tratamentos onde houve inibição do crescimento microbiano, ocorreu degradação de aminoácidos e proteínas possivelmente devido a processos enzimáticos autolíticos. Na análise histológica foi observado um crescimento microbiano e uma desintegração das fibras musculares nas embalagens sem CO₂. Com os resultados obtidos se conclui que a embalagem com 80/20% CO₂/N₂ seria a mais adequada para a estocagem do pargo, pois com esta atmosfera houve uma maior preservação da carne, aumentando sua vida útil e sendo eficaz nos parâmetros de qualidade.

PALAVRAS CHAVE: Atmosfera modificada; Pargo (*Pagrus pagrus*); Vida útil; Histologia.

RESUMEN

Los pescados son alimentos altamente perecederos, y como tal exigen cuidados especiales en su manipulación, estando sujetos a contaminación por distintos microorganismos. En condiciones normales de refrigeración, el plazo de vida útil de estos productos está limitado por los procesos de deterioro enzimático y microbiológico, lo que limita su período de distribución y comercialización. El presente estudio tuvo como objetivo establecer las concentraciones y mezclas de gases más adecuadas en la conservación de Pargo (*Pagrus pagrus*). Se obtuvieron las muestras en una Lonja de Pesca en Niterói. En el laboratorio, se seccionaron los pescados y se separaron los lomos (~50 g). Los fragmentos se envasaron en distintas atmósferas: 100% aire, al vacío, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂ y 100% CO₂. Los envases se mantuvieron en refrigeración (3,0 ± 1,0 °C) durante 23 días. Los recuentos de bacterias aerobias totales y recuento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, se llevaron a cabo en PCA (plate count agar) y VRBG (violet red bile glucose), respectivamente, a 35°C durante 24/48h. En la determinación de la concentración de bases nitrogenadas totales (NBVT), se utilizó el método de microdifusión de Conway. El pH se midió en un potenciométrico, y se realizó el análisis sensorial del color, olor y aspecto del producto en el momento de la apertura del envase, y el análisis histológico en los días 0, 5, 9, 15 y 22. Los resultados obtenidos demuestran un mayor crecimiento microbiano en el pargo almacenado en 100% aire, seguidos por aquellos en el vacío. Los recuentos de bacterias totales más bajos fueron observados en atmósferas con presencia de dióxido de carbono, mientras que las *Enterobacteriaceae* presentaron menores recuentos en 80/20% CO₂/N₂. Las muestras envasadas bajo condiciones de aerobiosis tuvieron un aumento de su pH alcanzando valor de 6,47 en el 3º día, resultados similares fueron encontrados en las muestras estocadas al vacío. Los pargos almacenados con distintas concentraciones de CO₂ presentaron un aumento más gradual de sus pH. Las muestras envasadas en 100% aire y vacío tuvieron elevadas cantidades de NBVT a partir del 3º y 12º día, respectivamente. La evolución de NBVT fue bastante semejante en todas las muestras enriquecidas con CO₂, estas presentaron resultados superiores a 30 mg NBVT/100g a partir del 19º día de almacenaje, con excepción del 80/20% CO₂/N₂, que se mantuvo bajo hasta el final. El efecto de las tres atmósferas enriquecidas en CO₂ en las características sensoriales fue similar, excepto en el caso de la textura, ya que mientras que en las muestras almacenadas en 80/20% CO₂/N₂ y 100% CO₂ se observó la aparición de flacidez tras 12 días. En la análisis histológica si observó un crecimiento microbiano y una desintegración de las fibras musculares en los envases sin CO₂. Con los resultados obtenidos se concluyó que el envase con 80/20% CO₂/N₂ sería lo más adecuado para el almacenaje de pargo, pues con esta atmósfera hubo una mayor preservación de la carne, aumentando su vida útil y siendo eficaz en los parámetros de calidad.

PALABRAS CLAVE: Atmósfera modificada; Pargo (*Pagrus pagrus*); Vida útil; Histología.

1 INTRODUÇÃO

O peixe é uma fonte de proteínas de alto valor biológico, além de ser um alimento de alta digestibilidade, com satisfatório teor de gorduras insaturadas, vitaminas e minerais. Dentre seus principais componentes químicos estão a água, proteína bruta e lipídeos, que juntos somam cerca de 98% do peso total da carne (SIKORSKI, 1990). Estes componentes são de máxima importância por influenciarem diretamente o valor nutricional, a qualidade sensorial e a vida útil dos produtos da pesca, sendo a degradação proteica e a oxidação lipídica os principais responsáveis por alterações nestes atributos. No entanto nem todos os compostos nitrogenados estão sob a forma protéica; dentre os compostos não protéicos encontram-se os aminoácidos livres e as bases voláteis nitrogenadas, tais como amônia, trimetilamina, creatina, taurina, ácido úrico e histamina, sendo esta de grande importância em saúde pública e, de acordo com Lehane e Olley (2000), a principal responsável por surtos de intoxicação alimentar envolvendo escombrídeos.

Por sua composição biológica o pescado pode ser considerado um alimento altamente nutritivo, em consequência disto, a produção e consumo de pescado vem aumentando a cada ano.

No Brasil a produção pesqueira tem evoluído significativamente nos últimos anos, sendo o total produzido, incluindo a pesca extrativa costeira, continental, oceânica e a aquicultura de 728 mil toneladas em 1994, passando a 985 mil toneladas em 2002. Os setores que apresentaram maior crescimento foram a pesca continental, oceânica e principalmente a aquicultura, conforme observado na Figura 1 (IBAMA, 2002).

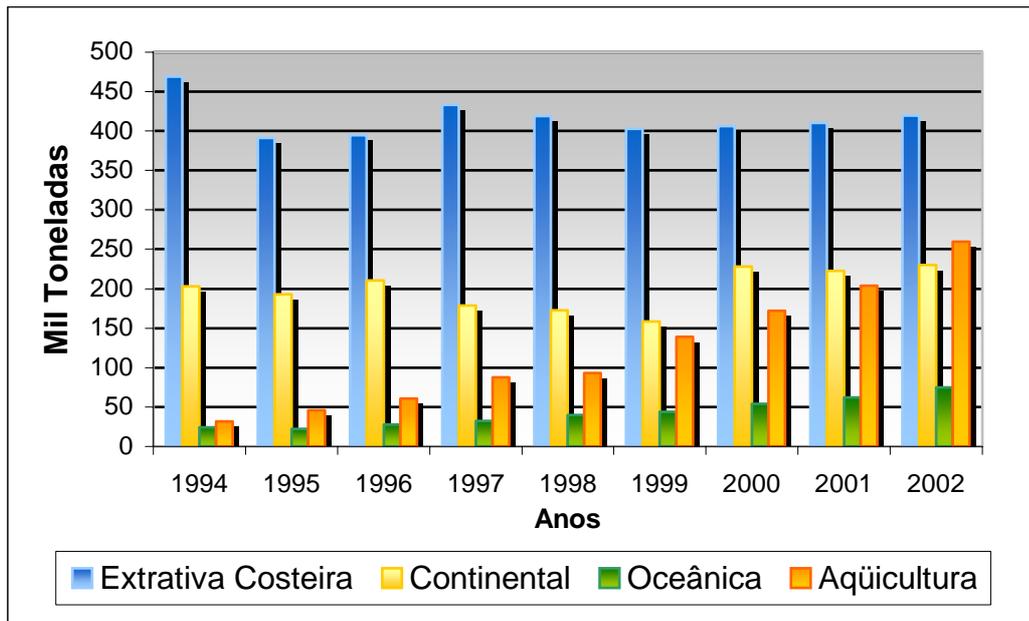


Figura 1 – Representação gráfica da evolução da produção pesqueira no Brasil.

Em 2001 o Brasil ocupava a 27ª posição entre os países produtores de pescado, chegando a uma produção total de 693 mil toneladas oriundas da pesca e 153 mil toneladas oriundas da aqüicultura, ficando atrás de tradicionais países pesqueiros como a China, Peru e Japão (Figura 2) (FIPERJ, 2001).

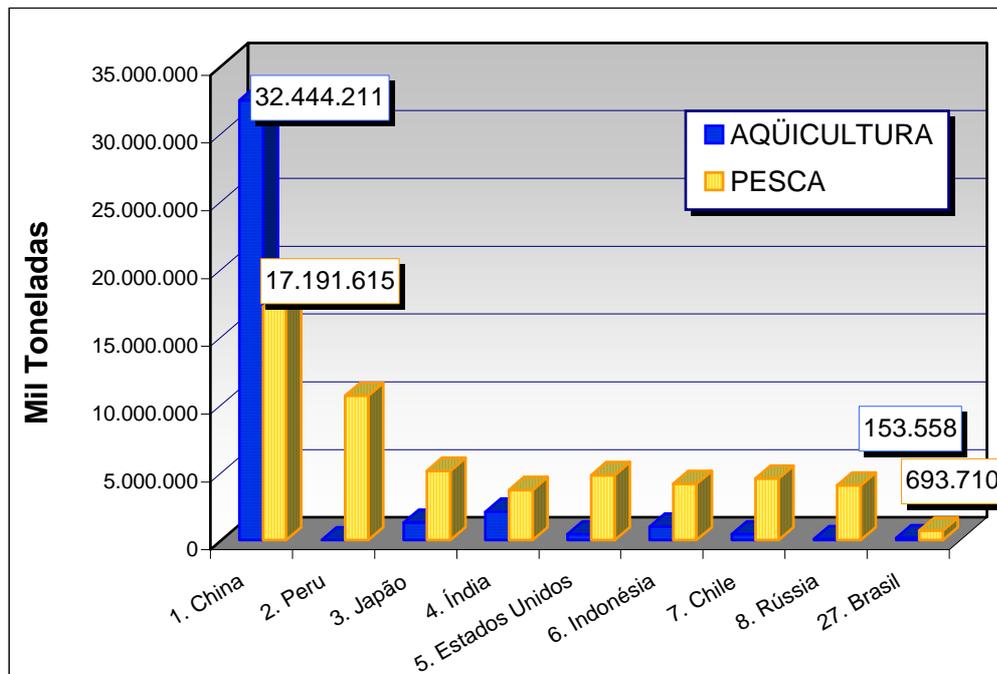


Figura 2 – Representação gráfica da posição do Brasil em relação a outros países no ano de 2001.

Dentre os estados brasileiros, as regiões sudeste e sul apresentam condições oceanográficas, morfologia de fundo e tipo de sedimentação relativamente homogêneos, determinando um ambiente favorável ao desenvolvimento da atividade pesqueira, à exceção do Espírito Santo e o norte do estado do Rio de Janeiro.

Os estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul concentram frotas diversificadas e importantes pontos de desembarque e processamento do pescado. Em 2002 a região Sudeste foi responsável por uma produção total de pescado estimada em 154 mil toneladas, equivalendo a 15,3% da produção de pescado do Brasil neste ano, e o Rio de Janeiro produziu o equivalente a 63 mil toneladas de pescado (Figura 3) (FIPERJ, 2002).

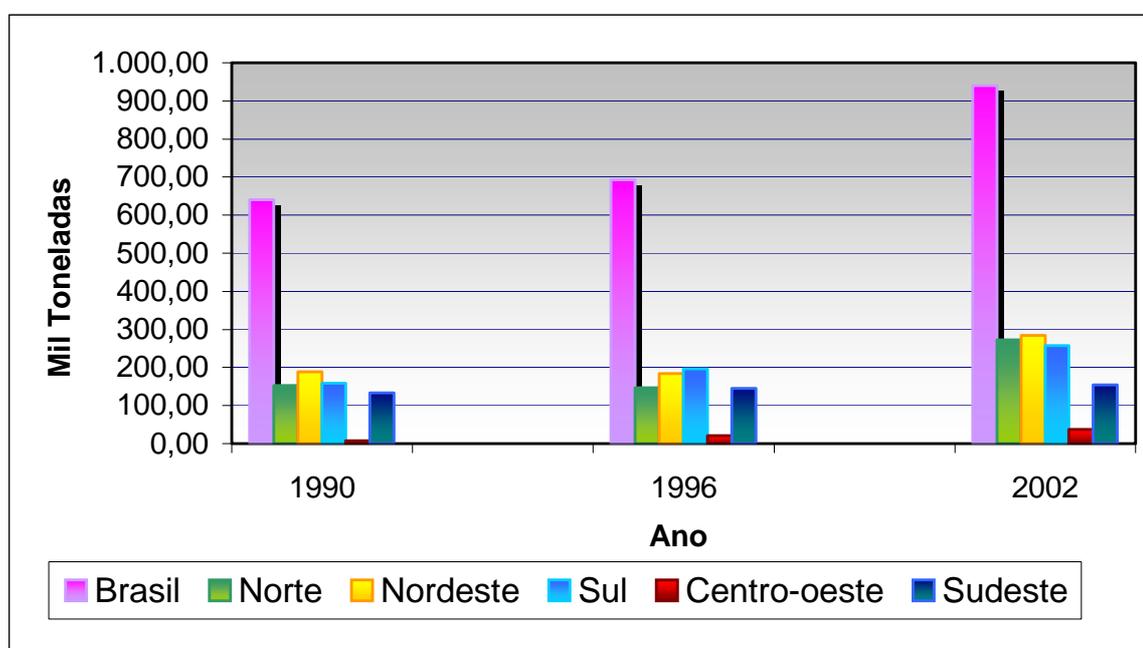


Figura 3 – Representação gráfica da produção total de pescado (t) estimada por ano, segundo as regiões e unidades da federação.

O estado do Rio de Janeiro situa-se um pouco abaixo do limite norte de uma ampla área pesqueira caracterizada pelo alargamento da plataforma continental e pela marcante influência da água subtropical, mais fria e rica em nutrientes, que permitem a sustentação de grandes populações de peixes pelágicos, tais como a sardinha verdadeira, a cavalinha, o pargo e o xerelete, entre outros (INFOPECA, 1997).

Nas regiões Sul e Sudeste, a influência da massa de água da Corrente das Malvinas e a ocorrência de ressurgências possibilitam uma maior abundância de

pescado, especialmente até a altura de Cabo Frio. As ressurgências ocorrem em decorrência da combinação de fatores como mudanças na direção da Corrente do Brasil, topografia de fundo e efeito dos ventos predominantes na área.

O pescado no Brasil situa-se entre as quatro maiores fontes de proteína animal para o consumo humano. As últimas estimativas indicam que esta atividade é responsável pela geração de 800 mil empregos diretos, e conta com um parque industrial composto por cerca de 300 empresas relacionadas à captura e processamento de pescado (IBAMA 2002). Esses fatos demonstram que a pesca brasileira é um componente fundamental para a socioeconomia do país, sendo o pargo (*Pagrus pagrus*) uma das espécies de maior interesse comercial devido à qualidade de sua carne.

