

**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**

**WAGNER GUEDES DE SOUZA**

**EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA  
MODIFICADA SOBRE A CONSERVAÇÃO DE LOMBO  
DE ATUM (Thunnus albacares)**

**UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE**

Niterói/RJ  
2004

**WAGNER GUEDES DE SOUZA**

**EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA  
SOBRE A CONSERVAÇÃO DE LOMBO DE ATUM (*Thunnus  
albacares*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado), Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO  
Co-orientador: Prof. Dr. SÉRGIO CARMONA DE SÃO CLEMENTE

Niterói  
2004

**WAGNER GUEDES DE SOUZA**

**EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA  
SOBRE A CONSERVAÇÃO DE LOMBO DE ATUM (*Thunnus  
albacares*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado), Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. SÉRGIO BORGES MANO  
Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Veterinária

---

Prof. Dr. SÉRGIO CARMONA DE SÃO CLEMENTE  
Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Veterinária

---

Prof. Ms. GERALDO ABREU DE OLIVEIRA  
Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Veterinária

---

Prof. Dr. PEDRO PAULO DE OLIVEIRA SILVA  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Tecnologia

Niterói  
2004

À minha família, pelo amor, paciência, suporte e apoio, sem os quais eu não atingiria este objetivo.

À Cyntia Galante Fernandes, pela amor e companheirismo, indispensáveis nesta caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Sergio Borges Mano meu orientador amigo, grande fonte de conhecimento, ajuda e estímulo.

À Prof<sup>a</sup>. Eliane Teixeira Mársico, mestra amiga, pela contribuição e ajuda.

Ao Médico Veterinário Leonardo Pessanha, amigo pela grande ajuda no desenrolar do experimento.

Ao Médico Veterinário Carlos A. Conte Junior, amigo pela ajuda.

Ao Prof. e amigo Francisco Carlos de Lima, pela ajuda prestada.

Ao Prof. e amigo Edivaldo Sampaio de Almeida Filho, pela ajuda prestada.

Ao Nutricionista Anderson Junger Teodoro, pela ajuda prestada.

À Médica Veterinária Márcia M. Lopes, pela ajuda prestada.

Ao amigo Jonas Masetti, pela ajuda prestada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Fluminense.

Ao CNPq pela ajuda financeira

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Graduado na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense em 2000, Wagner Guedes de Souza, brasileiro, natural do Rio de Janeiro, nascido em 1976, filho de Willardo Gomes de Souza e Maria de Fátima Guedes de Souza, efetuou estágios durante seu período acadêmico nas áreas de Genética de Organismos Aquáticos, Monitoramento de Avifauna e Educação Ambiental no IBAMA, Criação e Manejo de Rãs e Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal. Além disso, durante o período de agosto de 1997 a julho de 1998, teve a oportunidade de participar do Programa de Iniciação Científica CNPq/PROPP como bolsista, resultando no desenvolvimento do projeto de pesquisa: "Estudos Citogenéticos e Reprodutivos em Peixes da Família Pomacanthidae (*Holacanthus ciliaris*, *Pomacanthus arcuatus*, *Pomacanthus paru*)".

No desfecho de sua graduação estagiou no matadouro de rãs da Cooperativa Agropecuária dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro (COOPERRAN-RIO) em Itaboraí-RJ, e nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF, desenvolvendo trabalhos de pesquisa com insensibilização de anfíbios usando o CO<sub>2</sub> e acompanhando a mestrandia Sílvia Reis Pereira Mello na realização de seu experimento, que objetivou avaliar as características da polpa de dorso de rã obtida por separação mecânica. Nestes dois lugares desenvolveu seu período de estágio supervisionado. Este estágio serviu de base para a apresentação de seu relatório final de conclusão de curso de graduação, que ocorreu no primeiro semestre de 2000.

Após a conclusão de sua graduação atuou como responsável técnico do entreposto de pesca Surgelpesca Brasil Comércio e Exportação Ltda., executando ações relacionadas ao controle de qualidade e programa APPCC do referido estabelecimento.

No ano de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, no curso de mestrado, como bolsista do CNPq, e direcionou o seu conhecimento, com maior dedicação, para a área de Tecnologia de Pescados e Derivados, devido ao tema de sua tese: "EFEITO DA EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE A CONSERVAÇÃO DE LOMBO DE ATUM (*Thunnus albacares*)".

## Sumário

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 8**

**LISTA DE TABELAS, p. 10**

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 11**

**RESUMO, p. 12**

**ABSTRACT, p. 13**

**1 INTRODUÇÃO, p. 14**

**2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 19**

2.1 IMPORTÂNCIA DO ATUM, p. 19

2.2 MICROBIOTA EM PESCADO, p. 20

2.3 EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA, p. 21

2.4 DETERIORA DO PESCADO, p. 23

2.4.1 **Deteriora do pescado em aerobiose, p. 23**

2.4.2 **Deteriora em EAM, p. 26**

2.4.3 **Histamina, p. 33**

2.4.3.1 Formação de Histamina em aerobiose, p. 34

2.4.3.2 Formação de Histamina em EAM, p. 35

**3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 38**

3.1 MATERIAL, p. 38

3.2 MÉTODOS, p. 40

3.2.1 **Aquisição da amostra, p. 40**

3.2.2 **Transporte, p. 41**

3.2.3 **Colheita das amostras, p. 41**

3.2.4 **Identificação das amostras, p. 47**

3.2.5 **Análises, p. 47**

3.2.5.1 Análises Microbiológicas, p. 47

3.2.5.2 Análises físico-químicas, p. 47

3.2.5.3 Análise estatística, p. 48

**4 RESULTADOS, p. 49**

4.1 BASES VOLÁTEIS TOTAIS, p. 49

4.2 pH, p. 51

4.3 HISTAMINA, p. 53

4.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS,  
p. 54

## **5 DISCUSSÃO, p 58**

5.1 pH, p. 58

5.2 BASES VOLÁTEIS TOTAIS, p. 60

5.3 HISTAMINA, p. 63

5.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS,  
p. 65

## **6 CONCLUSÃO E SUGESTÕES, p. 69**

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 71**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1** Exemplar de *Thunnus albacares*, f. 15
- Fig. 2** Selos das Ilhas Virgens e Bermudas tendo como tema o *T. albacares*, f. 16
- Fig. 3** Quantidade, em Toneladas, de *Thunnus albacares* exportada pelo Brasil para os EUA nos anos de 2000 a 2004 (dados adaptados pelo autor), f. 16
- Fig. 4** Espécime utilizado no trabalho, já devidamente lavado e depositado sobre mesa previamente higienizada e coberta com papel alumínio, f. 42
- Fig. 5** Medição da temperatura muscular do pescado com auxílio de termômetro digital de incisão marca Minipa. f. 42
- Fig. 6** Atum utilizado no experimento, com o lombo superior esquerdo retirado, f. 43
- Fig. 7** Lombo superior esquerdo retirado do atum pronto para realização dos cortes secundários, f. 43
- Fig. 8** Segmentação do lombo do atum para confecção das amostras com peso aproximado de 100 g, f. 44
- Fig. 9** Pesagem das amostras já acondicionadas no interior da embalagem plástica com o auxílio da balança de precisão marca Marte, modelo AM 550 Automarte, f. 44
- Fig. 10** Embalagem das amostras de atum e confecção das atmosferas na Seladora a vácuo da marca TECMAQ, modelo AP 450, f. 45
- Fig. 11** Termo-soldagem da embalagem de atum na seladora a vácuo da marca TECMAQ, modelo AP 450, f. 45
- Fig. 12** Amostra de atum pronta, devidamente embalada em atmosfera modificada, f. 46

- Fig. 13** Amostra de atum pronta, devidamente embalada a vácuo, f. 46
- Fig. 14** Representação gráfica dos valores médios de mg de BVT-N/100 g de amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2°C) durante 20 dias, f. 51
- Fig. 15** Representação gráfica dos valores médios do pH das amostras de atum (*Thunnus albacares*) mantidos em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias, f. 53
- Fig. 16** Placa de cromatografia das amostras de atum (*Thunnus albacares*) mantidos em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias, f. 54
- Fig. 17** Representação gráfica dos valores médios dos logaritmos das contagens de mesófilos nas amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias, f. 56

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Valores médios de mg BVT-N/100 g de amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias, f. 50
- TABELA 2** - Valores médios de pH das amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias. f. 52
- TABELA 3** - Valores médios dos logaritmos das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, das amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias, f. 55
- TABELA 4** - Valores do tempo de duplicação (TD) em dias, fase de latência (Lag) em dias e contagem na fase estacionária de crescimento (y<sub>END</sub>) obtidos pela equação de Baranyi, das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, das amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias. f. 57

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

APC	Agar Padrão para Contagem
BFH	Bactérias Formadoras de Histamina
BVT	Bases Voláteis Totais
CM	Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
EAM	Embalagem em Atmosfera Modificada
FDA	Food and Drug Administration
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
OTMA	Óxido de Trimetilamina
TMA	Trimetilamina
TON	Tonelada
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## RESUMO

O trabalho objetivou avaliar o efeito da embalagem em atmosfera modificada em atum (*Thunnus albacares*). As amostras foram submetidas a 5 tratamentos: embaladas a vácuo e com aproximadamente 1,5 L de: ar (100%), CO<sub>2</sub> (100%), 40/60 e 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>. Durante os 20 dias de armazenamento, tomaram-se amostras determinando o pH, a produção de bases voláteis totais (BVT), a concentração de histamina e a contagem total de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos. Os resultados obtidos foram dispostos em tabelas e gráficos para a realização das análises estatísticas descritivas. Os parâmetros de crescimento (fase de latência, tempo de duplicação e contagem na fase estacionária de crescimento) foram determinados através da equação modificada de Baranyi. Observou-se que as amostras mantidas em aerobiose apresentaram um rápido aumento dos valores de BVT, com seu pico máximo no 20º dia de estocagem (27,5 mg BVT-N/100 g). A produção de BVT das outras atmosferas manteve-se, durante o decorrer do período de estocagem, em torno de 11 mg de BVT-N/100 g. As amostras embaladas em aerobiose apresentaram aumento de pH, a partir do 13º dia de armazenamento, tendo seu valor máximo (6,43) no 15º dia. As outras atmosferas demonstraram comportamento de pH semelhante, com valores próximos ao pH inicial da amostra. Com a exceção das amostras mantidas em aerobiose, onde no 15º dia de estocagem detectou-se aproximadamente 10 mg/100 g de histamina formada, todas as outras não demonstraram produção de histamina capaz de ser evidenciada pela metodologia empregada, durante o período de estocagem. A contagem das amostras embaladas em aerobiose, a partir do 7º dia se destacaram das demais, esse maior crescimento foi mantido até o último dia de estocagem, onde foram encontrados valores superiores nas amostras mantidas em vácuo e 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>. As atmosferas com 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub> não alcançaram contagens tão altas como as das outras três atmosferas. A atmosfera com 100% de CO<sub>2</sub> só ultrapassou o limite proposto no último dia de estocagem (7,4 Log de UFC/g). Foi observada correlação entre o aumento da fase de latência da curva de crescimento e aumento da concentração de CO<sub>2</sub>. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a embalagem com 100% de CO<sub>2</sub>, se destacou das demais, apresentando um bom desempenho na preservação do lombo de atum, estendendo o prazo de vida comercial, sendo eficaz para manutenção dos parâmetros físico-químicos dentro dos limites de aceitabilidade propostos pela legislação vigente.