Esta espécie habita fundos de rochas, de corais ou de areia, desde a costa até próximo da borda da plataforma continental, em profundidades que variam de 10 a até mais de 200 metros (CARVALHO FILHO, 1992). Ocorrem em águas costeiras tropicais e temperadas (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980) desde os Estados Unidos até a Argentina e também no Mar Mediterrâneo, sendo o peixe mais abundante do litoral capixaba (NOMURA, 1933). Geralmente não formam grandes cardumes; os jovens concentram-se em águas de pouca profundidade, em praias arenosas e rochosas, e os adultos vivem isoladamente ou formam pequenos grupos em águas mais profundas (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980). Embora possam atingir 80 cm e oito quilos, os pargos mais comuns têm menos de 55 cm e dois quilos.

Possuem corpo ovalado e boca pequena, provida de séries de dentes com pontas arredondadas. Sua coloração é rósea com reflexos dourados e pontos azulados (Figura 4).



Figura 4 – Peixe da espécie *Pagrus pagrus*

REINO: ANIMALIA

FILO: CHORDATA

SUPERCLASSE: PISCES

CLASSE: ACTINOPTERYGII

ORDEM: PERCIFORMES

FAMÍLIA: SPARIDAE

GÊNERO: PAGRUS

ESPÉCIE: *P. PAGRUS*

Peixes da espécie *Pagrus pagrus* são facilmente encontrados ao longo do litoral do estado do Rio de Janeiro, sendo fonte de renda para pescadores e principal material de exportação para as indústrias durante todo o ano.

No entanto, por ser um alimento altamente perecível, o pescado exige cuidados especiais na sua manipulação, estando sujeito à contaminação pelos mais variados microrganismos, adquiridos no próprio ambiente aquático, ou durante as diferentes etapas de captura, transporte e distribuição.

Estes microrganismos podem influenciar no prazo de vida comercial do pescado em aerobiose, já reduzido em função da sua própria composição biológica e limitado pelo processo de deterioração enzimática e microbiológica, acarretando um tempo restrito de comercialização e distribuição, principalmente quando transportado a longas distâncias. De maneira geral, quando mantido sob

refrigeração e gelo, a vida útil do pescado pode variar entre dois a 14 dias, dependendo da espécie, local de captura e estação do ano (STAMMEN et al., 1990).

Em função do reduzido prazo de vida comercial, a crescente demanda por produtos frescos, e ainda, com a necessidade de redução de custos relacionados à energia utilizada nos processos de refrigeração e congelamento, justifica-se a busca por tecnologias que permitam um aumento no prazo de vida comercial de alimentos altamente perecíveis e com alto teor protéico como peixes, carnes vermelhas e produtos de aves, possibilitando assim, transportes a longas distâncias mais econômicos, redução de perdas devido à deterioração e conveniência para a indústria e consumidor.

Atendendo a esta demanda, têm-se investido em estudos de embalagens em atmosfera modificada.

Tendo em vista o exposto acima, o presente estudo teve como objetivo geral identificar as concentrações e misturas de gases que apresentam melhor desempenho e, portanto, maior aplicabilidade na conservação desta espécie de pescado sob refrigeração, interferindo no aumento do seu prazo de vida comercial. Para tal alguns objetivos específicos foram estabelecidos, como:

- A determinação do comportamento da população bacteriana durante o período de estocagem, através da contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, e contagem de bactérias da família *Enterobacteriaceae*;
- O estudo das modificações nas características físico-químicas de pH e BVT, durante a estocagem;
- A observação das alterações sensoriais de cor, odor e aspecto;
- A caracterização das alterações histológicas decorrentes do período de estocagem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será feita uma revisão bibliográfica onde serão abordados os temas: deterioração do pescado refrigerado, dando ênfase às alterações microbiológicas, físico-químicas, sensoriais e histológicas durante a armazenagem do pescado sob refrigeração; e ainda o uso de embalagens em atmosfera modificada na preservação de alimentos.

2.1 DETERIORAÇÃO DO PESCADO REFRIGERADO

Dentre os diversos produtos cárneos, o pescado é o mais sensível à deterioração, oxidação e alterações diversas por microrganismos, devido à sua própria composição biológica (ASHIE et al, 1996).

A deterioração em pescado pode ser definida como uma série de mudanças *post mortem* que ocorrem na musculatura do pescado. Tais alterações são potencializadas com a falta de cuidados na manipulação, processamento ou estocagem deficiente (MUKUNDAN et al., 1986).

As diferentes composições dos tecidos do pescado têm uma grande influência no tempo e velocidade de alteração *post mortem*. Dentro de uma mesma espécie, o tamanho, estágio de desenvolvimento, e métodos de captura e manipulação também têm um efeito significativo (RUITER, 1995). Outros fatores a serem levados em consideração são a natureza pecilotérmica do pescado e o seu ambiente aquático, o elevado pH *post mortem*, a presença de grandes quantidades de nitrogênio não protéico e de óxido de trimetilamina (GRAM e HUSS, 1996).

2.1.1 Microbiota do pescado e sua ação no processo de deterioração

O pescado pode ser vinculador de uma grande variedade de microrganismos patogênicos ao homem, sendo a maior parte deles provenientes da contaminação ambiental através de lançamento de esgoto doméstico nas águas de reservatórios, lagos, rios e do mar (CONSTANTINIDO, 1994). Alguns autores citam ainda que na pesca marítima, a captura de peixes em águas costeiras oferece maiores riscos do que a realizada em alto mar, em consequência da poluição dos grandes centros e das desembocaduras de redes de esgoto próximas à costa, promovendo a adição de microrganismos oriundos de matéria fecal à superfície do pescado (EIROA, 1980; LIMA, 1997; ALMEIDA -FILHO, 2004).

A microbiota do pescado vivo está diretamente relacionada às águas onde ele habita. No muco que recobre a superfície externa do pescado já foram isoladas bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Serratia*, *Vibrio*, *Bacillus* e pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Os microrganismos encontram-se tanto nas superfícies externas (pele e brânquias), como nos intestinos dos peixes vivos e recém capturados (HUSS, 1995). Na pele essa carga microbiana é de aproximadamente 10^2 a $10^4/cm^2$, enquanto nas guelras as concentrações variam de 10^3 a $10^6/g$ (OGAWA e MAIA, 1999).

São muitos os microrganismos que habitam o trato digestivo dos animais marinhos e, inevitavelmente, muitos se dispersam pela cavidade abdominal durante a evisceração. A baixa tensão de oxigênio nos intestinos explica a existência de uma diferente distribuição de grupos bacterianos, onde as cepas de *Vibrio* estão em maior quantidade e acredita-se haver uma pequena quantidade de anaeróbios restritos, como o *Clostridium* spp (RUITER, 1995).

As bactérias presentes na superfície do pescado procedente das águas do norte são comumente psicrófilas, enquanto que as presentes em pescado procedente de águas tropicais tendem a ser mesófilas (FRAZIER e WESTHOFF, 1988).

Em termos quantitativos, os peixes capturados em águas muito frias e limpas contêm um menor número de microrganismos do que os capturados em águas quentes. No entanto, sabe-se que o número de microrganismos existentes na pele do pescado pode ser influenciado pelo sistema de pesca, manejo do pescado desde

a captura nos barcos até a sua destinação final, passando por inúmeras fases de processamento e transporte, dentre elas a repleção das vísceras que pode aumentar drasticamente a contaminação bacteriana caso esse processo seja executado de maneira incorreta (FRAZIER e WESTHOFF, 1988; CARDONHA et al., 1994; ZICAN, 1994; HUSS, 1995; BRESSAN e PEREZ, 2001).

Dentre os microrganismos mais importantes destacam-se os do gênero *Vibrio*, onde o *Vibrio parahaemolyticus* está usualmente presente nas águas costeiras do mar (LIMA, 1997); bactérias do gênero *Salmonella*, comumente encontradas em águas poluídas por esgotos ou excretas de animais (GERMANO et al., 1993); *Streptococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* podem estar presentes nas mucosas e superfície da pele, onde encontram ambiente favorável para sua multiplicação, e são conseqüência direta da manipulação inadequada (GERMANO et al., 1998).

O rápido incremento na população bacteriana ao longo do processo de deterioração é conseqüência da intensa multiplicação de *Aeromonas* e *Pseudomonas*, visto que estes gêneros se adaptam rapidamente as condições de refrigeração e se utilizam maneira eficaz os extratos da carne de pescado (SIKORSKI, 1990).

No entanto, o peixe absolutamente fresco e íntegro é impermeável a bactérias devido à pele intacta. Após a morte, a autólise se instala, tornando a pele do peixe permeável às bactérias e ao mesmo tempo liberando açúcares simples, aminoácidos livres, entre outras substâncias, o que provê um meio rico em nutrientes para o crescimento bacteriano (MUKUNDAN et al., 1986). Durante os primeiros dias de armazenamento em gelo, a população bacteriana se concentra na superfície da pele do pescado. A lenta penetração no tecido muscular ocorre principalmente em pontos onde estejam presentes cortes e erosões na pele, que facilitem o ingresso bacteriano. A taxa de penetração dependerá das características próprias da pele da espécie pesqueira, podendo diferir muito entre uma espécie e outra (SIKORSKI, 1990).

A deterioração no pescado ocorre em velocidades muito distintas, e tem-se proposto como explicação diversas propriedades da superfície do pescado, como a textura da pele que em espécies como o bacalhau (*Gadus morhua*) e a merluza (*Merlangius merlangus*) se apresenta frágil e de fácil deterioração, quando comparados a alguns peixes planos (HUSS, 1995).

2.1.2 Alterações físico-químicas

Após a captura e morte, a atividade celular se mantém impulsionada pelas reservas energéticas que ainda restam. A degradação do glicogênio em glicose e ácido láctico é similar à que ocorre com a carne dos mamíferos, e o acúmulo de ácido láctico provoca um decréscimo do pH muscular. Ainda que este decréscimo seja mais rápido nos pescados que nos mamíferos, a maior parte dos peixes possui pouco glicogênio muscular, e grande parte deste se perde durante a captura, onde o peixe emprega grande esforço para fugir de redes ou anzóis, esgotando assim sua reserva energética, de maneira que o seu pH final é alto (MEDEIROS, 2002).

Conforme o processo de degradação avança, o pH muscular aumenta superando o valor da neutralidade, permitindo a liberação de quantidades cada vez maiores de amoníaco, contribuindo para criar o odor típico de pescado decomposto. Sem dúvida, a causa predominante do odor amoniacal é a trimetilamina (TMA), originária da degradação do óxido de trimetilamina (OTMA), no entanto outros produtos do metabolismo bacteriano também contribuem na percepção sensorial da degradação, como os ácidos graxos de cadeia curta como o ácido láctico e o ácido butírico, derivados dos açúcares glicose e ribose; os aldeídos e cetonas dos lipídios tissulares; aminas como o indol, o escatol, a histamina, a putrescina e a cadaverina; assim como o amoníaco procedente dos aminoácidos e proteínas (RUITER, 1995).

A deterioração ou as alterações autolíticas são as principais responsáveis pela perda da qualidade inicial do pescado fresco, principalmente devido ao rápido desenvolvimento de odores desagradáveis e ao aparecimento de manchas devido à ação de enzimas digestivas. A alteração autolítica mais importante é a redução do OTMA, que ocorre devido à ação de bactérias e que em peixes refrigerados leva à formação de TMA, enquanto no pescado congelado a atividade bacteriana é inibida e o OTMA é convertido em dimetilamina e formoldeído por enzimas autolíticas (HUSS, 1995).

2.1.2.1 pH

As modificações de pH ocasionadas pela decomposição do pescado têm origem na atividade enzimática e ação das bactérias que modificam a concentração

de íons livres disponíveis (OGAWA e MAIA, 1999). Em geral, o ácido láctico gerado a partir do glicogênio, em condições de anaerobiose, é a principal causa da queda do pH *post mortem*, porém essa acidificação também é influenciada pela liberação de fosfatos inorgânicos e amoníaco, como consequência da degradação enzimática do ATP (SIKORSKI, 1990).

A queda do pH após a captura está diretamente relacionada com as condições de pesca, onde quanto maior for a resistência do peixe à captura e conseqüentemente maior for o seu nível de estresse e fadiga, menor serão as reservas de glicogênio muscular, ocasionando em uma menor produção de ácido láctico, determinando o pH final do pescado (LEITÃO, 1984). Porém, dentro de uma mesma espécie, o pH muscular pode variar consideravelmente dependendo da estação do ano e do estado biológico do pescado (RUITER, 1995; GRIKORAKIS et al. 2003).

De maneira geral, o pH final do pescado capturado em águas frias não é menor que 6,2, no entanto, com o início do processo de deterioração o pH do pescado aumenta em função da decomposição de aminoácidos e da uréia, e da desaminação, criando um meio favorável ao crescimento bacteriano.

Em geral, valores de pH próximos a 7,0 são indicativos de decomposição, e à medida que os valores passam de neutros a alcalinos, o produto torna-se impróprio para o consumo. Conforme determina o Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA (BRASIL, 1981) que estabelece que os valores de pH para carnes de pescado próprias para consumo imediato variam entre 5,8 a 6,4, e que acima deste índice a carne encontra-se em início de decomposição.

2.1.2.2 Bases Voláteis Totais

A degradação *post mortem* dos compostos nitrogenados é o principal responsável pela perda gradual do frescor do pescado e pelo aparecimento dos primeiros sinais de putrefação. Isto se deve à decomposição de alguns componentes não protéicos que influenciam no aroma dos alimentos marinhos, bem como da formação de compostos voláteis e degradação de proteínas, que originam colorações e propriedades sensoriais indesejáveis à carne de pescado.

As bases voláteis totais compreendem o amoníaco, trimetilamina (TMA), pequenas quantidades de dimetilamina (DMA) e metilamina e, conforme o processo de decomposição bacteriana, ocorre um incremento significativo em suas quantidades.

Dentre as alterações que originam compostos voláteis a mais importante é a redução do óxido de trimetilamina (OTMA) em TMA (Figura 5), e o desdobramento endógeno do OTMA até DMA e formoldeído (Figura 6). Ambas reações contribuem para um aumento gradual nas bases voláteis totais nos músculos de pescado. A produção de DMA e formoldeído ocorre principalmente em pescado congelado, em condições anaeróbias.



Figura 5 – Esquema da redução do OTMA em TMA.



Figura 6 – Esquema do desdobramento endógeno do OTMA até DMA e formoldeído.

No início do processo degradativo, a base volátil mais representativa é a amônia originária dos produtos da desaminação dos derivados do ATP e, posteriormente, tem-se o incremento da amônia derivada da degradação de outros compostos nitrogenados e TMA, formada a partir do OTMA. Isto ocorre através da ação de bactérias anaeróbias capazes de empregar o OTMA como aceptor final da cadeia de elétrons durante a respiração anaeróbia, posteriormente reduzido a TMA, um dos compostos predominantes no pescado deteriorado e responsável pelo seu odor típico (OGAWA e MAIA, 1999). A redução do OTMA está geralmente associada às bactérias típicas do ambiente marinho como as dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas*, assim como as bactérias intestinais como as *Enterobacteriaceae* (HUSS, 1995).