**Palavras-chave:** Atum; atmosfera modificada; vida comercial.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of modified atmosphere packing on tuna-fish (*Thunnus albacares*). The samples were submitted to 5 treatments: vacuum packed and with approximated 1,5 L of: air (100%), CO<sub>2</sub> (100%), 40/60 e 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>. During the 20 days of storage, samples were collected to determine the pH, total volatile bases (TVB), histamine concentration and total viable count (TVC). The results obtained were arranged in tables and charts so as to make the statistical analyses. The growth parameters (lag phase, doubling time and the counting during the stationary phase) were determined by Baranyi modified equation. It was observed that the samples kept in aerobiosis showed a quick increase in TVB values, reaching their peak on the 20<sup>th</sup> day of storage (27.5 mg TVB-N/100 g). The production of TVB in the other samples stayed, during storage period, around 11 mg de TVB-N/100 g. The samples packed under aerobiosis showed an increase in their pH as of the 13<sup>th</sup> storage day, reaching a maximum of 6.43 on the 15<sup>th</sup> day. The other atmospheres presented similar pH patterns, with little difference from the initial sample. Except for the samples kept in aerobiosis, in which it was detected approximately 10 mg/100g of histamine during storage. The TVC in samples packed under aerobiosis, as of the 7<sup>th</sup> day stood out, this bigger growth was sustained until the last day of storage, in which, higher TVC was found in vacuum packed samples and 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>. The 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> and 100% CO<sub>2</sub> atmospheres did not reach as high TVC results as the other 3 atmospheres. The 100% CO<sub>2</sub> atmosphere reached the proposed limit just on the last day of storage (7.4 Log de UFC/g). This study showed a strong correlation between an increase in the Lag phase and an increase in CO<sub>2</sub> concentration. According to the results obtained in this study, it can be concluded that the 100% CO<sub>2</sub> packing, stood out in relation to the others, showing good performance preserving tuna-fish loin, extending shelf-life, being effective in keeping the quality parameters within the limits of acceptance proposed by the present standards.

**Key-words:** Tuna-fish, modified atmosphere, shelf-life.

## 1 INTRODUÇÃO

A grande maioria da superfície do nosso planeta é coberta por água e, essa vasta área, representa um volume gigante em qual vivem e se multiplicam aproximadamente 20.000 espécies, representando a pesca, uma grande fonte de proteína de alto valor biológico (SIKORSKI, 1990). Essas proteínas apresentam alto valor nutricional, contendo um ótimo balanceamento de aminoácidos essenciais, sendo especialmente rico em lisina, aminoácido limitante em cereais como arroz, milho e farinha de trigo (OGAWA, 1999).

A palavra atum, pela definição do dicionário Aurélio (FERREIRA, 1999) é originária do grego *thýnnos*, do latim *tunnes* e do árabe. *at-tūn*. Tratando-se de um peixe teleósteo perciforme, da família dos tunídeos (*Thunnus thynnus*), encontrado no Atlântico, cujo comprimento chega a 2,40m, e cujo peso vai até 320kg. Esse peixe conhecido desde a remota antiguidade, nada em cardumes, sendo sua pesca de grande importância econômica. O nome atum é empregado também para outras espécies do gênero.

A família dos atuns é constituída por peixes de alto valor comercial, capturados ao redor do mundo por uma grande variedade de métodos de pesca, sendo sua carne apreciada praticamente em todo o planeta. Praticamente todo o atum comercializado no Brasil e em outros países encontra-se sob a forma de conservas enlatadas, mas o interesse por filés frescos e congelados vem crescendo, provavelmente pelo aumento do interesse por comida japonesa (LOPES-GALVES et al., 1995). O atum ocupa uma posição privilegiada dentre os peixes quanto ao rendimento de carcaça, pois possui uma massa muscular avantajada, e em contrapartida, sua cavidade abdominal e vísceras possuem pequenas dimensões, sendo, portanto, animais produtores natos de carne.

A espécie de peixe usada no estudo foi o tunídeo (Figura 1), popularmente conhecido como albacora-de-laje, nome científico: *Thunnus albacares* (BONNATERRE, 1788), classificado taxonomicamente da seguinte forma:

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Escombridae

Gênero: *Thunnus*

Espécie: *albacares*



**Figura 1.** Exemplar de *Thunnus albacares*.

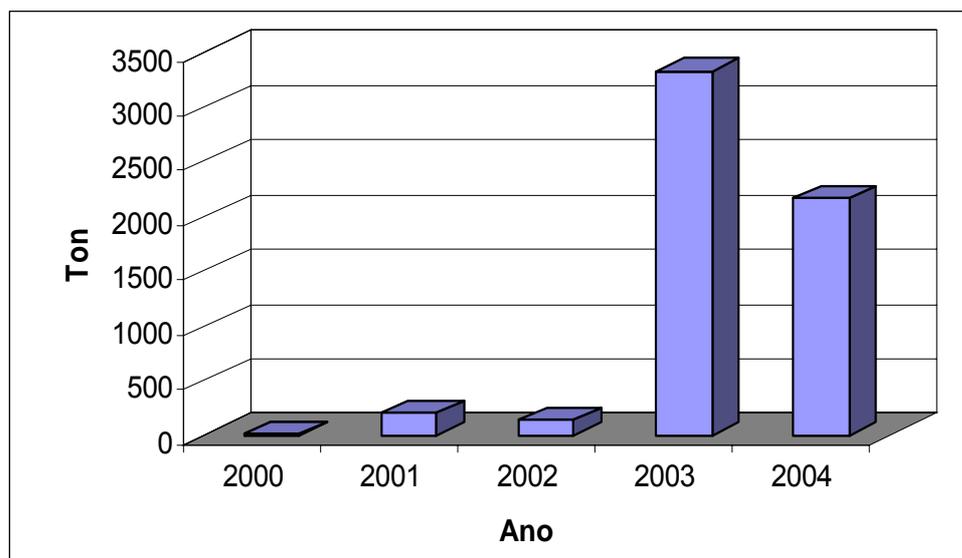
A Albacora-de-laje (*T. albacares*) é um peixe de elevado valor comercial com carne considerada de excelente palatabilidade. Sua ocorrência é cosmopolita, ocorrendo nos mares tropicais e subtropicais, no Brasil ocorre em toda a costa (SZPILMAN, 2000). O *T. albacares* é a segunda espécie em termos de volume de pesca e popularidade. Sua participação no total de atum capturado em todo o mundo é de cerca de 35%.

A importância do *T. albacares* é tamanha que já foi motivo de estampa de selos postais de diversos países, alguns exemplos estão na Figura 2.



**Figura 2.** Selos das Ilhas Virgens e Bermudas tendo como tema o *Thunnus albacares*.

A Figura 3 mostra a quantidade em toneladas de *T. albacares* exportada pelo Brasil para os EUA de 2000 até a presente data.



**Figura 3.** Quantidade, em Toneladas, de *Thunnus albacares* exportada pelo Brasil para os EUA nos anos de 2000 a 2004 (dados adaptados pelo autor).

A preservação da qualidade original dos produtos constitui uma das principais preocupações da indústria de alimentos (SIKORSKI, 1990). O peixe fresco é um alimento altamente perecível, e deve ser manuseado durante todo o tempo com extremo cuidado e com procedimentos que visem evitar ou inibir a multiplicação de microrganismos. Portanto, de acordo com o *Codex Alimentarius* (1976), a vida útil do pescado é encurtada drasticamente se não manuseado apropriadamente.

A vida útil dos produtos perecíveis como o pescado conservado em atmosfera normal, está limitada principalmente por dois fatores: o efeito do oxigênio

atmosférico e o crescimento de microrganismos aeróbicos causadores de alterações (PARRY, 1993).

Quando mantido sob refrigeração e gelo, a vida de prateleira do pescado pode ser estabelecida em aproximadamente dois a 14 dias, dependendo da espécie, local de captura e estação do ano (STAMMEN, 1990). Este tempo pode ser considerado suficiente para a distribuição local do produto, porém, ao se pensar em transportá-lo por longas distâncias, a refrigeração mostra-se ineficaz, somado a isso estão os crescentes custos com a energia necessária para o congelamento e refrigeração desses produtos.

É uma prática constante, em algumas indústrias brasileiras licenciadas para a exportação de pescado, a comercialização de partidas de lombo de atum embalado a vácuo, método que agrega valor ao produto. Além disso, o peixe exportado segmentado apresenta uma melhor logística de distribuição para o mercado consumidor final por parte dos importadores, pois o *T. albacares* é um peixe que pode atingir grandes dimensões, apresentando comprimento máximo de 2,8 metros. Já o peso máximo, pode ultrapassar os 200 Kg (SZPILMAN, 2000). Por esta razão é muito mais cômodo para o importador e para a indústria, a distribuição de lombos já devidamente embalados e pesando de 5 a 10 kg.