No Brasil a Portaria nº 185 de 13 de maio de 1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1997) determina que o limite legal para as bases voláteis totais em pescados não elasmobrânquios é de 30mgN/100g. Lira et al. (2001) analisaram a quantidade de bases voláteis totais em 45 amostras de peixe-serra (*Pristis pectinata*) comercializados em um mercado em Maceió e encontraram valores oscilando entre 18,67 mg N/100g a 22,32 mg N/100g de músculo.

2.1.3 Propriedades sensoriais

A avaliação sensorial é uma das principais ferramentas de determinação do estado de frescor do pescado por ser um método rápido, de fácil execução, de baixo custo, não destrutivo e por estar diretamente relacionado aos critérios de aceitação adotados pelo consumidor. A avaliação sensorial baseia-se em parâmetros como a aparência, textura e odor.

De maneira geral o pescado fresco apresenta um sabor de algas marinhas, doce e delicado, um odor característico, carne firme, elástica, de coloração translúcida, uniforme e brilhante. Com o início do processo de deterioração formam-se compostos com odor e sabor ácidos, tendendo a ervas ou frutas, e mais tarde aparecem substâncias amargas, de aspecto gomoso e aroma sulfuroso, culminando com o caráter amoniacal e fecal, característico do estado pútrido, sendo os microrganismos os principais agentes responsáveis pela origem de sabores e odores indesejáveis (HUSS, 1995).

A carne do pescado fresco é translúcida, porém, com o passar do tempo e o início do processo de deterioração, tende a ser opaca. A coloração da carne branca do pescado varia de branco leitoso claro até cinza. Por oxidação enzimática dos pigmentos hemoglobina, os músculos de coloração vermelho escuro se tornam castanhos. O tecido muscular existente sob a pele, que a principio é claro e aquoso, torna-se turvo e gomoso adquirindo diversas tonalidades, como resultado do abundante crescimento bacteriano (SIKORSKI, 1990).

Sikorski (1990) afirma ainda que as alterações na textura do pescado são comumente representadas por uma diminuição na elasticidade e um aumento na

maciez, sendo este resultado da desintegração estrutural conseqüente do relaxamento do tecido conjuntivo e da fragmentação das miofibrilas.

De acordo com o objetivo do experimento, podem ser realizados testes sensoriais discriminativos, descritivos ou afetivos. A análise descritiva é um conjunto de métodos de avaliação sensorial que identifica, descreve e quantifica as características sensoriais de um produto (MORALES, 1994). Atributos como aparência, aroma, sabor e textura são importantes na avaliação da qualidade do pescado quando se utiliza este método (BIRCH et al., 1977). Tais atributos foram utilizados por Borges (2005) ao estudar a qualidade da corvina (*Micropogonias furnieri*) eviscerada e inteira, estocadas em diferentes períodos à temperatura de 0°C, bem como por Lalitha et al. (2005) ao analisarem as alterações microbiológicas e bioquímicas em pearl spot (*Etroplus suratensis* Bloch) estocado em embalagem em atmosfera modificada (EAM).

Lannelongue et al. (1982) trabalhando com carne de peixe espada (*Ziphius gladius*), e Parkin et al. (1981) estudando a conservação de filés de pescado, também utilizaram a coloração como atributo de avaliação da qualidade de pescado em EAM.

2.1.4 Aspectos histológicos

Os peixes teleósteos possuem sistema músculo-esquelético com esqueleto axial e apendicular de osso verdadeiro, com os mesmos componentes básicos do esqueleto de mamíferos. A musculatura apresenta-se organizada formando compartimentos distintos, sendo a musculatura subjacente à derme, vermelha, e a musculatura profunda, branca (SUZUKI, 1987). A distribuição dos tipos de fibras na musculatura vermelha e branca mostra-se variável entre as diferentes espécies. Esta variação pode ser atribuída ao modo de locomoção, bem como ao hábito alimentar desses animais (ROBERTS, 1978). Em peixes de maior atividade a concentração de fibras vermelhas aumenta, como no atum onde as fibras vermelhas contribuem significativamente com o total de tecido muscular, sendo a musculatura branca aparentemente utilizada durante a aceleração e natação rápida (BECHTEL, 1986).

Semelhante aos mamíferos, os peixes também possuem musculatura lisa e dois tipos de musculatura estriada. Histologicamente, a musculatura lisa caracteriza-

se por ser constituída de fibras longas, afiladas, mononucleadas e desprovidas de estriações. Já o músculo cardíaco apresenta estrias transversais, formadas por células ramificadas e com núcleo central. A musculatura estriada esquelética é formada por células multinucleadas com núcleos periféricos (ROBERTS, 1978).

A deterioração da musculatura do pescado é caracterizada pela presença de dois processos distintos, a autólise e a heterólise. A autólise muscular tem como consequência a perda de detalhes celulares e tinturiais, o citoplasma torna-se granuloso e hialino, e há perda dos limites celulares e afinidade pelos corantes. Assim como a autólise, a heterólise também, é um fenômeno comumente encontrado durante o processo de degradação tecidual, sendo caracterizada como uma destruição tecidual causada por enzimas proteolíticas, decorrentes da proliferação bacteriana nos tecidos. Como consequência da heterólise tem-se o aparecimento de enfisema cadavérico, que se caracteriza pela crepitação no tecido subcutâneo, muscular e em órgãos parenquimatosos (VASCONCELOS, 1987).

2.2 EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA

Tecnologias que lidam com a extensão, segurança, e tempo de vida comercial de alimentos altamente perecíveis e com alto teor protéico como o pescado, carnes vermelhas e produtos de aves, são de enorme significância econômica por possibilitarem transportes a longas distâncias mais econômicos, redução de perdas em função da deterioração e conveniência para a indústria e consumidor (GENIGEORGIS, 1985).

A cada dia surgem novas tecnologias que permitem um aumento no prazo de vida comercial dos produtos e incremento nas suas características sensoriais, de modo a torná-los mais atrativos e de fácil acesso ao consumidor, especialmente no que tange a manutenção do seu estado de frescor (HINTLIAN e HOTCHKISS, 1986), em detrimento da demanda de consumo de alimentos enlatados e congelados (FARBER, 1991). Atendendo a esta demanda, tem-se investido em estudos de embalagens em atmosfera modificada (EAM).

Os métodos de conservação sob atmosfera modificada consistem nas diferentes maneiras pelas quais o dióxido de carbono é utilizado como conservante de alimentos. De um modo geral, a EAM é um processo hipobárico que consiste em

alterar a atmosfera da câmara ou da embalagem, preenchendo-a com diferentes misturas de gás carbônico (CO₂) nitrogênio (N₂) e oxigênio (O₂) (JAY, 2004).

2.2.1 Breve histórico

O CO₂ é conhecido desde a antiguidade. Em 1877 Pasteur e Joubert observaram que *Bacillus anthracis* poderia ser inibido por CO₂ (VALLEY, 1928), e cinco anos mais tarde Kolbe¹ (1882, apud JAY,2004) publicou o primeiro artigo sobre o efeito do CO₂ na preservação da carne bovina, mostrando que grandes quantidades de CO₂ aumentam a vida de prateleira de carnes por quatro a cinco semanas. Em 1889 foi reconhecida a atividade antibacteriana do CO₂, e em 1910 estabeleceu-se a utilização de embalagem em atmosfera modificada para conservar diversos alimentos (JAY, 2004).

Nos anos 30 surgiram novos estudos sobre atmosfera modificada impulsionados pela utilização do CO₂ na conservação de carnes transportadas de navio a partir da Austrália e Nova Zelândia até a Inglaterra, como os realizados por Killefer (1930), Coyne (1932) e Stansby e Griffiths (1935). Em 1938 aproximadamente 26% da carne de gado comercializada na Nova Zelândia e 60% da carne comercializada na Austrália eram transportadas por navios sob atmosferas de CO₂ (SORHEIM e NISSEN, 2005). Esse aumento estava relacionado às, então novas, tecnologias de embalagens, com desenvolvimento de polímeros e equipamentos de termo-moldagem de empacotamento (WOLFE, 1980).

Nos anos 70, com o avanço de embalagens individuais para um público cada vez mais exigente, a tecnologia de embalagem em atmosfera modificada (EAM) apresentou um grande impulso (WOLFE, 1980). Em 1974 foi introduzida a EAM no comércio varejista de alimentos de origem animal na França (CHURCH, 1994).

Em 1980 Brown et al. revisaram o efeito da temperatura, solubilidade e inibição de CO₂ e concluíram que, ao contrário do mecanismo sinérgico entre temperatura e solubilidade, todas as evidências apontam que o aumento de temperatura reduz a solubilidade e aumenta o crescimento microbiano.

¹ KOLBE, H. Antiseptische eigenschaften der kohlensaure. *Journal Für Praktische Chemie*. V. 26, p. 249-255, 1882.

Desde a década de 80, 90, até os dias de hoje, muita produção bibliográfica foi desenvolvida a respeito do tema embalagem sob atmosfera modificada. Revisões feitas por Wolfe (1980); Pedrosa-Menabrito e Regenstein (1988); Stammen et al. (1990); Church e Parsons (1995); e Siversvik et al. (2002) documentaram a habilidade da EAM de aumentar a duração do tempo de prateleira de vários produtos perecíveis, como carne, aves e pescado.

A tecnologia de EAM é atualmente difundida em praticamente todos os países desenvolvidos, e cerca de 10% a 40% dos produtos de origem animal já são comercializados sob EAM. A Noruega é o país onde se verifica a maior proporção de alimentos comercializados sob EAM, com aproximadamente 60% do total do país (SORHEIM e NISSEN, 2005).

2.2.2 Gases utilizados

O método de embalagem em atmosfera modificada consiste em substituir a atmosfera que rodeia o produto por um gás ou mistura de gases, especialmente desenvolvidos para cada tipo de alimento.

De acordo com Genigeorgis (1985) existem basicamente três categorias de atmosfera modificada usadas na preservação de alimentos: a modificação da atmosfera através da técnica de embalagem, como a embalagem a vácuo; a redução da pressão atmosférica dentro do container para que se possa alcançar uma condição de estocagem hipobárica; e a modificação da atmosfera através do enriquecimento da embalagem ou container pela adição de uma variedade de gases ou mistura desses. Nestas são utilizados diversos tipos de gases, cujos mais freqüentes são o dióxido de carbono (CO₂), o nitrogênio (N₂) e o oxigênio (O₂).

O dióxido de carbono exerce um forte efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano, sendo particularmente efetivo contra as bactérias aeróbias Gram negativas da decomposição, tais como *Pseudomonas* e *Shewanella*, que provocam alterações de cor e odor em carnes, aves e pescados (CHURCH, 1994). Estudos comprovam que mesmo quando utilizado em baixas concentrações (20%) o CO₂ produz efeitos eficientes na preservação do pescado (BROWN et al., 1980). Parry (1993) afirma que as concentrações de CO₂ acima de 5% inibem o crescimento da

maior parte das bactérias causadoras de deterioração, especialmente as psicrófilas, que crescem em grande parte de alimentos refrigerados.

Em peixes, o estudo de misturas gasosas mais convenientes para a conservação e otimização do armazenamento ainda não está totalmente definido, assim como as modificações na caracterização sensorial e nos parâmetros físico-químicos de várias espécies quando embaladas em atmosfera modificada, entretanto a mais promissora parece ser a atmosfera enriquecida com altas concentrações de CO₂.

Stammen et al. (1990) afirmam ainda que elevadas concentrações de dióxido de carbono em embalagem em atmosfera modificada têm demonstrado boa inibição da microbiota normal de decomposição do pescado, duplicando ou triplicando o seu prazo de vida comercial.

Entretanto o CO₂ não retarda o crescimento de todos os microrganismos, e seu efeito inibidor aumenta com a diminuição da temperatura, em decorrência do aumento da sua solubilidade (STAMMEN et al., 1990; PARRY, 1993; SIVERSTIVIK et al., 2002).

O nitrogênio é um gás insípido, incolor, inodoro e insolúvel em gordura e água, sendo utilizado, principalmente, para substituir o oxigênio, retardando a oxidação e prevenindo o aparecimento do ranço. Indiretamente também pode influenciar na preservação de produtos perecíveis, por dificultar o desenvolvimento dos microrganismos aeróbios responsáveis pela decomposição. Também é usado para manter a integridade da embalagem comercial, evitando o colapso ocasionado pela diferença de pressão pela retirada do ar, em alimentos que consomem CO₂ (CHURCH, 1994).

O oxigênio é o responsável pela coloração vermelha-brilhante da carne fresca, por se ligar à hemoglobina formando o complexo oximioglobina, sendo utilizado em embalagens com o intuito de melhorar a aparência dos produtos cárneos (PHILLIPS, 1996). Sua ausência gera uma coloração amarronzada, em decorrência da formação do pigmento metamioglobina. No entanto, a presença do O₂ em grandes proporções induz ao aparecimento do ranço, devendo ser evitado, principalmente em peixes gordos, por favorecer o processo de rancificação oxidativa (STAMMEN et al., 1990), gerando sabor e odor desagradáveis, levando a uma redução no prazo de vida comercial desses produtos.

A eficiência do CO₂ na conservação do pescado foi constatado por Killefer (1930) que observou um aumento de 2 a 3 vezes na vida útil do pescado fresco. Resultado semelhante ao encontrado por Özogul et al. (2004) ao estudarem o efeito da embalagem em atmosfera modificada (EAM) nas alterações químicas, sensoriais e microbiológicas de sardinhas (*Sardina pilchardus*) mantidas sob refrigeração, e determinaram que a EAM aumentou o prazo de vida comercial de três dias quando estocadas em ar atmosférico, para 12 dias quando estocadas em EAM.

Ordoñez et al. (2000) estudaram as mudanças microbiológicas e físico-químicas de files de merluza (*Merluccius merluccious*) estocadas em atmosferas enriquecidas com dióxido de carbono, concluindo que a atmosfera de 40% de CO₂ e 60% de ar é a recomendada para a embalagem de merluza sobre refrigeração, o que pode resultar em um aumento na vida comercial de até três vezes, tanto sob o ponto de vista microbiológico, quanto sensorial.

Avaliando amostras de carne de rã, Conte-Júnior et al. (2003) concluíram que o uso de atmosfera modificada contendo 80% de CO₂ na preservação de carne de rã aumentou de forma satisfatória a vida útil do produto. Corroborando com o referido autor, Lopes et al. (2004), utilizando amostras de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*), concluiu que, do ponto de vista microbiológico, as embalagens enriquecidas com CO₂ demonstraram os melhores resultados. Atentou também para os resultados das bases voláteis totais que, se consideradas em conjunto com a inibição microbiana, foram decisivos para definir o prazo de vida útil do produto.