Devemos ainda atentar quanto a questão da saúde pública, pois o *T. albacares* pertence a família Scombridae, que abriga peixes possuidores de altas taxas do aminoácido livre histidina, que é facilmente convertido em histamina por descarboxilação. Dependendo da temperatura e tempo de exposição, poderá ocorrer uma formação suficiente para dar origem a uma intoxicação alérgica severa, sendo considerado que níveis acima de 50 mg por 100 g de produto são suficientes para produzir sintomas como: faces vermelhas, tontura, cefaléia, edema dentre outros.

A intoxicação ocasionada por esses peixes, ocupa o segundo lugar no ranking de frequência de enfermidades transmitidas por alimento, associadas com consumo de peixe nos Estados Unidos da América (BEAN, 1990). O Ministério da Agricultura, por intermédio de sua Portaria n° 185 de 13 de maio de 1997, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado) estabelece o nível máximo de histamina em 100 ppm no músculo das espécies pertencentes às famílias Scombridae, Scombresocidae, Clupeidae, Coryphaenidae, Pomatomidae.

Vários estudos em produtos de origem animal têm sido realizados visando avaliar o efeito da embalagem em atmosfera modificada (EAM) sobre a sua conservação. Esta consiste em substituir o ar que rodeia o produto que se pretende conservar por um gás ou mistura de gases, que ofereça as melhores condições para a manutenção da qualidade física e microbiológica do produto por um período de tempo maior. A efetividade desse sistema depende da ação da EAM sobre a microbiota do produto e indução de possíveis alterações químicas nos alimentos armazenados. Parry (1993), afirma que a vida útil do pescado embalado em ar atmosférico é de apenas 2 dias, enquanto que no embalado em EAM, este período sobe para 10 dias.

Existe também a carência de informações e trabalhos científicos relacionados ao uso de EAM neste produto, o que contribuirá na criação de bases para regulamentação futura deste tipo de produto por parte dos órgãos de fiscalização e do setor pesqueiro.

De acordo com o exposto, objetiva-se avaliar as concentrações e misturas gasosas que apresentem melhor desempenho, e, portanto, maior aplicabilidade para a conservação do lombo de atum embalado em atmosfera modificada mantido sob refrigeração. Outro objetivo é o acompanhamento do comportamento da população bacteriana (mesófilos) durante o período de estocagem, assim como das alterações de características físico-químicas (pH, bases voláteis totais, histamina) comparando, também, a vida útil do peixe embalado em EAM em relação com aerobiose, e avaliando-se ainda o risco potencial da formação de histamina neste peixe e a aplicabilidade da EAM em prevenir este risco.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será feita uma revisão de literatura sobre a importância do atum, seguida da microbiota em pescado de um modo geral, sua embalagem em atmosfera modificada, e, finalmente, a deterioração do pescado e histamina.

### 2.1 IMPORTÂNCIA DO ATUM

Os atuns são peixes de grande aceitação no mercado internacional, no ano de 2002 foram importados pelos Estados Unidos 43.099.928 Kg de atum, englobando as diversas espécies e modos de apresentação, movimentando um total de 110.469.972 dólares. Dentre esse total, o Brasil entrou com 792.200 Kg de atum inteiro congelado e 87.315 Kg de atum fresco, arrecadando o valor de 2.154.414 dólares.

Dentre a família dos atuns, a albacora de laje, possui um mercado bem desenvolvido no mundo inteiro, sendo um peixe bastante requisitado no comércio internacional de pescado. Para dar números ao comércio dessa espécie, no ano de 2002, foram importados pelos Estados Unidos da América 1.446.090 Kg de *Thunnus albacares*, girando um valor de 8.679.167 dólares. Desse total, o Brasil contribuiu com 144.363 Kg de *Thunnus albacares* inteiro fresco, arrecadando um valor de 358.172 dólares. No ano de 2003 foram importados pelos Estados Unidos 1.952.943 Kg de *Thunnus albacares* movimentando uma quantia de 12.602.467 dólares, o Brasil participando com 93.984 Kg (NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE, 2004).

## 2.2 MICROBIOTA EM PESCADO

Molin e Stenstrom (1984) determinaram que a microbiota inicial de filés de arenque era dominada por *Shewanella putrefasciens* e *Pseudomonas sp.*

A microbiota do peixe vivo está diretamente relacionada à microbiota das águas onde ele vive. No muco que recobre a superfície externa do pescado se tem encontrado bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Serratia*, *Vibrio* e *Bacillus*.

As bactérias presentes na superfície do pescado procedente das águas do norte são principalmente psicrófilas, enquanto que em pescados provenientes das águas tropicais as bactérias encontradas são principalmente mesófilas. No intestino do pescado de ambas as procedências se encontram bactérias dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Escherichia* (FRAZIER E WESTHOFF, 1988).

O número de bactérias existentes no muco e na superfície da pele do pescado recém capturado no mar pode oscilar desde valores tão baixos como 100 por centímetro quadrado, até valores da ordem de vários milhões por centímetro quadrado, enquanto que no conteúdo intestinal, podem-se encontrar desde mil a um milhão de bactérias por mililitro. O tecido das brânquias pode albergar uma quantidade de mil a um milhão de bactérias por grama (FRAZIER E WESTHOFF, 1988).

Segundo o mesmo autor, existem ainda outros fatores atuantes na intensidade da microbiota do pescado, o número de microrganismos existentes na pele do pescado podendo ser influenciado pelo sistema de pesca adotado.

De acordo com Gennari e Tomaselli (1988), a microbiota do peixe fresco é principalmente composta por *Pseudomoneaceae*, *Flavobacterium/Cytophaga*, *Micrococaceae*, corynebactérias e *Enterobacteriaceae*. Em seu trabalho sobre as mudanças na microbiota aeróbica da pele e guelras da sardinha do mediterrâneo (*Sardina pilchardus*) durante armazenagem em gelo, foi evidenciado que, durante a estocagem, o crescimento de *Pseudomonas sp.* foi pronunciado e estes se tornaram o grupo mais numeroso, sendo que as cepas não fluorescentes de *Pseudomonas* foram as dominantes. Na superfície da sardinha durante os primeiros dias de

estocagem a família *Neisseriaceae* foi o segundo maior grupo, após o que, essa posição foi tomada pelo grupo *Flavobacterium/ Cytophaga*.

Surendran et al. (1989), citam que, *Moraxella*, *Acinetobacter*, e o grupo *Vibrio* somam de 58 a 76% da biota inicial nos peixes marinhos e 25 a 45% nos peixes de água doce, *Pseudomonas* constitui 10% da flora inicial da cavala indiana (*Rastrelliger kanagurta*) e 20% da sardinha (*Sardinella longiceps*), já na tilápia, *Pseudomonas* constitui de 20 a 25%.

Lopes-Sabater et al. (1995), não consideraram a família *Enterobacteriaceae* e coliformes totais como parte da microbiota normal do peixe fresco, pelo fato de não terem sido detectadas antes do 3º dia de estocagem a temperatura de 0 °C e 24 horas a 8 °C

O pescado vivo apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, guelras e vísceras, passando os demais tecidos a serem infectados após a morte do animal. A composição da microbiota na pele (ou muco) depende do local de captura e período de pesca. As bactérias de origem oceânica que contaminam os peixes, quando comparadas com a microbiota da carne de gado, apresentam grande diversificação de espécies (OGAWA, 1999).

### 2.3 EMBALAGEM EM ATMOSFERA MODIFICADA

Para suprir o consumidor com alimentos nutritivos, baratos e acessíveis, a indústria de alimentos e a cadeia produtora de alimentos têm permanecido em um estado de constante evolução, busca e inovações (GENIGEORGIS, 1985).

Tecnologias que lidam com a extensão, com segurança, do tempo de vida comercial de alimentos altamente perecíveis e com alto teor protéico como peixes, carnes vermelhas e produtos de aves, são de uma significância econômica enorme por numerosas razões que incluem: a possibilidade de transportes a longas distâncias mais econômicos, para novos mercados onde se encontram as necessidades humanas, redução de perdas devido a deteriora e conveniência para a indústria e para o consumidor (idem).

Ainda, de acordo com o mesmo autor, existem basicamente três categorias de atmosfera modificada usada na preservação de alimentos: (1) modificação da atmosfera através de técnica de embalagem, como a embalagem a vácuo; (2)

redução da pressão atmosférica dentro de contêiner para se alcançar uma condição de estocagem hipobárica e (3) modificação da atmosfera através de enriquecimento da embalagem ou contêiner pela adição de uma variedade de mistura de gases.

De acordo com Parry (1993), a embalagem a vácuo foi primeira forma de atmosfera modificada desenvolvida comercialmente. Com boas condições de realização do vácuo, o nível de oxigênio se reduz a menos de 1%. Em caso de carne embalada a vácuo, a respiração da mesma, consome rapidamente o oxigênio residual, sendo este substituído por CO<sub>2</sub>, que no final sofre um acréscimo no interior da embalagem até concentrações de 10 a 20%. O autor ainda considera, como fatores negativos da embalagem a vácuo, as mudanças de cores pela conversão na carne de mioglobina a metamioglobina, e o acúmulo de exudato da carne na embalagem.

Na embalagem em atmosfera modificada, são usados vários gases, ou mistura de gases, dentre os mais importantes podemos citar o CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e o O<sub>2</sub>.

O dióxido de carbono exerce um forte efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano, porém o verdadeiro mecanismo de inibição não é conhecido. É particularmente efetivo, contra as bactérias aeróbias Gram-negativas da decomposição, tal como *Pseudomonas* e *Shewanella*, que provocam alterações de cor e odor em carnes, aves e pescados. Entretanto o CO<sub>2</sub>, não retarda o crescimento de todos os microrganismos, e seu efeito inibidor aumenta com a diminuição da temperatura, devido ao aumento de sua solubilidade (PARRY, 1993).

O nitrogênio é um gás inerte com baixa solubilidade na água e nas gorduras. Na atmosfera modificada, é utilizado, principalmente para substituir o oxigênio, retardando a oxidação e prevenindo o aparecimento do ranço nos frutos secos. Indiretamente, também pode influenciar na preservação de produtos perecíveis, por dificultar o desenvolvimento dos microrganismos aeróbios, responsáveis pela decomposição.

O nitrogênio tem ainda a função de atuar como recheio, para evitar o colapso da embalagem, em alimento que absorvem o CO<sub>2</sub> (PARRY, 1993).