Poli et al. (2006) ao estudarem as alterações sensoriais, físicas, químicas e microbiológicas em Robalo (*Dicentrarchus labrax*) embalado em atmosfera modificada e em ar, encontraram altos indícios de desenvolvimento bacteriano nos primeiros dias de estocagem em aerobiose, alcançando valores acima de Log 6 UFC/g no 5º dia de estocagem em ar e no 8º em EAM.

Soccol et al. (2005) compararam o efeito da embalagem em atmosfera modificada e a vácuo na conservação filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*), e concluíram que as atmosferas enriquecidas com CO₂ demonstraram melhor desempenho.

Muitos autores estudaram o comportamento de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos em pescado, como Reddy et al. (1994) e Reddy et al. (1995), ao estudarem filés de tilápia (*Oreochromis nilótica*), López-Gálvez et al. (1995), trabalhando com filés de Atum (*Thunnus alalunga*), e Sivertsvik et al. (2003)

estudando filés de salmão (*Salmo salar*), e todos observaram um aumento de vida útil destes produtos quando submetidos à ação do CO₂ em variadas concentrações.

A utilização do CO₂ na conservação de alimentos é comprovadamente eficaz, no entanto estudos demonstram que altas concentrações de CO₂ dissolvidos na fase aquosa do músculo de pescado embalado em atmosfera modificada, promovem uma acidificação tecidual, e conseqüente diminuição na capacidade de retenção de água das proteínas musculares, ocasionando um aumento nas perdas por gotejamento (HUSS, 1995; PASTORIZA, et al., 1998). Conforme comprovado por Albanese et al. (2005) que ao estudarem as alterações químicas e microbiológicas apresentadas por Sêpias (*Sepia officinalis*) em EAM verificaram o aparecimento do “drip” a partir do 5º dia de estocagem, contabilizando uma perda final de 2,5% do peso total do pescado. Já Church (1994) evidenciou uma redução na qualidade da textura do músculo do pescado armazenado em altas concentrações de CO₂.

Apesar dessas implicações, a aplicação da tecnologia de atmosfera modificada vem crescendo a cada ano. Em 1994 cerca de 95% de toda a massa fresca e 10% dos frutos do mar vendidos no Reino Unido era embalada em atmosfera modificada (CHURCH, 1994), e em 2005 60% dos alimentos comercializados na Noruega estavam sob EAM (SORHEIM e NISSEN, 2005).

2.2.3 Características do material de envase

O sucesso da utilização da EAM está intimamente relacionado à qualidade dos materiais utilizados no envase do produto. Estes têm como finalidade manter a atmosfera interna isolada do ambiente externo, e devem possuir características específicas como: resistência à abrasão, ruptura e perfuração; espessura adequada a fim de evitar microporos; e transparência, permitindo sempre a visualização do produto.

Os polímeros mais utilizados em EAM são o polietileno, a poliamida, o polipropileno, o poliestireno, o cloreto de polivinil (PVC), o cloreto de polivinileno, o poliéster, o etilvinilálcool, e as combinações entre estes, com o intuito de melhorar a eficiência do filme (STAMMEN, 1990). No presente estudo foi utilizado um filme de polietileno BBL4, multicamadas e de baixa permeabilidade, da empresa “Cryovac”.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão descritos os materiais permanentes e de consumo, e os métodos de análise bacteriológica, físico-química, sensorial e histológica utilizados para a realização deste experimento.

3.1 MATERIAL PERMANENTE

Para o preparo das amostras foram utilizadas facas higienizadas para segmentação; balança de precisão da marca Marte, modelo AM550 Automarte para pesagem; seladora a vácuo da marca TECMAQ, modelo AP 450 utilizada para a embalagem e termo-soldagem; e geladeira Eletrolux, modelo Doublé D440 para estocagem.

Para as análises bacteriológicas foram utilizados: bico de Bunsen; balança de precisão da marca Marte, modelo AM550 Automarte; aparelho Stomacher 80 laboratory blender marca Seward; estufa marca Fanem LTDA; pipetador automático; pinça; e contador de colônias LEICA Quebec Darkfield Colony Counter (Figura 9).

Nas análises físico-químicas foram utilizados: aparelho pHmeter para mensuração do pH; e para determinação das bases voláteis totais (BVT) foram utilizados balança de precisão da marca Marte, modelo AM550 Automarte para pesagem das amostras; beakers, frasco de Kitassato, funil de Büchner, e liquidificador para obtenção do extrato; estufa retilínea marca Fanem, pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10mL, e placas de microdifusão de Conway com tampa para difusão das bases voláteis; e microbureta de 2 mL para titulação.

Para a realização do estudo histológico foram utilizados: micrótomo *American Optical Rotary 820* para a realização dos cortes de blocos de parafina; estufa para a

secagem das lâminas e conservação da parafina no estado líquido; e microscópio óptico *Olympus RX 41* para observação das lâminas.

3.2 MATERIAL DE CONSUMO

Para o preparo das amostras foram utilizadas embalagens plásticas de polietileno com baixa permeabilidade a gases. Para as análises bacteriológicas foram utilizados: bisturi, sacos de “Stomacher”, ponteiras descartáveis, “Eppendorfs”, placas de Petri descartáveis, meio de cultura Àgar Padrão para Contagem (Brittania), meio de cultura VRBG (Oxoid), e solução salina peptonada a 0,1%.

Na análise físico-química de BVT foram utilizados: ácido tricloroacético P.A. Merck, e papel filtro Whatman nº5 sem cinzas para obtenção do extrato; ácido bórico P.A. Vetec, e carbonato de potássio P.A. Merck, para difusão das bases voláteis; e solução de ácido clorídrico 0,1mol/L Merck para titulação.

Para análise histológica foram utilizados os seguintes materiais: formol salino 10%, álcool 70% até absoluto, xilol, parafina, corante hematoxilina-eosina, lâminas e lamínulas.

Foram empregados ainda materiais rotineiramente utilizados para a realização das análises, comumente encontrados nos laboratórios.

3.3 MÉTODOS

Os métodos serão abordados em sua seqüência de execução, iniciando pela aquisição, transporte e colheita de amostras, e posterior análises bacteriológica, histológica, físico-química, sensorial e estatística.

3.3.1 Aquisição, transporte e colheita de amostras

O pescado da espécie *Pagrus pagrus* foi obtido no Entreposto de pesca – Mercado de Peixe, localizado em Niterói (RJ), onde foi possível obter espécimes com alto grau de frescor e com características semelhantes à do pescado destinado ao consumo.

Os peixes foram acondicionados em caixas de isopor com gelo, e transportados até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de

Veterinária, da Universidade Federal Fluminense, onde as amostras foram colhidas e processadas.

Uma vez no laboratório os peixes foram lavados com água destilada esterilizada com o objetivo de homogeneizar a possível contaminação inicial, e tiveram os seus lombos seccionados em 82 fragmentos de 50 gramas cada, onde 25 gramas foram destinados à realização das análises bacteriológicas, análise de pH e sensorial, e 25 gramas para a realização da análise de BVT. Os fragmentos foram acondicionados em embalagens plásticas “Cryovac BBL4” com estrutura multicamadas de baixa permeabilidade a gases (Figura 7), contendo um litro de gás ou mistura de gases pré-determinada de: 100% ar atmosférico; vácuo; 40/60% CO₂/N₂; 80/20% CO₂/N₂; e 100% CO₂. As embalagens foram termo-seladas (Figura 8) e acondicionadas à temperatura de refrigeração (2,0 ± 2,0 °C).



Figura 7 - Embalagem plástica de polietileno com baixa permeabilidade a gases, contendo fragmento de 50 gramas de pargo.



Figura 8 - Termoseladora a vácuo (TECMAQ, modelo AP 450).

3.3.2 Análises bacteriológicas

As análises bacteriológicas foram realizadas a partir de 25 gramas das amostras embaladas e estocadas sob refrigeração. A tomada de amostras para microbiologia foi realizada diariamente, ou em dias alternados, de acordo com os resultados obtidos em dias anteriores, de modo que, ao término das análises, foi possível estabelecer uma curva de crescimento bacteriano para cada atmosfera. Foram feitas diluições consecutivas com solução salina peptonada 0,1% estéril que serviram tanto para as análises bacteriológicas quanto para aferição do pH.

Para contagem de bactérias heterotróficas aeróbias e mesófilas e contagem de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, foi empregada metodologia descrita pelo LANARA (BRASIL, 1981a), utilizando-se os meios de cultura Ágar Padrão para Contagem (APC) marca Oxoid, e “violet red bile glucose” (VRBG), respectivamente, na forma de Pour-Plate, com incubação à 35°C por 24/48hs.

O meio APC é um meio não seletivo que contém: peptona de caseína, responsável por fornecer aminoácidos e minerais necessários ao crescimento bacteriano; extrato de levedura, que funciona como fonte de vitaminas do complexo B; e dextrose, uma fonte de energia. Após a incubação foi verificado o surgimento de unidades formadoras de colônia de coloração branco amareladas, em um meio de fundo transparente (PLATE COUNT AGAR, 2006). O meio VRBG contém cristais

violeta e sais biliares que atuam como inibidores da microbiota Gram positiva. Com a degradação da glicose pelas enterobactérias ocorre a produção de ácidos, indicada pela coloração avermelhada e por zonas de precipitação de sais biliares ao redor das colônias (VIOLET RED BILE GLUCOSE, 2006). Tais características podem ser observadas na Figura 10.



Figura 9 – Contador de Colônias (LEICA Quebec Darkfield Colony Counter)

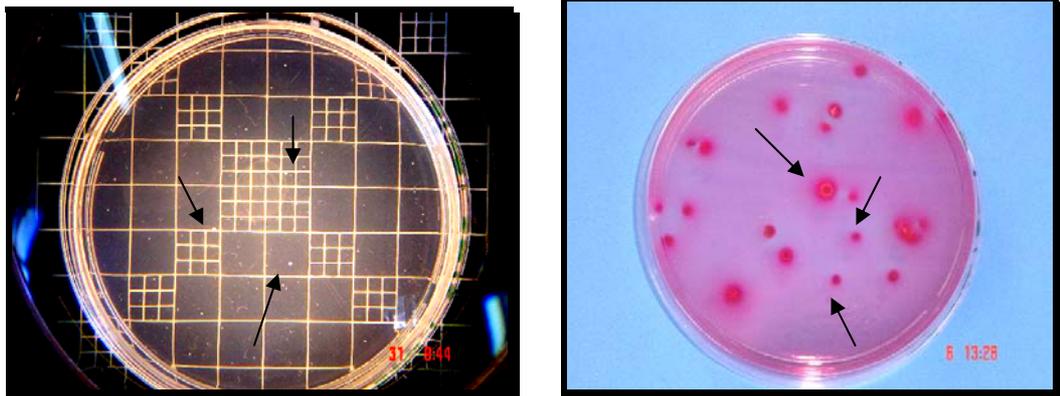


Figura 10 – UFC (setas) em meio Agar Padrão para Contagem e VRBG

3.3.3 Análise Histológica

Para análise histológica foram utilizadas 21 amostras, de 20 gramas cada, previamente embaladas nas diferentes atmosferas, sendo quatro para cada atmosfera, e mantidas sob refrigeração. As embalagens foram abertas em intervalos

de cinco dias, até a completa deterioração da amostra. Os fragmentos foram acondicionados, individualizados e identificados, em frascos contendo solução salina de formol 10% para fixação, onde permaneceram até o término das demais análises (Figura 11).



Figura 11 – Esquema de acondicionamento de amostras em gaze para posterior imersão em formoldeído.

Posteriormente estes foram clivados e processados segundo as técnicas histológicas usuais, que consistem nas etapas de clivagem, desidratação, diafanização, impregnação pela parafina, inclusão, microtomia, desparafinização, hidratação, coloração e montagem das lâminas de microscopia.

3.3.4 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas a partir das amostras embaladas e estocadas sob refrigeração, seguindo o mesmo padrão de dias das análises microbiológicas.

A aferição do pH foi realizada a partir da diluição da amostra em solução salina peptonada 0,1%, utilizando o método potenciométrico, que se baseia na determinação instrumental do pH (Figura 12) (BRASIL, 1981b).

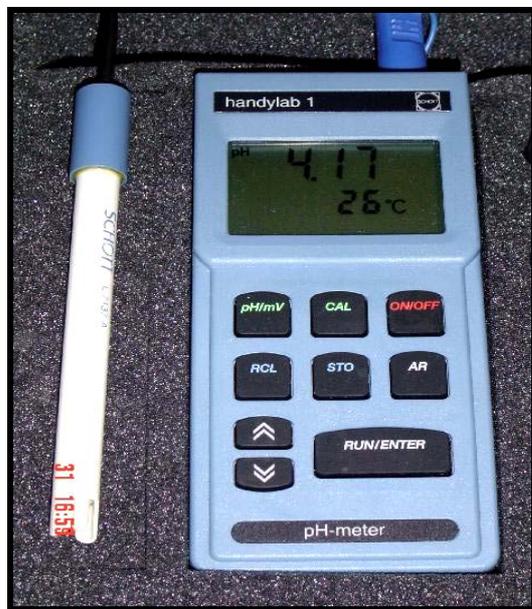


Figura 12 – pHmeter utilizado para aferição do pH

Para quantificação de bases voláteis totais foi utilizado o método de microdifusão de Conway, segundo metodologia descrita no manual do LANARA (BRASIL, 1981b), na forma de duplicata. Este método baseia-se na extração das bases voláteis através da homogeneização de 50 gramas de amostra em 50mL de ácido tricloroacético a 10% por um minuto, em um homogeneizador “Warning Blender”. Seguida da obtenção do extrato a partir da filtração a vácuo do homogeneizado e seu posterior acondicionamento no compartimento externo da placa de microdifusão. A liberação do nitrogênio volátil presente na amostra foi feita através da adição de uma solução de carbonato de potássio. O nitrogênio liberado se difundiu em uma solução de 2 mL de ácido bórico, presente no compartimento central da placa, para posteriormente ser titulado com ácido clorídrico 0,1N, passando de uma coloração esverdeada para uma coloração azulada após a titulação (Figura 13).