A capacidade da embalagem em atmosfera modificada em estender o prazo de vida comercial de alimentos vem sendo reconhecida por muitos anos, entretanto a primeira aplicação comercial em maior escala deste tipo de embalagem, não se concretizou até 1974, quando a companhia francesa SCOPA começou a vender carne em atmosfera modificada (CHURCH, 1994).

Para alguns produtos, a embalagem em atmosfera modificada tem se tornado o método predominante de embalagem, 95% de toda a massa fresca vendida no Reino Unido é embalada em atmosfera modificada e no caso de frutos do mar, cerca de 10% é comercializado embalado em atmosfera modificada (CHURCH, 1994).

Vem ocorrendo em larga escala um aumento da demanda por produtos frescos com prazo de vida comercial estendido por mercados consumidores de todo o mundo, e somado a isso, estão os crescentes custos com a energia necessária para o congelamento e refrigeração desses produtos, a indústria de processamento de pescado está procurando ativamente métodos alternativos de preservação e prolongamento da vida comercial de seus produtos assim como uma melhoria na apresentação dos mesmos, não importando se o produto é o peixe fresco ou refrigerado, ao mesmo tempo a indústria procura economizar com custos de energia. Dentre os métodos que acumulam potencial para alcançar este objetivo está a embalagem em atmosfera modificada (ASHIE, 1996).

## 2.4 DETERIORA DO PESCADO

Este item abordará a revisão de literatura referente a deteriora do pescado, tanto em condições de aerobiose quanto em atmosfera modificada.

### 2.4.1 Deteriora do pescado em aerobiose

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

A magnitude e extensão das alterações autolíticas em peixes é consideravelmente menor do que as alterações bacterianas. O peixe absolutamente fresco e íntegro é impermeável a bactérias devido a pele intacta. Entretanto, após a morte, a autólise se instala, tornando a pele do peixe permeável as bactérias e ao mesmo tempo liberando açúcares simples, aminoácidos livres, etc, o que provê um meio rico em nutrientes para o crescimento bacteriano (MUKUNDAN et al., 1986).

Um grande número de bactérias ( $10^7 - 10^8$  /g) é encontrado normalmente no pescado em processo de decomposição, mas somente parte dessa microbiota, deve ser classificada como deterioradores ativos (GRAM et al., 1987).

Gram et al. (1987), estudando a biota responsável pela deterioração do peixe em baixa (0 °C) e alta (20 °C) temperaturas, identificaram as bactérias do gênero *Shewanella* como os principais organismos presentes na deterioração do pescado estocado a 0 °C. Estas bactérias também foram dominantes nos peixes deteriorados a temperaturas mais altas (20 °C), mas outros microrganismos também se desenvolveram. Um grande número de bactérias Gram-negativas fermentativas, pertencentes a família *Vibrionaceae* foi encontrado no peixe mantido a 20 °C, o que provavelmente foi devido ao seu curto tempo de geração (aproximadamente 30 minutos) a esta temperatura.

A deterioração é certamente influenciada pela presença do óxido de trimetilamina (OTMA), particularmente sob condições onde o oxigênio é excluído. Bactérias como *S. putrefasciens*, *P. phosphoreum* e *vibrionaceae*, são capazes de utilizar o OTMA como aceptor final da cadeia de elétrons na respiração anaeróbia, resultando na formação de odores e sabores indesejáveis e TMA (GRAM et al., 1987).

Gennari e Tomaselli (1988), isolaram *Shewanella putrefasciens* do peixe deteriorado com menor frequência do que em outros trabalhos como o de Gram et al. (1987).

As principais espécies de bactérias que alteram o pescado vão variar de acordo com a temperatura em que se mantém o pescado, ainda que nas temperaturas normalmente utilizadas para refrigerar o pescado é mais provável que predominem as espécies de *Pseudomonas*, seguindo-as em ordem de maior para menor importância, as espécies do gênero *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Flavobacterium* (FRAZIER E WESTHOFF, 1988).

O padrão de mudança da biota dos peixes tropicais durante a estocagem em gelo parece ser similar àquela observada em peixes provenientes de águas temperadas. Na microbiota inicial, *Moraxella*, *Acinetobacter*, e o grupo *Vibrio* somam de 58 a 76% nos peixes marinhos e, 25 a 45% nos peixes de água doce. *Pseudomonas* constitui 10% da microbiota inicial da Cavala Indiana (*Rastrelliger kanagurta*) e 20% da sardinha (*Sardinella longiceps*), já na tilápia, *Pseudomonas* constitui de 20 a 25% da sua biota inicial. A medida que os dias de estocagem progredirem, *Pseudomonas* sp. emerge como o grupo dominante, sendo responsável

por 75 a 81 % da biota dos peixes marinhos e 61 a 70% nos peixes de água doce no período de deteriora. Independentemente da biota inicial do peixe, *Pseudomonas* e *Shewanella* emergem como os gêneros predominantes durante a deteriora do peixe mantido sob a ação do gelo (SURENDRAN et al., 1989).

Jørgensen e Huss (1989) em seus resultados confirmaram que *Shewanella putrefasciens* constitui a principal bactéria da deteriora de peixe estocado a 0 °C, independente da origem do peixe.

A vida comercial do pescado mantido sob condição de refrigeração e gelo, varia de dois a 14 dias, dependendo da espécie, local de captura e estação do ano (STAMMEN, 1990).

No pescado, a microbiota da pele e dos intestinos, está adaptada a temperaturas mais baixas que os mamíferos, por tanto, a refrigeração produz uma menor diferença de temperatura, especialmente para pescados capturados em regiões mais frias (PARRY, 1993).

Lopes-sabater et al. (1995) determinam que a decomposição do atum em temperaturas entre 0 e 20 °C foi associada principalmente com bactérias psicrotróficas.

Existem alguns fatores intrínsecos de grande importância e que tem grande influência sobre a microbiologia e degradação do pescado. Entre estes fatores estão a natureza pecilotérmica do pescado e o seu ambiente aquático, o alto pH *post-mortem* da carne do pescado (usualmente maior do que 6,0), a presença de grandes quantidades de nitrogênio não protéico e a presença do óxido de trimetilamina (GRAM E HUSS, 1996).

Sob condições de aerobiose e estocagem em gelo, a microbiota associada a deterioração é composta quase que exclusivamente de *Pseudomonas sp* e *Shewanella putrefasciens*. A deteriora de peixe embalado a vácuo provindo de águas marinhas temperadas é causada por *Shewanella putrefasciens* e *Photobacterium phosphoreum* e a diferença no número inicial de *S. putrefasciens* e *P. phosphoreum*, provavelmente decide qual dos dois se torna o mais importante (GRAM E HUSS, 1996).

Grikorakis et al. (2003) estudando a degradação da dourada (*Sparus aurata*) do mar grego, concluíram através de contagens bacteriológicas que a degradação por microrganismos aeróbicos é dominante. Foi registrado um aumento do pH

muscular após o 8º dia de estocagem e o aumento das bases voláteis totais ocorreu de maneira suave e uniforme.

#### 2.4.2 Deteriora em EAM

A eficiência do CO<sub>2</sub> na conservação do pescado foi constatada por Killefer (1930), que observou um aumento de 2 a 3 vezes na vida útil do pescado fresco. Alguns estudos demonstram que, mesmo em baixas concentrações (20%), o CO<sub>2</sub> é eficiente na preservação do pescado (BROWN et al., 1980). Parry (1993) considera que as concentrações de CO<sub>2</sub> acima de 5% inibem o crescimento da maior parte das bactérias que provocam alterações, especialmente as espécies psicrófilas, que crescem em uma ampla gama de alimentos refrigerados.

Banks et al. (1980) reportaram um aumento da contagem de bactérias ácido-láticas em atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>.

Segundo Barnett (1982), o salmão do Pacífico eviscerado, mantém condição aceitável de conservação por mais de 21 dias a 0 °C quando embalado em atmosfera modificada contendo 90 % de CO<sub>2</sub>, enquanto que a conservação desse salmão com uso de gelo é de apenas 12 dias.

Molin e Stenstrom (1984), estudando o desenvolvimento microbiano em filés de arenque estocados a 0 e 15 °C, em ar e 100% de dióxido de carbono, encontraram que a vida comercial dos filés, definido como o tempo necessário para a contagem de microrganismos aeróbicos atingir  $1 \times 10^7$  UFC/g, cresceu com o decréscimo da temperatura de estocagem, sendo de 1 dia para o peixe armazenado em ar a 15 °C e 7 dias a 0 °C. Os valores correspondentes na atmosfera de CO<sub>2</sub> foram 3 dias e 33 dias respectivamente.

Esses autores relatam também que a microbiota inicial de filés de arenque era dominada por *Shewanella putrefasciens* e *Pseudomonas sp.* A biota permaneceu desta mesma forma durante a decomposição após estocagem em condições de aerobiose, correspondendo a 62 a 95 % respectivamente em todas as temperaturas estudadas. Na atmosfera de CO<sub>2</sub> encontraram como microbiota predominante no momento em que ocorria a decomposição um número significativo de *Lactobacillus sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Shewanella putrefasciens*.

Jørgensen e Huss (1989) confirmaram que *Shewanella putrefasciens* constitui a principal bactéria da deterioração de peixe estocado a 0 °C, independente se o peixe é embalado a vácuo ou estocado em ar atmosférico.

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 EAM, entretanto a mais promissora parece ser a atmosfera enriquecida com altas concentrações de CO<sub>2</sub>. (Sikorski, 1990). Stammen et al. (1990) também relatam que elevadas concentrações de dióxido de carbono em embalagem em atmosfera modificada (EAM), têm demonstrado boa inibição da microbiota normal de decomposição do pescado duplicando ou triplicando o prazo de vida comercial dos produtos que é de 2 a 14 dias.

OKA et al. (1992) estudando o efeito do ar e da atmosfera modificada (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 60:40%) sobre bactérias toxigênicas em filés de atum (*Thunnus obesus*) concluíram que a atmosfera modificada exerceu ação inibitória sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Resultado parecido foi obtido por Soccol (2002), embalando filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em ar (controle), EAM (60% de CO<sub>2</sub> + 40% de O<sub>2</sub>) e vácuo, mantendo as amostras a uma temperatura de 1 ± 1 °C, concluindo que os tratamentos embalados em atmosfera modificada e a vácuo, associados ou não ao ácido acético, inibiram o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e microrganismos psicrófilos, proporcionando uma vida útil de 20 dias.

Dalgaard et al. (1993) estudando a deterioração e a vida comercial de filés de bacalhau embalados em vácuo e atmosfera modificada e mantidos a 0 °C, encontraram que, contrariando estudos prévios, microrganismos Gram-negativos de tamanho avantajado, com características psicrófilas foram a biota dominante de filés de bacalhau deteriorados estocados em atmosfera de CO<sub>2</sub> e não *Shewanella putrefasciens*. Esses organismos, que podem ser *Photobacterium phosphoreum*, podem explicar a curta extensão da vida comercial de peixes embalados a vácuo e EAM comparado a produtos cárneos.

Foi sugerido que tanto a embalagem em atmosfera modificada, quanto a embalagem a vácuo, podem inibir a *Shewanella putrefasciens*, típica bactéria de deterioração do pescado produtora de H<sub>2</sub>S, já que a máxima concentração de bactérias

produtoras de H<sub>2</sub>S encontrada em produtos de pescado embalado em EAM é muito baixa. Comparado com a embalagem a vácuo, uma extensão da vida comercial de 6 a 7 dias foi alcançada com EAM com 48% de CO<sub>2</sub>, entretanto, com 100% de CO<sub>2</sub> a vida comercial foi entendida somente em 2 a 3 dias. Textura deficiente e alta produção de exudato indicaram que a vida comercial desses filés foi limitada por reações químicas, e não somente por atividade microbiológica.

Um outro relato interessante dos estudos desses autores, foi a baixa concentração de bactérias ácido-láticas detectadas na embalagem em atmosfera modificada, indicando que essas bactérias não apresentam importância quantitativa no processo de deterioração dos filés de bacalhau.

Dalgaard (1995) continuando seu trabalho com filés de bacalhau confirmou suas suspeitas anteriores, concluindo que as células grandes sugeridas como sendo responsáveis pela deterioração de bacalhau embalado em vácuo e EAM (0-5, 10-20, 25-30, 40-60, 90-100% de CO<sub>2</sub>), mantido a 0 °C foram realmente identificadas como *Photobacterium phosphoreum*.

Estudando ainda a atividade de deterioração dessas células, de *Shewanella putrefasciens* e outros microrganismos isolados de filés de bacalhau embalados deteriorados. Em média, células de *P. phosphoreum* produzem 30 vezes mais trimetilamina do que células de *S. putrefasciens*, sendo o nível de trimetilamina encontrado em bacalhau embalado deteriorado de 30 mg TMA/100g correspondente a 10<sup>7</sup> UFC/g de *P. phosphoreum* e a 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC/g de *S. putrefasciens*. A presença de 10<sup>7</sup> UFC/g de *P. phosphoreum* foi realmente encontrada no bacalhau embalado deteriorado sugerindo que este microrganismo pode ser responsável pela deterioração nessas condições.

Concentrações superiores a 10<sup>8</sup> UFC/g de *S. putrefasciens* foram necessárias para produção de odores indesejáveis, o que levou os autores a concluir que este microrganismo não tem importância para deterioração de bacalhau embalado.

Estudando a deterioração ocasionada por microrganismos em EAM, Church (1994), relata que as bactérias Gram-negativas são geralmente mais sensíveis ao CO<sub>2</sub> do que as Gram-positivas. Em alimentos com elevado teor de proteína, preservadas pelo frio, como carne e peixe, geralmente são inibidas bactérias Gram-negativas como: *Pseudomonas sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter sp.* e *Moraxella sp.*, enquanto as bactérias Gram-positivas ácido-láticas e *Brochothrix thermosphacta*, em contrapartida, se tornam microrganismos dominantes.

López-Gálvez et al. (1995), descrevendo o efeito do dióxido de carbono e atmosferas enriquecidas com oxigênio sobre as mudanças químicas e microbiológicas em atum refrigerado, encontraram que as amostras de atum (*Thunnus alalunga*) controle, embaladas em ar, apresentavam-se deterioradas após 9-11 dias de estocagem, alcançando contagens de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>, entretanto, quando os filés foram embalados em atmosferas enriquecidas com 20 e 40% de CO<sub>2</sub>, o crescimento bacteriano foi inibido, alcançando valores em torno de  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, após 15 e 19 dias de estocagem respectivamente. Determinou-se que quando os filés foram embalados em atmosferas enriquecidas com 20 e 40% de CO<sub>2</sub> *Brochothrix thermosphacta* foi o microrganismo dominante.

Considerou-se então a atmosfera mais efetiva a de 40/60% de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, concluindo que a vida comercial do atum embalado nesta atmosfera pode ser dobrada, tanto com respeito à condição microbiológica quanto a coloração.

Sawaya et al. (1995) estudaram o efeito da atmosfera modificada (70% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 25% de N<sub>2</sub>) e tratamento com cultura de bactérias ácido-lática na estocagem de frango sob condições próximas a estocagem encontrada nos mercados (4 e 7 °C). observaram que na embalagem em atmosfera modificada as contagens de bactérias ácido-láticas aumentaram, enquanto que as de *Pseudomonas* começaram a decrescer. Isto sendo devido as propriedades microaerófilas dos *Lactobacillus*, que toleram a atmosfera modificada melhor que *Pseudomonas*. Concluiu-se também que o pré-tratamento da EAM com cultura de bactérias ácido-láticas pode estender a vida comercial de 6-7 dias e 4-5 dias nas carcaças sem tratamento para 36 (4 °C) e 35 dias (7 °C).

Debever e Boskou (1996) estudando o efeito da atmosfera modificada, com 4 diferentes composições (60% CO<sub>2</sub> + 10% O<sub>2</sub> + 30% N<sub>2</sub>, 60% CO<sub>2</sub> + 20% O<sub>2</sub> + 20% N<sub>2</sub>, 60% CO<sub>2</sub> + 30% O<sub>2</sub> + 10% N<sub>2</sub>, 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub>), sobre a microbiota produtora de bases voláteis totais (BVT) e trimetilamina (TMA) em filés de bacalhau, concluíram que todas as amostras estavam com valores de BVT e TMA alto o suficiente, para serem consideradas deterioradas, após o 4º dia de estocagem a 6 °C. Concluem também que a embalagem em atmosfera modificada, contendo 60% de CO<sub>2</sub> e 40% de O<sub>2</sub>, estocada a 6 °C teve um efeito inibitório sobre o crescimento da microbiota normal produtora de TMA e H<sub>2</sub>S (*Shewanella putrefasciens*). Entretanto, essas condições são menos efetivas sobre a inibição do crescimento e atividade das células grandes de *Photobacterium phosphoreum* reductoras do óxido

de trimetilamina, que não são produtoras de H<sub>2</sub>S e mostram grande resistência em atmosfera com presença de 60 % de CO<sub>2</sub>. Para diminuição da redução do OTMA pelo *P. phosphoreum* pode-se lançar mão da adição de O<sub>2</sub> a composição da atmosfera.

Gram e Huss (1996) comentam que a embalagem em CO<sub>2</sub> de peixes marinhos de águas temperadas inibe o desenvolvimento de microrganismos como *Pseudomonas* e *Shewanella putrefaciens* e seus números raramente ultrapassam 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/g

Pastoriza et al. (1998) compararam a conservação de filés de merluza embaladas em EAM (50% CO<sub>2</sub> + 45% de N<sub>2</sub> + 5% de O<sub>2</sub>), em EAM e previamente submersas em solução de NaCl, sendo mantidas em ar atmosférico, a uma temperatura de 2 ± 1 °C. Evidenciando em seus resultados que as amostras mantidas em EAM mostraram valores de pH menores que o controle em ar, após 10 dias de estocagem e valores de BVT menores que o controle após 5 dias de estocagem, sendo os valores de BVT do grupo controle, duas vezes mais altos do que os do peixe mantido em EAM após 14 dias de estocagem. Foi descrito também que a embalagem em EAM, preveniu o alcance do limite para aceitabilidade na contagem total após duas semanas de estocagem.

A autora expôs ainda, que seu estudo mostrou uma grande correlação entre BVT e a contagem total, tanto em peixes mantidos em ar atmosférico quanto em EAM. Se fosse tomado 10<sup>6</sup> bactérias por grama como limite de aceitabilidade para consumo de peixe, o filé de merluza estocado em ar teria uma vida comercial de 7 dias, que seria estendida para 14 dias em EAM e 16 dias em EAM se previamente tratada com solução de NaCl.

Guldager (1998) comparou a embalagem em atmosfera modificada (EAM) em amostras de bacalhau descongelado após sua estocagem em temperatura de congelamento (-20 °C) por período de 2 meses, com bacalhau mantido a uma temperatura de 2 °C e embalado em atmosfera modificada, encontrando melhores resultados para o bacalhau descongelado (20 dias de preservação) em relação ao fresco (12 dias), diferença essa creditada a inativação do *Photobacterium phosphoreum*. O mesmo fato foi confirmado por Bøknæs et al. (2000) também estudando filés de bacalhau descongelados estocados em atmosfera modificada.

Amparando o trabalho de Guldager (1998), Emborg et al. (2002) estudando a deterioração e formação de aminas biogênicas em salmão fresco (*Salmo salar*) e

descongelado, embalados em atmosfera modificada e mantidos a 2 °C. Concluíram que *Photobacterium phosphoreum* foi dominante dentre a microbiota deteriorante do salmão fresco em EAM e que a eliminação deste microrganismo pelo congelamento, permitiu identificar esta bactéria como microrganismo específico de deteriora nestes produtos.

Tewari (1999) estudou a conservação de cortes de carne retalhados utilizando três atmosferas: 100% CO<sub>2</sub>, 100% N<sub>2</sub> e 70% N<sub>2</sub> + 30% CO<sub>2</sub>, considerando o método de estocagem mais efetivo, aquele utilizando embalagem com 100% de CO<sub>2</sub>, armazenado a uma temperatura entre -1,5 e 0,5 °C.