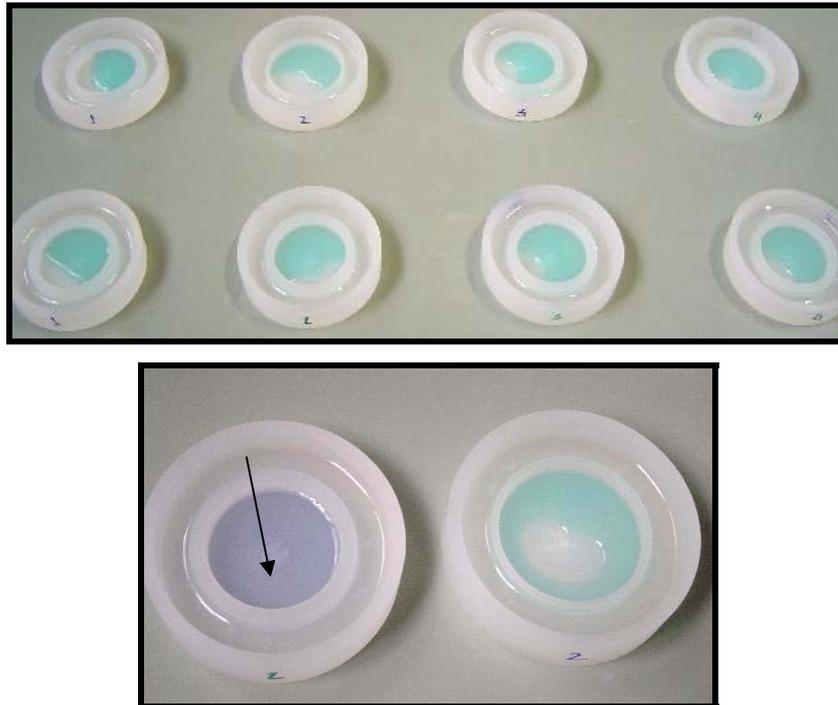


Figura 13 – Esquema de quantificação de BVT através do método de Microdifusão de Conway, com ênfase na viragem do indicador após a titulação (seta).

3.3.5 Análise sensorial

A análise sensorial consistiu na avaliação da cor, odor e aspecto, nos diversos dias de estocagem. Esta foi realizada no momento da abertura da embalagem onde os parâmetros foram avaliados a partir de uma análise descritiva simples.

3.3.6 Análise estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente através de uma análise descritiva simples, onde foi realizado um estudo comparativo com utilização de tabelas e figuras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos e discutidos os resultados obtidos nas análises bacteriológicas, físico-químicas, sensorial e histológica, que podem ser visualizados nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Os resultados da contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e contagem de bactérias da família *Enterobacteriaceae* serão descritos e discutidos a seguir, e podem ser visualizados nas Tabelas 1 e 2 e estão graficamente representados nas Figuras 14 e 15.

4.1.1 Contagem total de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas

Na representação gráfica da curva de crescimento bacteriano (Figura 14), nota-se com clareza um acelerado e intenso crescimento microbiano nas amostras embaladas em aerobiose, onde estas apresentaram valores acima de Log 6 unidades formadoras de colônias (UFC)/g ainda no 1° dia de estocagem, e acima de Log 7 UFC/g no 7° dia de estocagem. Tal crescimento é reflexo da inadequação do ar como forma de preservação de alimentos, conforme constatado por Poli et al. (2006) que, ao estudarem as alterações sensoriais, físicas, químicas e microbiológicas em Robalo (*Dicentrarchus labrax*) embalado em atmosfera modificada e em ar, encontraram altos indícios de desenvolvimento bacteriano nos primeiros dias de estocagem em aerobiose, alcançando valores acima de Log 6 UFC/g no 5° dia de estocagem em ar e no 8° em embalagem em atmosfera

modificada (EAM). No entanto discordam dos resultados obtidos por Taliadourou et al. (2003) que, em sua pesquisa com robalo mediterrâneo (*Ducentrarchus lubrax*) inteiro e armazenado em gelo, obtiveram contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas acima do limite máximo de aceitabilidade (Log 7 UFC/g) somente no 15º dia de estocagem. Esta discordância tem sua provável causa nos diferentes locais de captura, onde a microbiota do pescado que habita o mar Mediterrâneo é composta, em qualidade e quantidade, por microrganismos distintos dos que habitam o oceano Atlântico.

Assim como no ar, as amostras embaladas a vácuo também demonstraram altos índices de crescimento bacteriano, obtendo resultados superiores ao das embaladas em atmosfera modificada ainda no primeiro dia de estocagem. No entanto, somente ultrapassaram o limite de Log 6 UFC/g no 9º dia. Esse resultado comprova a capacidade do vácuo em retardar o desenvolvimento bacteriano. Contudo esta forma de preservação não foi considerada a mais eficiente, pois as amostras apresentaram altos índices de contagem bacteriana ao final de 23 dias, alcançando um total de Log 7,59 UFC/g. Tais resultados foram similares aos obtidos por Soccol et al. (2005) que compararam o efeito da embalagem em atmosfera modificada e a vácuo na conservação de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*), e concluíram que o vácuo obteve melhor desempenho em relação ao ar, no entanto foi inferior, se comparado às atmosferas enriquecidas com dióxido de carbono (CO₂).

As demais atmosferas obtiveram resultados semelhantes, oscilando pouco entre elas. Entretanto a amostra embalada em 100% CO₂ só alcançou valores acima de Log 5 UFC/g a partir do 5º dia de estocagem, enquanto as demais apresentaram tais resultados ainda no 3º dia, o que demonstra uma maior eficiência desta atmosfera em retardar o crescimento bacteriano. Porém, ao final, todas as amostras obtiveram valores similares, com destaque para a embalada em 40/60% CO₂/N₂, que obteve valor abaixo de Log 7 UFC/g. Concordando com os resultados obtidos por Ordoñez et al. (2000), que estudaram as mudanças microbiológicas e físico-químicas de files de merluza (*Merluccius merluccious*) estocados em atmosferas enriquecidas com dióxido de carbono, e concluíram que a atmosfera de 40/60% CO₂/N₂ é recomendada para a embalagem de merluza sobre refrigeração, o que pode resultar em um aumento na vida comercial de até 3 vezes, tanto sob o ponto de vista microbiológico, quanto sensorial. Concordando ainda com Parkin et al.

(1981) que observaram o efeito inibidor do CO₂ através da contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos em filés de pescado estocados em EAM e aerobiose, e concluíram que os últimos sofreram rápido processo de deterioração se comparados aos mantidos sob 80% CO₂.

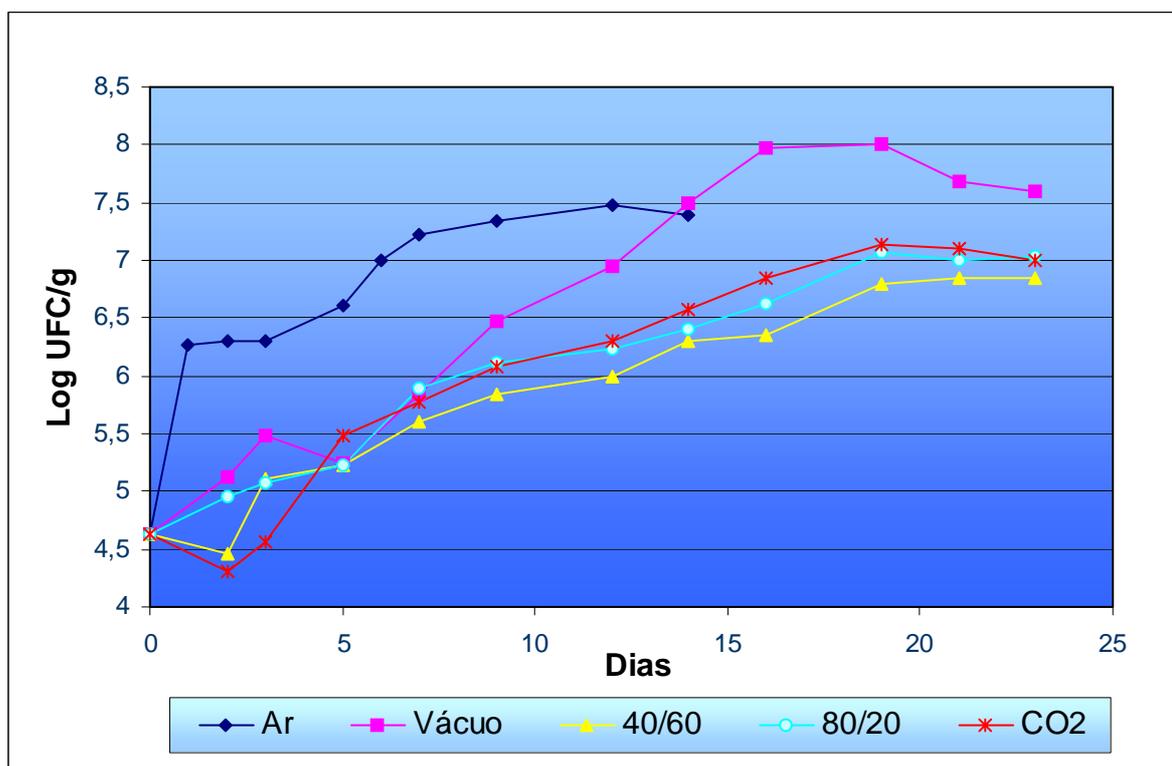


Figura 14 – Representação gráfica dos valores médios dos logaritmos das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias.

De maneira geral as amostras embaladas em atmosferas enriquecidas com CO₂ demonstraram melhor desempenho por apresentarem valores de crescimento bacteriano muito abaixo dos obtidos pelas amostras embaladas em aerobiose e a vácuo, promovendo uma maior ampliação do prazo de vida comercial da espécie de pescado estudada. Concordando com Lopes et al. (2004) e Özogul et al. (2004) que analisaram o efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas mantidas sob refrigeração, e concluíram que sob o ponto de vista microbiológico, as embalagens enriquecidas com CO₂ comprovam ser o melhor método de conservação. Demonstrando assim, que a sardinha e o pargo

apresentam comportamento semelhante quando embalados em atmosfera modificada, isto em decorrência da provável semelhança entre suas composições biológicas.

4.1.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Analisando a Figura 15 podemos observar que a contaminação inicial das amostras foi representativamente mais baixa que a obtida na contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas. Este fato pode ser explicado em virtude da característica das amostras, constituídas por peixes capturados em alto mar, onde a presença deste grupo bacteriano é altamente escassa (OGAWA e MAIA, 1999).

Verificamos ainda que as amostras embaladas em aerobiose destacaram-se das demais, obtendo valores mais elevados (Log 5,06 UFC/g) a partir do 5° dia de estocagem. Esses valores mantiveram-se elevados até o último dia de análise, culminando num índice máximo de Log 6,11 UFC/g no 14° dia.

As demais amostras apresentaram valores semelhantes até o 7° dia de estocagem quando, assim como em aerobiose, o vácuo demonstrou resultados mais elevados, no entanto, manteve-se abaixo dos valores obtidos pelas amostras em aerobiose. Os fragmentos embalados em atmosferas enriquecidas com CO₂ obtiveram valores finais similares, contudo, observamos que as amostras embaladas em 80/20% CO₂/N₂ apresentaram valores acima de Log 4 UFC/g somente a partir do 12° dia de estocagem, enquanto as demais amostras obtiveram valores semelhantes ainda no 9° dia, seguindo assim até o final do experimento, onde obteve um valor de Log 4,00 UFC/g e as demais de Log 4,06 UFC/g (40/60% CO₂/N₂) e Log 4,13 UFC/g (100% CO₂). Esses resultados concordam com os obtidos na análise de pH e na análise de bases voláteis totais (BVT), onde as amostras embaladas em atmosfera com 80/20% CO₂/N₂ apresentaram valores mais baixos de pH do que as demais atmosferas enriquecidas com CO₂, tanto no 9° dia quanto no 23° dia de estocagem (6,0 e 5,98), assim como valores de BVT também inferiores às demais atmosferas com CO₂ não diferindo significativamente entre elas.

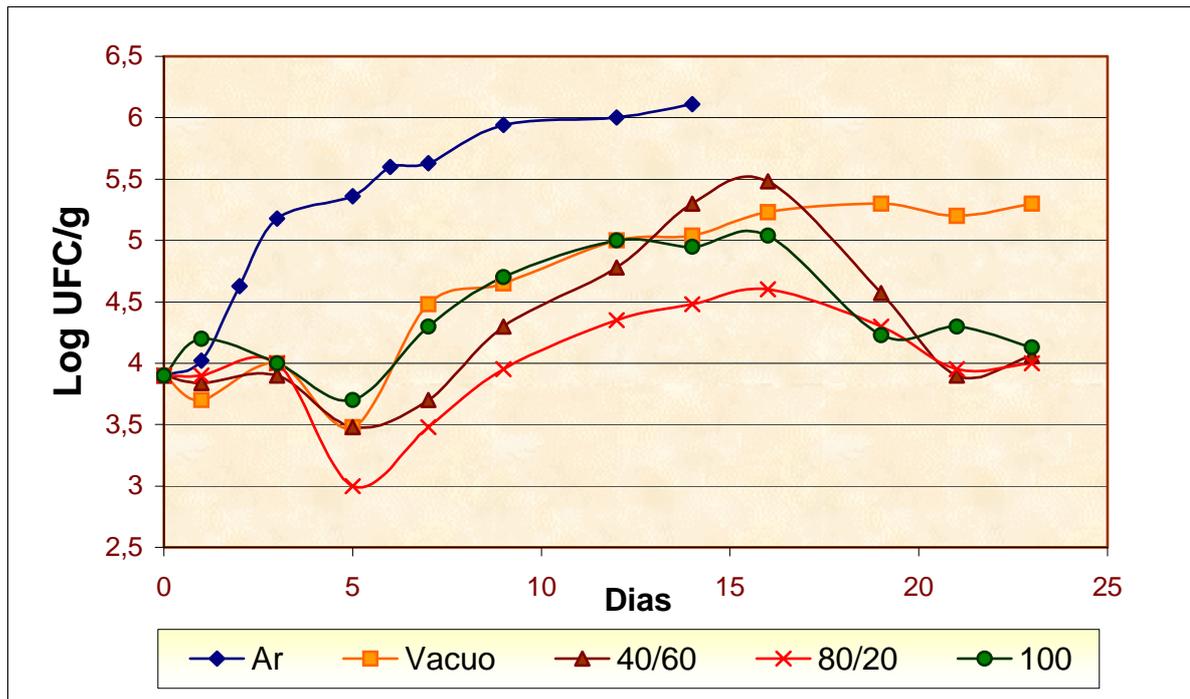


Figura 15 – Representação gráfica dos valores médios dos logaritmos das contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias.

A eficiência do CO₂ na inibição da contagem de enterobactérias foi observada por Church (1994), o qual afirmou haver forte inibição de *Enterobacteriaceae* quando submetidas à ação do CO₂. Discordando dos resultados obtidos por López-Gálvez et al. (1995) que verificaram grande desenvolvimento destes microrganismos em carne de atum (*Thunnus alalunga*), chegando a Log 7 UFC/g logo no 9º dia de estocagem. Este fato pode ser explicado pelo alto grau de manipulação desses peixes durante a pesca, ou ainda ser decorrente da variação da microbiota em função do local de captura.

4.2 ANALISES FÍSICO-QUÍMICAS

A seguir serão descritos e discutidos os resultados das análises de pH e bases voláteis totais (BVT), que estão representados nas Tabelas 3 e 4, e estão graficamente representados nas Figura 16 e 17.

4.2.1 pH

Observando a Tabela 3 verificamos que o valor inicial do pH de 6,11 está de acordo com a faixa mínima de pH “*post mortem*” de 5,4 a 7,2, citada por alguns autores, e que pode variar de acordo com a espécie de pescado (GRIKORAKIS et al., 2003). Corroborando com resultados obtidos por López-Gálvez et al. (1995) e Souza (2004), que obtiveram valores de pH inicial de 5,8 e 5,6, respectivamente, ao estudarem a conservação de atuns (*T. alalunga* e *T. albacares*). Estes altos valores iniciais de pH podem ser explicados em função da baixa reserva de glicogênio muscular do pescado, e conseqüente pouca produção post mortem de ácido láctico, que desta maneira contribui para a manutenção de um elevado pH final.

Analisando a Figura 16 observamos que todas as atmosferas obtiveram valores semelhantes até o terceiro dia de estocagem onde, a partir de então, o ar apresentou um rápido aumento atingindo um máximo de 6,89 no 14º dia de estocagem, enquanto as amostras embaladas em atmosferas enriquecidas com CO₂ oscilavam entre 6,0 (80/20% CO₂/N₂) e 6,03 (100% CO₂), distantes do limite de aceitabilidade de 6,4 determinado pelo LANARA (BRASIL, 1981b).

Comportamento semelhante ao descrito por López-Gálvez et al. (1995) e Pastoriza et al. (1998) que observaram um rápido incremento no pH de amostras de pescado em aerobiose, decorrentes da degradação do pescado, onde a atividade enzimática e a ação das bactérias modificam a concentração de íons de hidrogênio livre através da decomposição de aminoácidos e da uréia (OGAWA e MAIA, 1999; LEITÃO et al., 1984).

Os baixos valores apresentados pelas amostras em EAM estão de acordo com a proposição de que os microrganismos Gram-negativos, oxidase positivos, são inibidos pelo CO₂, diminuindo a produção de BVT e conseqüentemente a elevação do pH, conforme observado por Dalgaard et al. (1993) que verificaram um maior

incremento de pH nas amostras de estocadas em atmosfera com baixa concentração de CO₂. Dados similares aos obtidos por Ordóñez et al. (2000) que observaram um incremento de 0,7 unidades de pH para as amostras de merluza (*Merluccius merluccius*) embaladas em atmosfera contendo 20% de CO₂ e 0,4 para as que continham 40% de CO₂. No entanto, discordam dos resultados obtidos por Lalitha et al. (2005) que ao estudarem as alterações microbiológicas e bioquímicas em crómida verde (*Etroplus suratensis* Bloch) embalados em EAM, determinaram que no houve variação de pH entre as amostras em EAM e em aerobiose.

A pouca oscilação e estabilização do pH observadas por Lalitha et al. (2005) pode ser explicada pela difusão do CO₂ no tecido do pescado, gerando a formação de ácido carbônico que, apesar da produção de bases voláteis, funciona como uma barreira contra o aumento do pH (DEVEBERE e BOSKOU, 1996; LOPES et al., 2004).

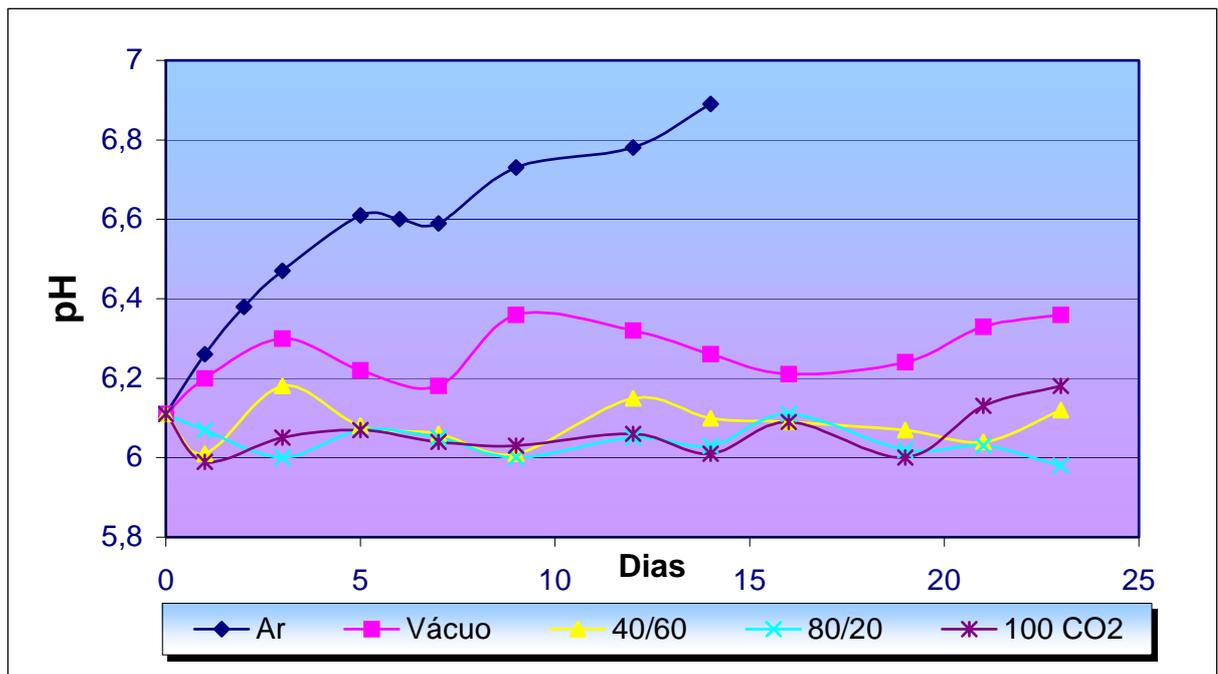


Figura 16 – Representação gráfica dos valores médios de pH em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias.

4.2.2 Bases voláteis totais

Ao analisarmos a Tabela 4 verificamos que na carne de pescado embalada em ar atmosférico os teores de BVT foram significativamente mais elevados do que nas demais atmosferas, chegando a atingir um total de 102,01 mg N/100g no 14º dia de estocagem, e atingindo o limite máximo permitido pelo LANARA (BRASIL, 1981b) de 30 mg N/100g no 3º dia (34 mg N/100g). Este resultado reforça o obtido no pH, onde a partir do 3º dia a amostra em ar atmosférico atingiu o limite máximo de aceitabilidade. Entretanto, discorda dos resultados obtidos por Taliadourou et al. (2003) que, ao analisarem os teores de bases voláteis totais na musculatura do robalo mediterrâneo (*Ducentrarchus lubrax*) inteiro armazenado em gelo, obtiveram valores dentro do limite aceitável pela legislação internacional de 30,0 mg N/100 g, no 13º dia de estocagem. Assim como dos resultados do trabalho de Grikorakis et al. (2003) que, estudando a preservação da dourada em aerobiose, encontraram, após 15 dias de estocagem em gelo, valores para BVT de 25 mg N/100 g. Provavelmente decorrente da diferença na microbiota e constituição biológica destas espécies de peixes e o pargo.

A grande elevação dos valores de BVT observada na estocagem em aerobiose pode ser explicada pela ação bacteriana na conversão do óxido de trimetilamina (OTMA), abundante em grande parte do pescado de origem marinha, em trimetilamina (TMA), um dos principais substratos para a produção de bases voláteis tendo, portanto, uma correlação direta com o valor do BVT.

A embalagem a vácuo apresentou valores de BVT um pouco mais elevados que a embalagem enriquecida com CO₂, chegando a um limite superior a 30 mg N/100g (47,08 mg N/100g) no 12º dia de estocagem. Este resultado é um reflexo do aumento na degradação protéica e conseqüente incremento na produção de bases voláteis, e também pode ser comprovado pela análise histológica, onde a embalagem a vácuo apresentou um discreto início de degradação e desestruturação miofibrilar no 15º dia de estocagem.

Observando a Figura 17 verificamos que as demais atmosferas não diferiram significativamente até o 19º dia, onde a atmosfera 40/60% CO₂/N₂ alcançou o limite estabelecido pela legislação, enquanto a atmosfera 100% CO₂ só alcançou este limite no 21º dia de estocagem e a atmosfera 80/20% CO₂/N₂ não atingiu o limite máximo de aceitabilidade até o final do experimento (23º dia de estocagem).

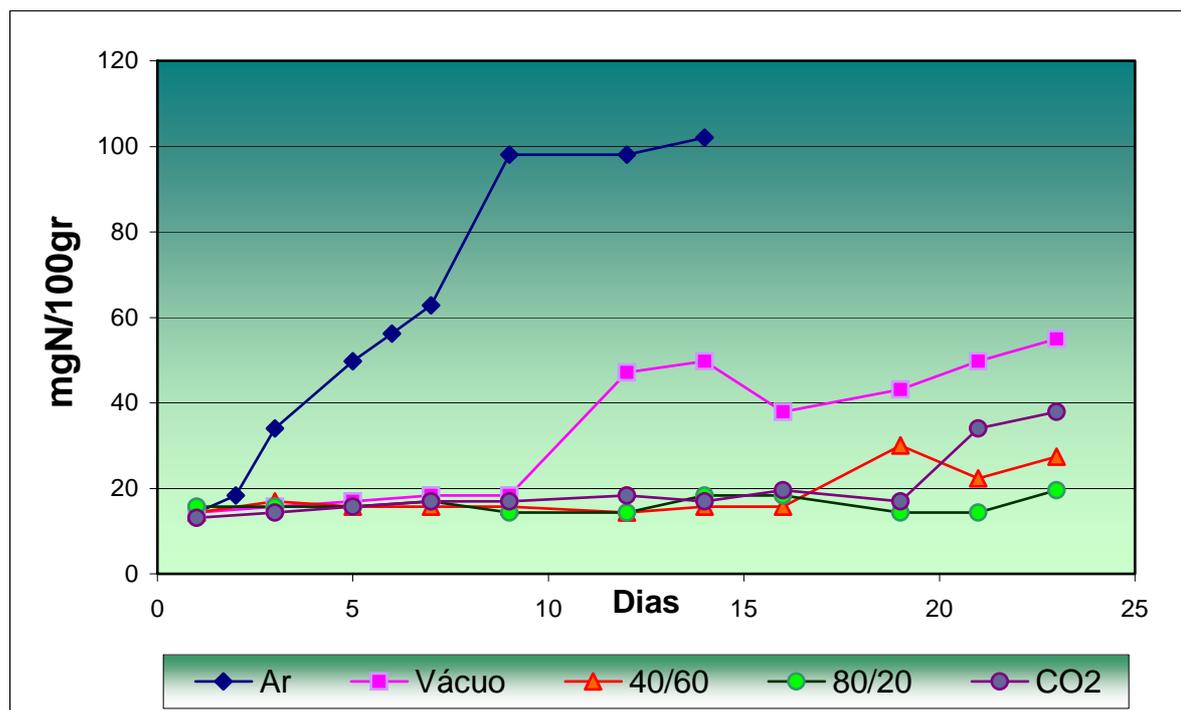


Figura 17 – Representação gráfica dos valores médios de bases voláteis totais, expressos em mg N/100gr, de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração ($2 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 23 dias.

4.3 ANALISE SENSORIAL

A análise sensorial baseou-se nos parâmetros cor, odor e aspecto, através de uma análise descritiva para determinar a melhor atmosfera para embalagem de peixes da espécie *Pagrus pagrus*.

Inicialmente a carne de pargo apresentava coloração branca, translúcida, com aspecto firme e elástico e odor característico da espécie. Conforme observado por Huss (1995) que descreveu a carne de pescado fresco como firme, elástica, de coloração translúcida, uniforme e brilhante, e odor característico.

Após cinco dias de estocagem, as carnes embaladas em aerobiose e vácuo começam a apresentar moderados sinais de deterioração, como odor a ranço, coloração amarelada e consistência ligeiramente flácida, enquanto as amostras embaladas nas demais atmosferas apresentavam pouco ou nenhum sinal de deterioração. Tais resultados concordam com os obtidos nas análises de BVT e pH onde, no 5º dia de estocagem, em ambas as análises, foram ultrapassados os

limites máximos de aceitabilidade pela legislação vigente, indicando os primeiros sinais de deterioração.

No 7º dia de estocagem as amostras em aerobiose já apresentavam fortes indícios de deterioração, culminando com um aroma sulfuroso e amoniacal, coloração amarronzada e textura flácida e pegajosa. Resultado que discorda do obtido por Borges (2005) que encontrou características sensoriais aceitáveis até o 15º dia de estocagem de corvina (*Micropogonias furnieri*) eviscerada. Assim como discordam dos obtidos por Lalitha et al. (2005) que verificaram sinais de degradação apenas no 15º dia de estocagem das amostras embaladas em aerobiose. Provavelmente em função da diferente constituição biológica e microbiota destes peixes em relação ao pargo.

A atmosfera a vácuo só apresentou tais sinais no 14º dia de estocagem. Nesta mesma época as amostras embaladas em atmosfera enriquecidas com CO₂ começaram a apresentar os primeiros sinais de deterioração, como odores estranhos e textura ligeiramente flácida.

Passados 19 dias de estocagem estas amostras começaram a apresentar fortes indícios de deterioração, como odor a ranço, coloração amarronzada e aspecto flácido e pegajoso. Assim como na análise sensorial, no 19º dia de estocagem as amostras embaladas em 40/60% CO₂/N₂ apresentaram índices de BVT acima do limite estabelecido por lei, caracterizando um processo de deterioração.

Lannelongue et al. (1982) observaram a formação de pigmentos esverdeados em carne de pescado (*Ziphius gladius*) embalada em atmosfera contendo CO₂ após 11 dias de estocagem. Tal esverdeamento não foi observado neste experimento, contudo verificou-se uma clara alteração de tonalidade muscular, passando do branco ao amarelo e posteriormente amarronzado.

Na Tabela 5 estão descritos os graus de degradação muscular medidos sensorialmente, em função do tempo de estocagem e atmosfera utilizada. Consideramos como “Característico” os fragmentos que se mostraram firmes, elásticos, de coloração translúcida, uniforme e brilhante, e odor característico; “Discreto” os que apresentaram odores estranhos e textura ligeiramente flácida; “Moderado” àqueles com odor a ranço, coloração amarelada e consistência ligeiramente flácida; e “Intenso” os que apresentaram aroma sulfuroso e amoniacal, coloração amarronzada e textura flácida e pegajosa.

Tabela 5 – Avaliação sensorial do estado de degradação de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*) embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), armazenadas sob refrigeração ($2 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 22 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	AR (100%)	VÁCUO	40/60% CO ₂ /N ₂	80/20% CO ₂ /N ₂	100% CO ₂
0	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
5	Moderado	Moderado	Característico	Característico	Característico
7	Intenso	Moderado	Característico	Característico	Característico
14	Intenso	Intenso	Discreto	Discreto	Discreto
19	Intenso	Intenso	Intenso	Intenso	Intenso

Obs.: Característico – firmes, elásticos, de coloração translúcida, uniforme e brilhante, e odor característico.