Özogul et al. (2000) estudaram os efeitos da atmosfera modificada e embalagem a vácuo sobre as mudanças químicas, microbiológicas e sensoriais de um exemplar da família *Clupeidae* (*Clupea harengus*) mantido em gelo. As análises químicas e microbiológicas indicaram que a embalagem com CO<sub>2</sub> e a vácuo prolongaram a vida comercial do pescado. Os resultados mostraram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as condições de estocagem em gelo e EAM. E ainda, o CO<sub>2</sub> fez decrescer a produção de hipoxantina, comparado com as amostras mantidas em vácuo e ar.

Ordóñez et al. (2000) estudaram as mudanças microbiológicas e físico-químicas de filés de merluza (*Merluccius merluccius*) estocadas em atmosferas enriquecidas com dióxido de carbono, concluindo que a atmosfera de 40% de CO<sub>2</sub> e 60 % de ar é 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. A partir dos resultados foi deduzido que a microbiota responsável pela deteriora em ar, foi dominada por bactérias Gram-negativas psicrotróficas, presumivelmente do grupo *Shewanella/Pseudomonas*. Na embalagem em atmosfera modificada foi notado um aumento do número de *Lactobacillus sp.*, que na atmosfera com 40% de CO<sub>2</sub>, correspondeu a cerca de 30% da biota. Encontrou ainda que a variação dos valores de BVT foi similar ao de TMA, sendo as mudanças do BVT principalmente devido ao aumento do valor de TMA.

Mano et al. (2000) encontraram variações menores de pH nas atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>, os aumentos encontrados atingiram 0.5 unidades de pH com dificuldade. Foi observado ainda, que um aumento relevante do pH somente foi encontrado em amostras embaladas em ar. O efeito de conservação do CO<sub>2</sub> foi tão evidente quanto o efeito sinérgico da temperatura com a EAM.

Lópes-Caballero et al. (2001) testaram cepas de *Shewanella putrefasciens* isoladas de merluza deteriorada (*Merluccius merluccius*), em 4 atmosferas diferentes e ar. Após 3 semanas de incubação, o grupo controle (ar) mostrou a maior contagem microbiológica (> 9 Log UFC/ml) e concentração de TMA (45 mg N-TMA /100 ml), fortes odores pútridos foram detectados a partir do 15º dia. O grupo mantido sob atmosfera modificada, mostrou baixo crescimento, TMA, odores anormais e produção de aminas biogênicas. A atmosfera com 40% de CO<sub>2</sub> e 60% de O<sub>2</sub> teve o maior efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, enquanto que a atmosfera composta de 60% de CO<sub>2</sub>, 15% de O<sub>2</sub> e 25% de N<sub>2</sub> foi a menos efetiva.

Estudando o salmão, Fletcher (2002) trabalhou com a espécie *Oncorhynchus tshawytscha* em diferentes atmosferas, contendo ar, nitrogênio e mistura de dióxido de carbono e nitrogênio estocados a uma temperatura de 8 °C, encontrando o primeiro sinal de deteriora com 15 dias para as amostras embaladas em ar, 15 dias nas mantidas em N<sub>2</sub> e 21 dias nas embaladas com a mistura de oxigênio e dióxido de carbono, comprovando a eficiência do dióxido de carbono.

Skandamis (2002) estudou os atributos sensoriais, microbiológicos e físico-químicos de carne fresca embalada em atmosfera modificada e mantida a uma temperatura de 5 a 15 graus Celsius, e apresentou seus resultados de maneira interessante, ordenando as amostras de acordo com a atmosfera empregada e prazo de vida comercial em ordem crescente, encontrando: ar < embalado a vácuo < CO<sub>2</sub> (40%) mais N<sub>2</sub> (30%) mais O<sub>2</sub> (30%) < 80 % de CO<sub>2</sub> mais 20 % de ar < 100% de CO<sub>2</sub>, novamente o CO<sub>2</sub> se destacou como atmosfera de maior eficiência na preservação do alimento.

Bøknæs et al. (2002) estudando o uso da atmosfera modificada em filés de bacalhau descongelados, concluíram que o congelamento por mais de 12 meses não teve efeito significativo sobre os atributos de qualidade e mostrou que a vida comercial da embalagem em atmosfera modificada de produtos descongelados é de 14 dias ou mais a temperatura de 2 °C.

Conte-Júnior et al. (2003) avaliando o efeito do dióxido de carbono na conservação e aumento da vida útil de carne de rã, concluíram que a embalagem em atmosfera contendo 80% CO<sub>2</sub> foi a que aumentou de forma satisfatória a vida útil do produto estudado. Concluindo também que, a embalagem em atmosfera modificada inibiu o crescimento dos microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos, ainda que outros fatores possam ter influenciado neste crescimento.

Özogul et al. (2004) testando o efeito da embalagem de atmosfera modificada e vácuo, sobre as mudanças químicas, sensoriais e microbiológicas em sardinhas mantidas a 4 °C, determinaram que a vida comercial da sardinha em EAM foi de 12 dias, 9 dias no vácuo e 3 dias em ar. O crescimento bacteriano foi mais acelerado nas amostras mantidas em ar, seguido pelas mantidas em vácuo obtendo as contagens mais baixas as mantidas em EAM. A concentração mais elevada de TMA foi obtida nas amostras de sardinha estocadas em ar, seguida das embaladas em vácuo, com a menor concentração em EAM. A formação de BVT cresceu com o decorrer da estocagem. Quando a contagem total atingiu  $10^6$  UFC/g, o valor do BVT foi de aproximadamente 15 mg/100g de músculo para todas as formas de estocagem. Concluiu-se que a estocagem de sardinhas em EAM diminuiu a produção de derivados do ATP, inibiu o crescimento bacteriano, reduziu a formação de histamina, TMA e BVT e estendeu a vida comercial em 4 x na EAM e 3 x na embalagem a vácuo.

Lopes et al. (2004) estudaram o efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) concluindo que do ponto de vista microbiológico, as embalagens enriquecidas com CO<sub>2</sub> demonstraram ser o melhor método. Concluindo ainda, que apesar da inibição do crescimento microbiano ocorrido nas amostras armazenadas em atmosferas com CO<sub>2</sub>, os resultados de bases voláteis totais foram decisivos para definir o prazo de vida comercial.

### 2.4.3 Histamina

Este item abordará a revisão de literatura referente a ocorrência de histamina em pescado, tanto em condições de aerobiose quanto em atmosfera modificada.

#### 2.4.3.1 Formação de Histamina em aerobiose

A intoxicação por escombrídeos é uma enfermidade de baixa severidade, mas muito importante com relação a segurança dos alimentos e comércio internacional. Muitos países aprovaram limites máximos de histamina permitidos em pescado. Entretanto a concentração de histamina nos peixes deteriorados é extremamente

variável, assim como a dose necessária para se instalar a intoxicação. Até que a identidade, níveis e potência ou possíveis potencializadores e ou fatores degranuladores de mastócitos forem elucidados, é difícil estabelecer limites em normas e regulamentos para histamina em alimentos tendo em base o risco potencial a saúde (LEHANE E OLLEY, 2000).

De acordo com os mesmos autores, a histamina é a principal toxina envolvida na intoxicação por escombrídeos. Entretanto, a enfermidade não é uma intoxicação histamínica simplesmente, ainda que, geralmente, esteja associada com altos níveis de histamina (maior ou igual a 50 mg/100g) em peixes de espécies particulares com contaminação bacteriana. A patogênese da intoxicação por escombrídeos ainda não foi completamente elucidada. Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar o porquê da histamina consumida proveniente de peixes deteriorados ser mais tóxica do que histamina pura consumida por via oral. Uma delas sugere que algumas substâncias como compostos imidazólicos derivados da histidina podem ser o “fator obscuro” da intoxicação por escombrídeos. Entretanto, nenhuma provou, até o presente momento, de maneira satisfatória este fato.

Oka et al. (1993) inocularam três bactérias formadoras de histamina (*Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei*) em filés de atum (*Thunnus obesus*), concluindo que a formação de histamina nessa espécie não é atribuída a nenhuma das três. Concluíram também que a atmosfera modificada proporciona somente uma leve inibição sobre as bactérias formadoras de histamina em *Thunnus obesus*.

As bactérias descarboxiladoras da histidina produzem a histamina a partir da histidina livre em peixes em processo de deteriora. Ainda que algumas dessas bactérias estejam presentes na microbiota normal do peixe vivo, a maioria parece ser derivada de contaminação pós captura nos barcos de pesca, da planta processadora, do sistema de distribuição, ou ainda dos restaurantes e domicílios. A chave para manter o número de bactérias e níveis de histamina baixos é o resfriamento do peixe após a captura e sua manutenção em refrigeração adequada durante a sua manipulação e estocagem (LEHANE E OLLEY, 2000).

Lopes-Sabater et al. (1995) reportaram em seu estudo que a presença de histamina não foi detectada nas amostras de atum estocadas a 0 °C, antes do 12º dia de estocagem e que, a partir deste período, a concentração de histamina começou a crescer, atingindo níveis mais altos do que os limites estabelecidos pelo

FDA (50 mg/100 g) no 18º dia de estocagem na parte posterior do peixe, e no dia 21 na parte anterior. Concluindo que quando o atum é mantido em temperatura de refrigeração (8 °C) a formação de histamina continua e a aparência física não é um bom critério para avaliar o perigo de intoxicação, e que isso, poderia explicar a alta incidência deste tipo de intoxicação alimentar.

Lopes-Sabater et al. (1996) determinaram a incidência e diversidade de bactérias que descarboxilam a histidina em atum, bonito e cavala. Encontrando histamina em 83,3% das amostras de atum, em contraste não encontraram em nenhuma amostra de cavala e somente 2 amostras de bonito de 12 mostraram índices detectáveis de histamina. Quanto a composição da microbiota formadora de histamina, *Morganella morganii* e *Klebsiella oxytoca* foram os formadores de histamina mais ativos sob condições experimentais. Alguns novos formadores como *Plesiomonas shigelloides*, *Enterobacter intermedium*, *Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica* e *Serratia fonticola* foram identificados.

Ben-Gigirey et al. (1999) observaram produção de histamina a baixas temperaturas em albacora (*Thunnus alalunga*), onde a temperatura de 4 °C, não foi capaz de inibir a produção de histamina por *Stenotrophomonas maltophilia*.