Discreto - odores estranhos e textura ligeiramente flácida.

Moderado - odor a ranço, coloração amarelada e consistência ligeiramente flácida.

Intenso - aroma sulfuroso e amoniacal, coloração amarronzada e textura flácida e pegajosa.

As atmosferas enriquecidas com CO₂ proporcionaram melhores resultados, posto que, após 12 dias de armazenagem, as amostras apresentaram um estado aceitável para o consumo. O efeito das três atmosferas enriquecidas em CO₂ nas características sensoriais foi semelhante, exceto no parâmetro textura, pois os fragmentos armazenados em 80/20% CO₂/N₂ e 100% CO₂ apresentaram aparente flacidez, após 12 dias, e nas amostras mantidas em 40/60% CO₂/N₂ tal fato só foi observado após 14 dias de estocagem. Essa flacidez pode ser explicada pela alta concentração de CO₂ nas primeiras atmosferas, o que pode provocar uma diminuição da capacidade de retenção de água das proteínas miofibrilares, ocasionando um gotejamento (“drip”) intenso e uma perda de turgidez das fibras. Este desprendimento de líquido extracelular também foi observado nos cortes histológicos. Formação de odor ácido, alteração de textura e perda de líquido “drip”, também foram observados por Stammen et al. (1990). Concordando com os resultados obtidos por Albanese et al. (2005) que estudaram as alterações químicas e microbiológicas apresentadas por *Sepia officinalis* em EAM e verificaram o aparecimento do “drip” a partir do 5º dia de estocagem, contabilizando uma perda final de 2,5% do peso total do pescado.

4.4 ANALISE HISTOLÓGICA

Os resultados da análise histológica serão apresentados de forma descritiva, e para melhor entendimento far-se-á uso de tabela e figuras.

Na Tabela 6 estão descritos os graus de intensidade de degradação muscular em função do tempo de estocagem e atmosfera utilizada. Consideramos como “Bom” os casos que apresentaram preservação da morfologia celular e ausência bacteriana; “Discreto” os que apresentaram poucos focos de colônia bacteriana, com pouca ou nenhuma dissolução de segmentos miofibrilares, e pouca ou nenhuma opacidade de gorduras; “Moderado” os casos que apresentaram moderada atividade bacteriana, dissolução protéica e opacidade de adipócitos; e “Intenso” as lâminas que apresentaram intensa atividade bacteriana, intensa dissolução protéica das fibras e opacidade de adipócitos.

Tabela 6 – Avaliação histológica do estado de degradação de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*) embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 22 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	AR (100%)	VÁCUO	40/60% CO ₂ /N ₂	80/20% CO ₂ /N ₂	100% CO ₂
0	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom
5	Moderado	Discreto	Discreto	Discreto	Bom
9	Intenso	Discreto	Discreto	Discreto	Discreto
15	Intenso	Intenso	Discreto	Discreto	Bom
22	Intenso	Intenso	Moderado	Discreto	Moderado

Obs.: Bom - preservação da morfologia celular e ausência de bactérias.

Discreto - poucos focos de colônia bacteriana, com pouca ou nenhuma dissolução de miofibrilas.

Moderado - moderada atividade bacteriana, dissolução protéica e opacidade de adipócitos.

Intenso - intensa atividade bacteriana, intensa dissolução protéica das fibras e opacidade de adipócitos.

Analisando a Tabela 6 observamos que no 5° dia de estocagem a amostra embalada em ar já apresentava sinais de degradação, sendo classificada como “Moderado”, enquanto as amostras embaladas nas demais atmosferas apenas apresentaram sinais discretos de degradação e a amostra embalada em 100% CO₂ ainda demonstrava um bom estado de conservação. As amostras em aerobiose seguiram obtendo o pior desempenho, apresentando sinais intensos de degradação

ainda no 9º dia de estocagem, enquanto que os fragmentos embalados a vácuo só demonstraram tais sinais no 15º dia, e os sob EAM sequer alcançaram tal grau de degradação, atingindo um máximo de degradação moderada (40/60% CO₂/N₂ e 100% CO₂). Resultados semelhantes aos obtidos com a análise bacteriológica, que também comprovam a eficiência do CO₂ na conservação desta espécie de pescado, e a inadequação do ar como meio de preservação de alimentos. Estas observações podem ser facilmente comprovadas ao analisarmos as Figuras 18, 19 e 20, onde a Figura 18 representa um quadro de bom estado de conservação do tecido muscular, onde se observa morfologia celular preservada e ausência de colônias bacterianas. Na Figura 19 observamos o início da fragmentação miofibrilar e a presença de células bacterianas, caracterizando um quadro de discreta degradação. Na Figura 20 podemos verificar um acentuado quadro de proliferação bacteriana e intensa fragmentação miofibrilar, culminando com a perda da morfologia da fibra. Tal destruição tecidual é causada por enzimas proteolíticas, decorrentes da proliferação bacteriana nos tecidos, ocasionando perda de detalhes celulares e tinturiais, tornando o citoplasma granuloso e hialino, e ocorrendo perda dos limites celulares e afinidade pelos corantes, conforme descrito por Vasconcelos (1987).

Estes dados reforçam a tendência de eleger a atmosfera 80/20% CO₂/N₂ como a ideal para esta espécie de pescado, tendo em vista que concordam com os resultados das demais análises, onde os menores valores de BVT e pH, e os menores índices de contagem de enterobactérias foram obtidos por amostras desta atmosfera.

Outro aspecto relevante observado foi a presença de um material protéico acelular e granular, de aspecto acidófilo e eosinófilo, presente nos últimos dias de estocagem das frações musculares embaladas em altas concentrações de CO₂ (80/20% CO₂/N₂ e 100%CO₂). Esse material pode estar relacionado à presença de “drip”, observado durante a análise sensorial, sendo uma representação histológica deste (Figura 21). Tal substância é originária da diminuição da capacidade de retenção de água das proteínas musculares por alcalinização do meio, originária do crescimento bacteriano, levando o pH próximo ao ponto isoelétrico das proteínas. Além disso, em algumas laminas, pôde ser notada uma opacidade de adipócitos, caracterizando um possível processo de alteração gordurosa.

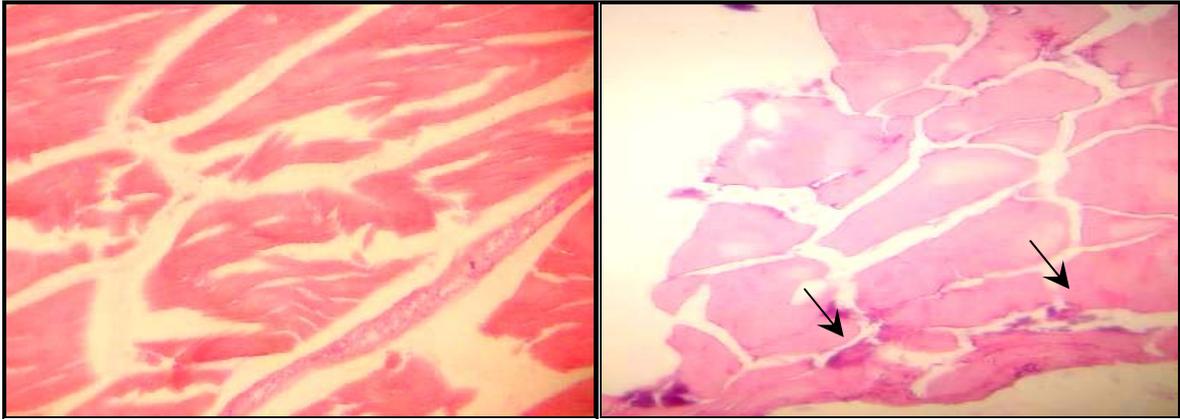


Figura 18 – Corte histológico de tecido muscular íntegro de Pargo (*Pagrus pagrus*). Observa-se morfologia celular preservada e ausência de colônias bacterianas. (10X) (H.E).

Figura 19 – Corte histológico de tecido muscular moderadamente degradado de Pargo (*Pagrus pagrus*). Observa-se perda da morfologia celular, com dissolução protéica da fibra, e presença de desenvolvimento bacteriano (seta). (10X) (H.E)

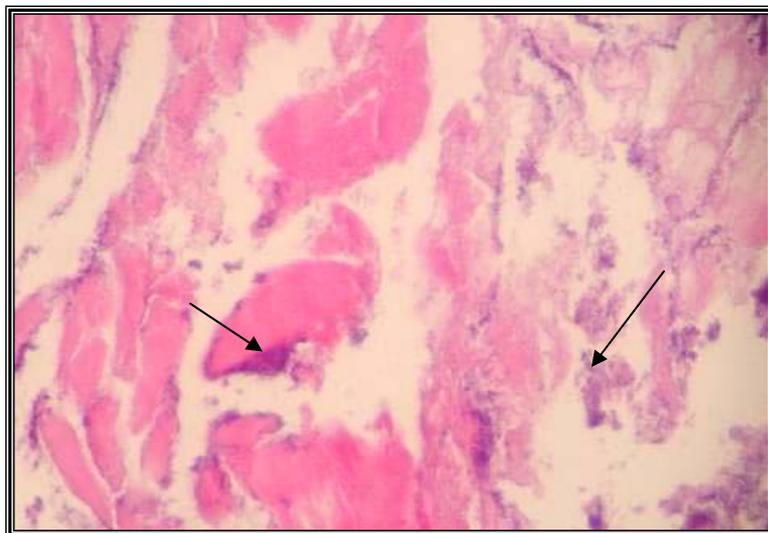


Figura 20 – Corte histológico de tecido muscular de Pargo (*Pagrus pagrus*) intensamente degradado, apresentando focos de colônias bacterianas (seta), que ocasionam dissolução de segmentos fibrilares, representada por perda da atividade tintorial, apresentando aspecto acidófilo e granular(20X) (H.E).

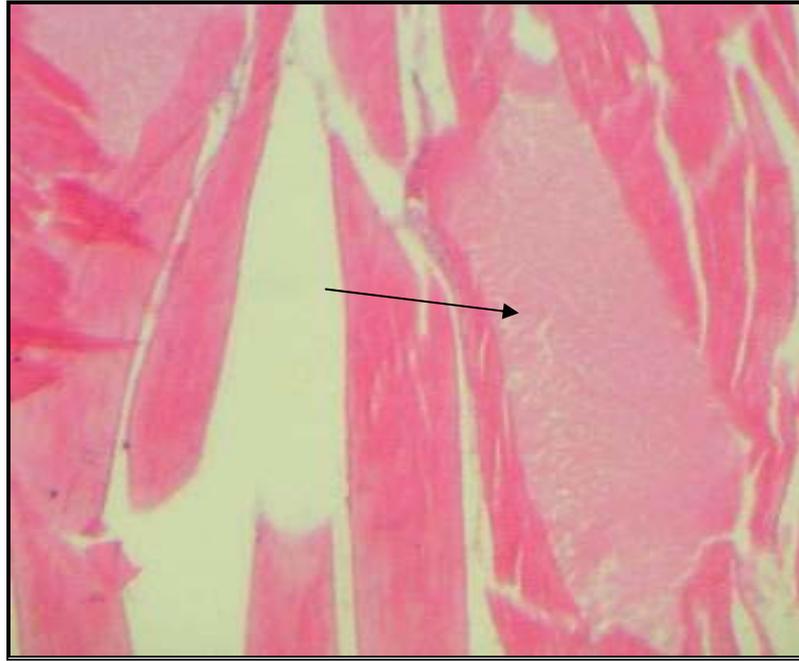


Figura 21 – Corte histológico de tecido muscular de Pargo (*Pagrus pagrus*) apresentando presença de material protéico acelular e granular, de aspecto acidófilo e eosinofílico (40X) (H.E)

Apesar da intensa busca na literatura por artigos que tratem da caracterização histológica do pescado embalado em atmosfera modificada, nenhum trabalho foi encontrado. Aparentemente, até o presente momento, não houve estudo realizado nesta área.

5 CONCLUSOES

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

- As amostras de pargo (*Pagrus pagrus*) embaladas em atmosfera modificada apresentaram maior prazo de vida comercial quando comparadas às em anaerobiose, sendo eficazes na manutenção dos parâmetros propostos pela legislação vigente.
- A embalagem a vácuo demonstrou bom desempenho em prolongar a vida útil do pargo, embora inferior as de atmosferas enriquecidas com CO₂, não sendo a melhor indicação como método de conservação deste tipo de pescado.
- Apesar de prolongarem o prazo de vida comercial do pargo, sensorialmente as atmosferas enriquecidas com CO₂ induziram a uma significativa perda de líquidos, acarretando uma grave alteração na textura.
- A análise histológica se mostrou um excelente parâmetro de avaliação da vida útil de produtos cárneos embalados em atmosfera modificada.
- Dentre as diversas atmosferas, a 80/20% CO₂/N₂ foi a que obteve melhor desempenho na manutenção dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, se destacando das demais, sendo esta a mais indicada na preservação de pescado da espécie *Pagrus pagrus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANESE, D.; CINQUANTA, L.; LANORTE, M.T.; DI MATTEO, M. Squid (*Sepia officinalis*) stored in active packaging: some chemical and microbiological changes. *Journal of Food Science*, v.17, n.3, p.325-332, 2005.

ALMEIDA – FILHO, Edvaldo Sampaio. Comportamento de microbiota residente, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, e *Listeria monocytogenes* inoculadas em carne de atum (*Thunnus albacares*), estocada sob refrigeração (0°C) em diferentes atmosferas modificadas. Niterói, 2004. 142 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

ASHIE, I.N.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev Food Sci Nutr*. v.36, n.1-2, p.87-121, 1996.

BECHTEL, P. T. *Muscle as Food*. Orlando: Academic Press, 1986, 503p.

BIRCH, G.G.; BRENNAN, J.G.; PARKER, K.J. *Sensory properties of foods*. Londres: Applied Science publishers Ltda, 1977. 326p.

BORGES, A. Qualidade da corvina (*Micropogonias furnieri*) eviscerada e inteira estocadas em diferentes períodos à temperatura de 0°C. Niterói, 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. PORTARIA Nº 185, DE 13 DE MAIO DE 1997. APROVA O REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE PEIXE FRESCO (INTEIRO E EVISCERADO). BRASÍLIA – DF, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I Métodos Microbiológicos. Brasília, DF, 1981a, 42p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II Métodos Físico Químicos. Brasília, DF, 1981b, 123p.

BRESSAN, M.C.; PEREZ, J. R. O. *Pescado: um produto de fácil deterioração*. In:_____. Tecnologia de carnes e pescado. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 240p. cap.8, p. 145-154.