Kim et al. (2000) amparam o trabalho de Lopes-Sabater et al. (1996) quando isolou bactérias formadoras de histamina a partir da albacora mantida em diferentes temperaturas, isolando a bactéria com maior nível de produção de histamina da amostra mantida a 25 °C, identificando-a como *Morganella morganii*.

#### 2.4.3.2 Formação de Histamina em EAM

A EAM, além de proporcionar uma extensão do prazo de vida comercial do produto, quando se trata de alimentos como o atum, que apresentam risco potencial, ainda possui uma outra atuação altamente desejável, que é a inibição da microbiota que promove a descarboxilação da histidina, prevenindo assim a formação da histamina.

Oka et al. (1993) inocularam bactérias formadoras de histamina (BHF), em filés de atum (*Thunnus obesus*), embalando em aerobiose e atmosfera modificada (CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 60:40%) e concluíram que a embalagem em atmosfera modificada levou a uma ligeira inibição das bactérias formadoras de histamina no atum.

O efeito do CO<sub>2</sub> sobre as BFH, também foi comprovado por Özogul et al. (2001), que investigando as mudanças das aminas biogênicas durante a estocagem do arenque em gelo, em caixas sem gelo (2 ± 2 °C), atmosfera modificada (60% CO<sub>2</sub>, 40% N<sub>2</sub>) e embalagem a vácuo (2 ± 2 °C). Encontraram que a concentração de aminas aumentava de maneira mais acelerada no arenque mantido em caixas sem gelo e mais vagarosamente no mantido em EAM, encontrando a maior dosagem de histamina no arenque nas caixas sem gelo seguido pelo mantido em embalagens a vácuo, mantidos em gelo e em EAM. Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos com relação à histamina no início da estocagem, mais com o decorrer do experimento essa diferença foi constatada, exceto entre a embalagem em vácuo e gelo.

Lópes-Caballero et al. (2001) verificaram estudando o crescimento e metabolismo de *Shewanella putrefasciens* que após três semanas de incubação, altas quantidades de putrescina e cadaverina foram produzidas pelo grupo controle mantido em ar, mas a concentração de histamina somente aumentou de maneira discreta. A produção de histamina e putrescina foi menor no cultivo de *Shewanella putrefasciens* mantido na atmosfera de 40% de CO<sub>2</sub> e 60% de O<sub>2</sub>. Entretanto os níveis de histamina foram maiores na atmosfera de 40% de CO<sub>2</sub> e 40% de O<sub>2</sub> e 20% de N<sub>2</sub> do que na bactéria incubada em ar.

Tendo como material para estudo o salmão (*Salmo salar*), Emborg et al. (2002), estudaram a deterioração e formação de aminas biogênicas, em salmão fresco e descongelado, embalados em atmosfera modificada e mantidos a 2 °C, concluindo que *Photobacterium phosphoreum* foi dominante na deterioração do salmão fresco embalada em EAM, mas mesmo com esses altos níveis de *P. phosphoreum*, menos de 20 mg por kg<sup>-1</sup> de histamina foi observado após o peixe ser considerado deteriorado sensorialmente.

Özogul et al. (2004) testando o efeito da embalagem de atmosfera modificada e vácuo, sobre as mudanças químicas, sensoriais e microbiológicas em sardinhas mantidas a 4 °C, determinaram que a concentração de histamina aumentou e seus níveis atingiram mais de 20 mg/100g para os peixes mantidos em ar, 13 mg/100g para os peixes mantidos em vácuo e 10 mg/100g para os mantidos em atmosfera modificada aos 15 dias de estocagem. Foi concluído que sardinhas mantidas em condições de atmosfera modificada tiveram redução da formação de histamina.

Lopes et al. (2004) estudaram o efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) observando o início da produção de histamina em todas as atmosferas (ar 100%, N<sub>2</sub> 100%, CO<sub>2</sub> 100%, 40/60 e 80/20 % de CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) entre o 8º e 11º dia de estocagem a  $4 \pm 1$  °C, com exceção das amostras mantidas na atmosfera com 100% de CO<sub>2</sub>, onde não foi detectada presença de histamina.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A seguir, descrever-se-á o material utilizado na realização do trabalho, bem como as metodologias empregadas.

#### **3.1 MATERIAL**

Seladora a vácuo da marca TECMAQ, modelo AP 450, utilizada para a embalagem e termo-soldagem das amostras.

Facas higienizadas para segmentação das amostras.

Embalagens plásticas de polietileno com baixa permeabilidade a gases para embalagem das amostras.

Balança de precisão marca Marte, modelo AM 550 Automarte para pesagem das amostras.

Geladeira Electrolux, modelo Double D440 para estocagem das amostras.

Termômetro digital de incisão marca Minipa, para mensurar a temperatura das amostras.

Para a realização da contagem de mesófilos foi utilizado:

Bico de Bunsen

Pinça

Bisturi

Sacos de Stomacher

Balança marca Marte, modelo AS 2000C

O aparelho Stomacher 80 laboratory blender, marca Seward

Tubos de ensaio com tampa metálica

Pipeta automática

Ponteiras descartáveis  
Placas de Petri descartáveis  
Meio de cultura ágar-ágar padrão para contagem (APC)  
Solução Salina (Diluyente)  
Estufa marca Fanem LTDA  
O contador de colônias LEICA, Quebec Darkfield Colony Counter

Dentro das análises físico-químicas realizadas foi determinado o pH das amostras utilizando-se do pHmeter marca Schott, modelo handylab1.

Na determinação das bases voláteis totais (BVT), para obtenção do extrato foi usado:

Balança marca Sartorius, Type 2257  
Ácido tricloroacético P.A. Merck  
Liquidificador  
Frasco de Kitassato  
Funil de Büchner  
Papel filtro Whatman nº 5 sem cinzas  
Beckers

Para difusão das bases voláteis:

Pipetas graduadas de 1, 2, 5 e 10 mL,  
Placas de microdifusão de Conway com tampa,  
Ácido bórico P.A. Vetec,  
Indicador misto de Tashiro (azul de metileno Merck, vermelho de metila Carlo Erba)

Carbonato de potássio P.A. Merck,  
Estufa retilínea marca Fanem a 36 °C.

Para titulação:

Solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L Merck  
Microbureta de 2 mL

Para determinação do teor de histamina presente nas amostras foram utilizados:

Gral

Pistilo

Tubo de ensaio

Metanol P.A Merck

Pinça de metal de ponta fina

Pinça para tubo de ensaio de madeira

Banho-maria

Centrífuga

Cloridrato de histamina – Vetec

Pipetador automático para 10 $\mu$ L

Placa de cromatografia com camada de sílica gel, tamanho 20x20

Acetona P.A Merck

Hidróxido de amônia P.A Merck

Tanque de cromatografia

Vaselina sólida ou silicone

Compressor de ar

Secador de cabelos

Nebulizador para ninhidrina

Ninhidrina – Merck

## 3.2 MÉTODOS

Os métodos serão abordados em sua seqüência de execução começando pela aquisição da amostra, sua preparação e embalagem e por último as análises realizadas.

### 3.2.1 Aquisição da amostra

O pescado foi adquirido no mercado de peixe da Ilha da Conceição, Niterói, conhecido popularmente como 88, onde é possível a obtenção de espécimes com alto grau de frescor e com a menor taxa de contaminação, já que nesse local o

pescado é desembarcado no cais provindo diretamente do porão da embarcação que realizou sua captura, permitindo desta forma, tanto a obtenção de um pescado com muito pouca manipulação, como também, uma seleção dos melhores dos espécimes enquanto estão sendo desembarcados um a um.

### **3.2.2 Transporte**

Após a aquisição do peixe, este foi cuidadosamente acondicionado em caixa de isopor contendo gelo em escamas e selado por intermédio de fita adesiva para minimizar as perdas de temperatura durante o transporte e espera pela colheita das amostras. Desta forma o pescado foi transportado até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Fluminense, onde as amostras foram colhidas e processadas.

### **3.2.3 Colheita das amostras**

Chegando ao laboratório foi retirado o lacre da caixa de isopor contendo a peça de atum e o pescado foi lavado com água hiperclorada 5 ppm, padrão nas indústrias de beneficiamento de pescado, posteriormente sua pele foi escovada para remoção de macroresíduos e sujidades, na tentativa de diminuição da carga de microrganismos na superfície. Após a lavagem, o pescado foi depositado na superfície de uma bancada de mármore, previamente preparada e recoberta por papel alumínio tendo sido higienizada com álcool 70° I.N.P.M. (Figura 4), onde se procedeu a medição da temperatura muscular do mesmo (Figura 5). O corte foi realizado em duas etapas, primeiramente com o auxílio de duas facas de fio aguçado e previamente higienizadas, foram separados e retirados os lombos do animal (Figuras 6 e 7), os cortes realizados para este fim, foram feitos com uma faca teoricamente isenta de contaminação, pois enquanto um corte estava sendo executado a outra faca se encontrava sempre na higienização. Desta forma cada nova incisão no atum foi realizada com uma faca provinda da limpeza.

Os lombos, em número de dois em cada lateral, foram posteriormente submetidos a um segundo corte (Figura 8), acondicionados em embalagens plásticas de baixa permeabilidade e pesados para confecção das amostras (Figura

9), sempre se atentando quanto a possibilidade de contaminação em superfícies e equipamentos, retiraram-se alíquotas do músculo com peso aproximado de 100 g.