BROWN, W. D. et al. Modified atmosphere storage of rockfish (*Sebastes miniatus*) and silver salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Journal of Food Science*, v.45, p.93-96, 1980.

CARDONHA, A.M.S.; CASIMIRO, A.R.S.; VIEIRA, R.H.S.F. Identificação de bactérias psicotróficas em caudas de lagosta, durante processo industrial com tripolifosfato de sódio. *Revista Higiene Alimentar*, v.8, n.31, p.29-34, 1994.

CARVALHO – FILHO, A. *Peixes; costa brasileira*. São Paulo: Marca D'água LTDA, 1992. 304p.

CHURCH, I.; PARSONS, A. Modified atmosphere packaging technology: a Review. *Journal of Science Food and Agriculture*, v. 67, p. 143-152, 1995.

CHURCH, N. Developments in modified-atmosphere packing and related technologies. *Trends in Food Science and Technology*, v.5, p.345-352, 1994.

CONSTANTINIDO, G. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. *Revista Higiene Alimentar*, v.8, n.32, p.5-6, 1994.

CONTE-JUNIOR, C. A. et al. Efeito do dióxido de carbono na conservação e aumento da vida útil da carne de rã (*Rana catesbeiana*). *Revista Higiene Alimentar*, v. 17, p. 40-41, 2003.

COYNE, F. P. The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. Part I. *Journal of the Society of Chemical Industry*. v. 52, p. 119-121, 1932.

DALGAARD, P.; GRAM, L.; HUSS, H. H. Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, v. 19, n. 4, p. 283-294, 1993.

DEVEBERE, J; BOSKOU, G. Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA- producing microflora of cod fillets. *Internacional Journal of Food Microbiology*, v. 31, n. 1-3, p. 221-229, 1996.

EIROA, M. N. U. Aspectos microbiológicos relacionados à conservação e ao consumo de pescado. *Boletim da Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.54 p. 9-37, 1980.

FARBER, J. M. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology – a review. *Journal of Food Protection*. v. 54, n.1, p. 58-70, 1991.

FIPERJ. *Produção pesqueira de 2002*. Boletim Técnico, 2004. Disponível em: <<https://www.fiperj.rj.gov.br>>. Acesso em: 23 dez. 2005.

FIPERJ. *Tabela demonstrativa da posição do Brasil em relação a outros países*. Fishstat Plus, FAO 2001. Disponível em: <<https://www.fiperj.rj.gov.br>>. Acesso em: 23 dez. 2005.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. *Food microbiology*. New York, USA: McGraw-hill Book Company, 1988. 681p.

GENIGEORGIS, C. A. Microbial and safety implications of the use of modified atmosphere to extend the storage life of fresh meat and fish. *International Journal of Food Microbiology*, v.1, n.5, p.237-251, 1985.

GERMANO, P.M.L.; OLIVEIRA, J.C.F.; GERMANO, M.L.S. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. *Revista Higiene Alimentar*, v.7, n.53, 1998.

GERMANO, P.M.L.; OLIVEIRA, J.C.F.; GERMANO, M.L.S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Revista Higiene Alimentar*, v.7, n.28, p.40-45, 1993.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, v.33, n.1, p.121-137, 1996.

GRIKORAKIS, K.; TAYLOR, K. D. A.; ALEXIS, M. N. Seasonal patterns os spoilage of ice-storage cultured gildhead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, v. 81, n. 2, p.263-268. 2003

HINTLIAN, C. B., HOTCHKISS, Joseph, H. The safety of modified atmosphere packaging: a review. *Food Technology*. v.7, p. 70-76, 1986.

HUSS, H.H. *Quality and quality changes in fresh fish: FAO fisheries technical paper 348*. Roma: Food and Agriculture Organization of de united natios, 1995. 193p.

IBAMA. *Estatística da pesca 2002 – Brasil grandes regiões e unidades da federação*. Tamandaré, 2004. 129p. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br>>. Acesso em 23 dez. 2005.

INFOPECA. Uruguai: *Revista Infopesca*, v. 3, p. 03-43, set/out. 1997.

JAY, J. M. *Microbiologia dos alimentos*. Ed. Guanabara Koogan, p. 308-324, 2004.

KILLEFFER, D. H. Carbon dioxide preservation of meat and fish. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.22, n.2, p.140-143, 1930.

KOLBE, H. Antiseptische eigenschaften der kohlenaure. *Journal Für Praktische Chemie*. v. 26, p. 249-255, 1882.

- LALITHA, K.V.; SONAJI, E.R.; MANJU, S.; JOSE, L.; GOPAL, T.K.S.; RAVISANKAR, C.N. Microbiological and biochemical changes in pearl spot (*Etroplus suratensis* Bloch) stored under modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. v.99, p.1222-1228, 2005.
- LANNELONGUE, M., et al. Microbial and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂ enriched atmospheres. *Journal of Food Protection*. v. 45, p. 1197-1199, 1992.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, v.58, n.1-2, p.1-37, 2000.
- LEITÃO, M.F.F. Deterioração microbiológica do pescado e sua importância em saúde pública. *Revista Higiene Alimentar*, v.3, n.314, p.134-152, 1984.
- LIMA, F.C. *Vibrios* marinhos: 1. *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Higiene Alimentar*, v.11, n.47, p.14-22, 1997.
- LIRA, G.M.; PEREIRA, W.D.; ATHAYDE, A.H.; PINTO, K.P. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió, AL. *Revista Higiene Alimentar*, v.15, n.84, p.67-74, 2001.
- LOPES, M.M. et al. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). *Revista Portuguesa da Carne*, 2004 (no prelo).
- LÓPEZ-GÁLVEZ, D.; HOZ, L.; ORDÓÑEZ, J. A. Effects of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical in refrigerated tuna (*Thunnus alalunga*) steaks. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, USA, v. 43, p. 483-490, 1995.
- MEDEIROS, S. D.. *Higiene e tecnologia de pescado. Deterioração*. P. 1-12, 2002.
- MENEZES, N.; FIGUEIREDO, J. L. *Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980. 127p.
- MORALES, A.A. *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza: Acríbia. 1994.
- MUKUNDAN, M. K.; ANTONY, P. D.; NAIR, M. R. A review on autolysis in fish. *Fisheries Research*, v.4, p. 259-269, 1986.
- NOMURA, H. *Dicionário dos Peixes do Brasil*. Brasília: Editerra, 1984. 482p.
- OGAWA, M.; MAIA, E.L. *Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia de Pescados*. v.1. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430p.
- ORDÓÑEZ, J. A. et al. Microbial and physicochemical modifications of hake (*Merluccius merluccius*) stakes stored under carbon dioxide enriched atmosphere. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 1831-1840, 2000.

ÖZOGUL, F.; POLAT, A.; ÖZOGUL, Y. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. v.85, p.49-57, 2004.

PARKIN, K. L., WELLS, M. J., BROWN, W. D. Modified atmosphere storage of rockfish fillets, *Journal of Food Science*. v. 47, p. 181-184, 1981.

PARRY, R. T. *Envasado de los alimentos en atmósfera modificada*. Madrid: A Madrid Vicente, 1993.

PASTORIZA, L. et al. Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging and microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slices of hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chemistry*. v. 61, n 1-2, p. 23-28, 1998.

PEDROSA-MENABRITO, A. REGENSTEIN, J. M. Shelf-life extension of fresh fish – a review part II – preservation of fish. *Journal of Food Quality*. v. 13, p. 209-223, 1990.

PHILLIPS, C. A. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 31, p. 1723-1728, 1996.

PLATE COUNT AGAR. Standart methods agar (TGY). Disponível em: <http://www.remel.com>. Acesso em 13 de setembro de 2006.

POLI, B.M.; MESSINI, A.; PARISI, G.; SCAPPINI, F.; VIGIANI, V.; GIORGI, G.; VICENZINI, M. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets packed under modified atmosphere/air or prepared from whole fish stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*. v.41, p.444-454, 2006.

REDDY, N. R. SCHREIBER, C.L.; BUZARD, K.S.; SKINNER, G.E.; ARMSTRONG, D.J. Shelf life of fresh tilápia fillets package in high barrier film with modified atmosphere. *Journal of Food Science*. v. 59, n. 2, p.260-264, 1994.

REDDY, N. R.; VILLANUEVA, M., KAUTTER, D. A. Shelf life of modified atmosphere package fresh tilápia fillets stored under refrigeration and temperature abuse conditions. *Journal of Food Protection*. v. 58, n. 8, p. 908-914, 1995.

ROBERTS, J.R. *Fish pathology*. Londres: Bailliere Tindal, 1978. 318p.

RUITER, A. *El pescado y los productos derivados de la pesca: composición, propiedades nutricionales y estabilidad*. Zaragoza: Acribia, 1995. 647p.

SIKORSK, Z. E. *Seafood: resources, nutritional composition, and preservation*. Florida: CRC Press, 1990. 247p.

SIVERTSVIK, M.; JEKSRUD, W. K.; ROSNES, T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fisheries products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 37, p. 1-7-127, 2002.

SIVERTSVIK, M.; ROSNES, J. T.; KLEIBERG, G. H. The effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensorial quality of atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*. v. 68, n. 4, p. 1467-1472, 2003.

SOCCOL, M.C.H.; OETTERER, M.; GALLO, C.R.; SPOTO, M.H.F.; BIATO, D.O. Effects of modified atmosphere and vacuum on the shelf life of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *Brasilian Journal of Food Technology*. v.8, n.1, p.7-15, 2005.

SORHEIM, O.; NISSEN, H. Current technology for modified atmosphere packaging of meat. Disponível em: <http://www.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/3800>. Acesso em 08 de janeiro de 2006.

SOUZA, W.G. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de lombo de atum (*Thunnus albacares*). Niterói, 2004. 76 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária. Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

STAMMEN, K.; GERDES, D.; CAPORASO, F. Modified atmosphere packaging of seafood. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.29, n.5, p.301-331, 1990.

STANSBY, M. E., GRIFFITHS, F. P. Carbon dioxide in handling fresh fish – haddock. *Industrial and Engineering Chemistry*. v. 27, p. 1452-1458, 1935.

SUZUKI, T. *Tecnología de las proteínas de pescado e Krill*. Zaragoza: Ed. Acribia, 1987, 230p.

TALIADOUROU, D.; PAPADOPOULOS, V.; DOMVRIDOU, E.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Aquaculture*, v.83, n.13, p. 1373-1379, 2003.

VALLEY, G. The effect of carbon dioxide on bacteria. *Quarterly Review of Biology*. v.3, p. 209-224, 1928.

VASCONCELOS, A.C. *Necropsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária*. 2 ed. Teresina: Ed. FUFPI, 1987. 81p.

VIOLET RED BILE GLUCOSE –VRBG. Disponível em: <http://www.remel.com>. Acesso em 13 de setembro de 2006.

WOLFE, S. K. Use of CO and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish, and produce. *Food Technology*. v. 4, p. 55-58, 1980.

ZICAN, C.A. O Ministério da Agricultura iniciou o controle sanitário através do sistema de pontos críticos: o pescado é o carro chefe desse sistema. *Revista Higiene Alimentar*, v.8, n.31, p.9-10, 1994.

APÊNDICES

Tabela 1. Valores médios dos logaritmos das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	AR (100%)	VÁCUO	40/60% CO ₂ /N ₂	80/20% CO ₂ /N ₂	100% CO ₂
0	4,63	4,63	4,63	4,63	4,63
1	6,27	-	-	-	-
2	6,30	5,13	4,46	4,95	4,30
3	6,30	5,48	5,11	5,08	4,56
5	6,60	5,25	5,23	5,23	5,48
6	7,00	-	-	-	-
7	7,23	5,84	5,60	5,90	5,78
9	7,34	6,48	5,84	6,11	6,08
12	7,48	6,95	6,00	6,23	6,30
14	7,40	7,49	6,30	6,40	6,58
16	-	7,97	6,36	6,63	6,84
19	-	8,00	6,80	7,06	7,13
21	-	7,69	6,85	7,00	7,11
23	-	7,59	6,84	7,04	7,00

Tabela 2 - Valores médios dos logaritmos das contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	AR (100%)	VÁCUO	40/60% CO ₂ /N ₂	80/20% CO ₂ /N ₂	100% CO ₂
0	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
1	4,02	3,70	3,84	3,90	4,20
2	4,63	-	-	-	-
3	5,18	4,00	3,90	4,00	4,00
5	5,36	3,48	3,48	3,00	3,70
6	5,60	-	-	-	-
7	5,63	4,48	3,70	3,48	4,30
9	5,94	4,65	4,30	3,95	4,70
12	8,00	5,00	4,78	4,35	5,00
14	6,11	5,04	5,30	4,48	4,95
16	-	5,23	5,48	4,60	5,04
19	-	5,30	4,57	4,30	4,23
21	-	5,20	3,90	3,95	4,30
23	-	5,30	4,06	4,00	4,13

Tabela 3 - Valores médios de pH em amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*), embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	AR (100%)	VÁCUO	40/60% CO ₂ /N ₂	80/20% CO ₂ /N ₂	100% CO ₂
0	6,11	6,11	6,11	6,11	6,11
1	6,26	6,20	6,01	6,07	5,99
2	6,38	-	-	-	-
3	6,47	6,30	6,18	6,00	6,05
5	6,61	6,22	6,08	6,07	6,07
6	6,60	-	-	-	-
7	6,59	6,18	6,06	6,05	6,04
9	6,73	6,36	6,01	6,00	6,03
12	6,78	6,32	6,15	6,05	6,06
14	6,89	6,26	6,10	6,03	6,01
16	-	6,21	6,09	6,11	6,09
19	-	6,24	6,07	6,02	6,00
21	-	6,33	6,04	6,03	6,13
23	-	6,36	6,12	5,98	6,18

Tabela 4 - Valores médios de bases voláteis totais, expressos em mg N/100gr, de amostras de Pargo (*Pagrus pagrus*) embaladas em aerobiose e em diferentes atmosferas modificadas (vácuo, 40/60% CO₂/N₂, 80/20% CO₂/N₂, e 100% CO₂), e armazenadas sob refrigeração (2 ± 2°C) durante 23 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	AR (100%)	VÁCUO	40/60% CO ₂ /N ₂	80/20% CO ₂ /N ₂	100% CO ₂
1	14,39	14,39	14,39	15,69	13,08
2	18,31	-	-	-	-
3	34,00	15,69	17,00	15,69	14,39
5	49,70	17,00	15,69	15,69	15,69
6	56,24	-	-	-	-
7	62,78	18,31	15,69	17,00	17,00
9	98,09	18,31	15,69	14,39	17,00
12	98,09	47,08	14,30	14,30	18,31
14	102,01	49,70	15,69	18,31	17,00
16	-	37,93	15,69	18,31	19,61
19	-	43,16	30,08	14,30	17,00
21	-	49,70	22,34	14,30	34,00
23	-	54,93	27,46	19,61	37,92