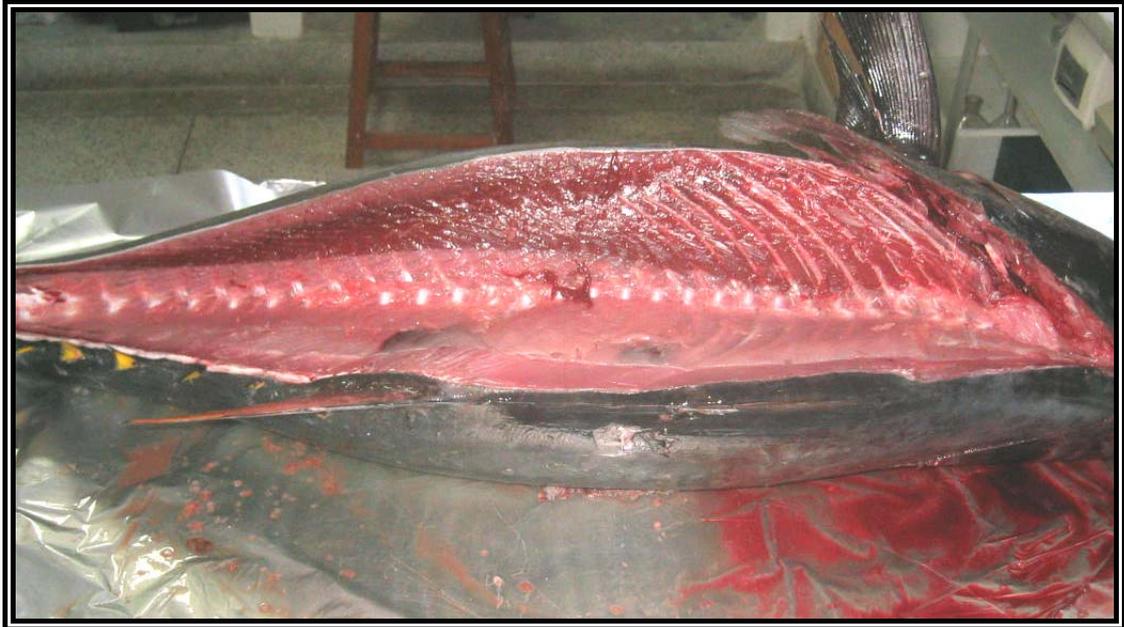
Depois de embaladas, as amostras foram para a seladora (Figura 10), onde foi criado vácuo, retirando o ar presente na embalagem que foi imediatamente substituído por uma mistura de gases pré-determinada. Posteriormente as embalagens foram termo-seladas (Figura 11), ficando assim prontas para serem acondicionadas em temperatura de refrigeração  $2 \pm 2$  °C (Figuras 12 e 13), criando-se desta forma 5 grupos de acordo com a atmosfera empregada, sendo eles: ar atmosférico, vácuo, 40% de CO<sub>2</sub> com 60% de nitrogênio, 80% de CO<sub>2</sub> com 20% de nitrogênio e 100% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 4.** Espécime utilizado no trabalho, já devidamente lavado e depositado sobre mesa previamente higienizada e coberta com papel alumínio.



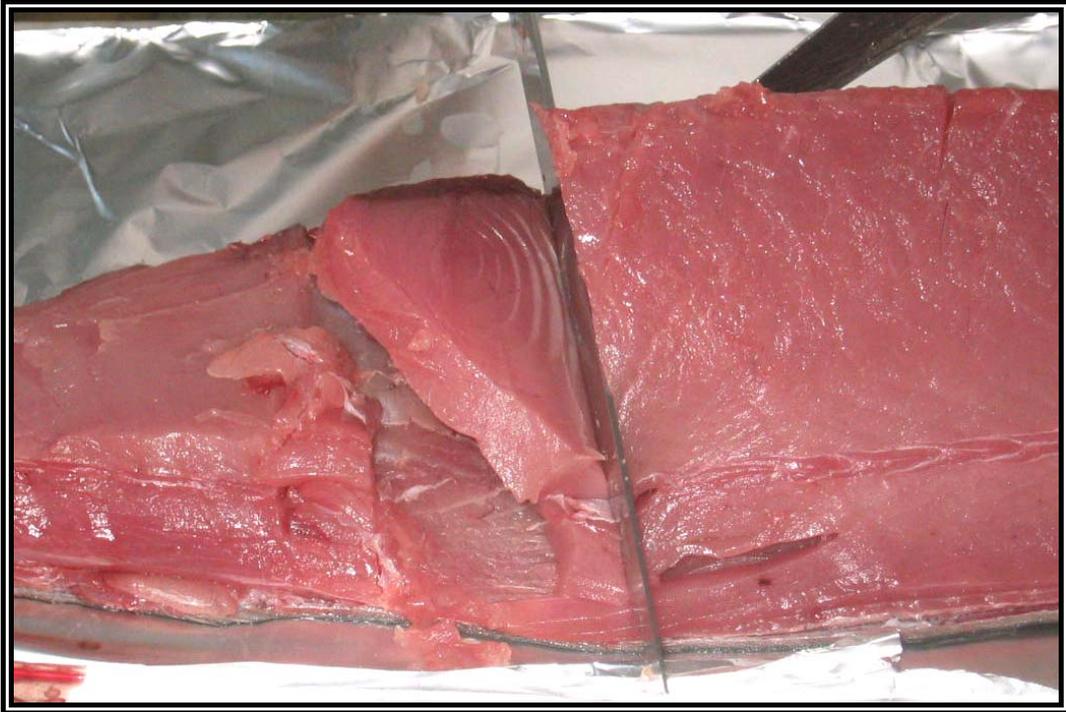
**Figura 5.** Medição da temperatura muscular do pescado com auxílio de termômetro digital de incisão marca Minipa.



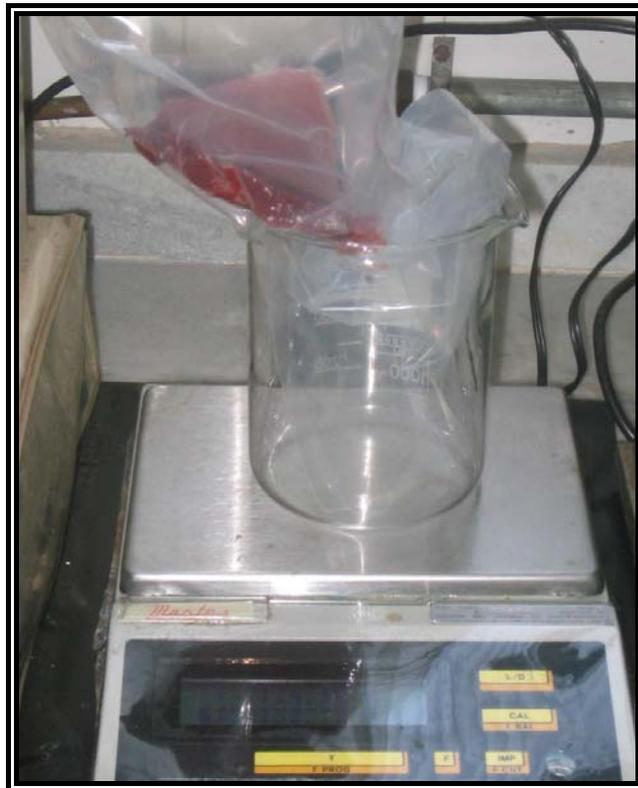
**Figura 6.** Atum utilizado no experimento, com o lombo superior esquerdo retirado.



**Figura 7.** Lombo superior esquerdo retirado do atum pronto para realização dos cortes secundários.



**Figura 8.** Segmentação do lombo do atum para confecção das amostras com peso aproximado de 100 g.



**Figura 9.** Pesagem das amostras já acondicionadas no interior da embalagem plástica com o auxílio da balança de precisão marca Marte, modelo AM 550 Automarte.



**Figura 10.** Embalagem das amostras de atum e confecção das atmosferas na seladora a vácuo da marca TECMAQ, modelo AP 450.



**Figura 11.** Termo-soldagem da embalagem de atum na seladora a vácuo da marca TECMAQ, modelo AP 450.



**Figura 12.** Amostra de atum pronta, devidamente embalada em atmosfera modificada.



**Figura 13.** Amostra de atum pronta, devidamente embalada a vácuo.

### 3.2.4 Identificação das amostras

As amostras foram identificadas por meio de caneta marcadora permanente para plásticos, diretamente na embalagem.

### 3.2.5 Análises

A seguir será exposta a metodologia das análises microbiológicas e físico-químicas executadas no presente estudo.

#### 3.2.5.1 Análises Microbiológicas

Foi realizada a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, a partir das amostras previamente embaladas e estocadas. A metodologia empregada, foi a utilizada pelo Laboratório de Referência Animal (BRASIL, 1981a) utilizando o meio de cultura ágar-ágar padrão para contagem (APC), com incubação a 32 °C e leitura em 24/48 h.

#### 3.2.5.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas assim como as microbiológicas foram realizadas a partir das amostras embaladas e estocadas em refrigeração.

A análise de pH foi realizada pelo método potenciômetro, que se baseia na determinação instrumental do pH (BRASIL, 1981a).

Para a análise de bases voláteis totais, utilizou-se o método de microdifusão de Conway, segundo metodologia descrita no manual do LANARA (BRASIL, 1981a). A determinação foi realizada em duplicata.

Para determinação de histamina utilizou-se o método de análise de histamina por cromatografia de camada delgada (SCHULTZ, 1975).

### 3.2.5.3 Análise estatística

Os resultados obtidos na bacteriologia foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados para obtenção de uma regressão linear, utilizando-se a equação de Baranyi e Roberts (1994) para a determinação dos parâmetros de crescimento (fase de latência e tempo de duplicação) da curva obtida das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas viáveis.

A análise estatística dos demais resultados constou de uma análise descritiva simples, onde se realizou a média dos diversos dados estudados, realizando-se um estudo comparativo, com utilização de Tabelas e Figuras. Para a realização da referida análise estatística descritiva e confecção das Figuras, utilizou-se o programa Microsoft Excel®.

## 4 RESULTADOS

A seguir serão expostos em forma de Tabelas e Figuras os resultados obtidos. Primeiramente serão expostos os resultados das análises físico-químicas e posteriormente das microbiológicas.

### 4.1 BASES VOLÁTEIS TOTAIS

Os resultados relativos a produção das bases voláteis totais a partir das amostras embaladas ou não em atmosfera modificada podem ser vistos na Tabela 1.

Pode-se observar que logo no primeiro dia de estocagem as amostras mantidas em condições de aerobiose, alcançou um valor superior comparado com as outras atmosferas (13,0 mg BVT-N/100 g), continuando a atingir valores girando próximos a este, até o 15º dia de estocagem, quando foi observado um pico de produção, alcançando 16,6 mg BVT-N/100 g, a partir desse ponto, a produção de bases voláteis continuou aumentando, alcançando seu pico máximo no 20º dia de estocagem (27,5 mg BVT-N/100 g).

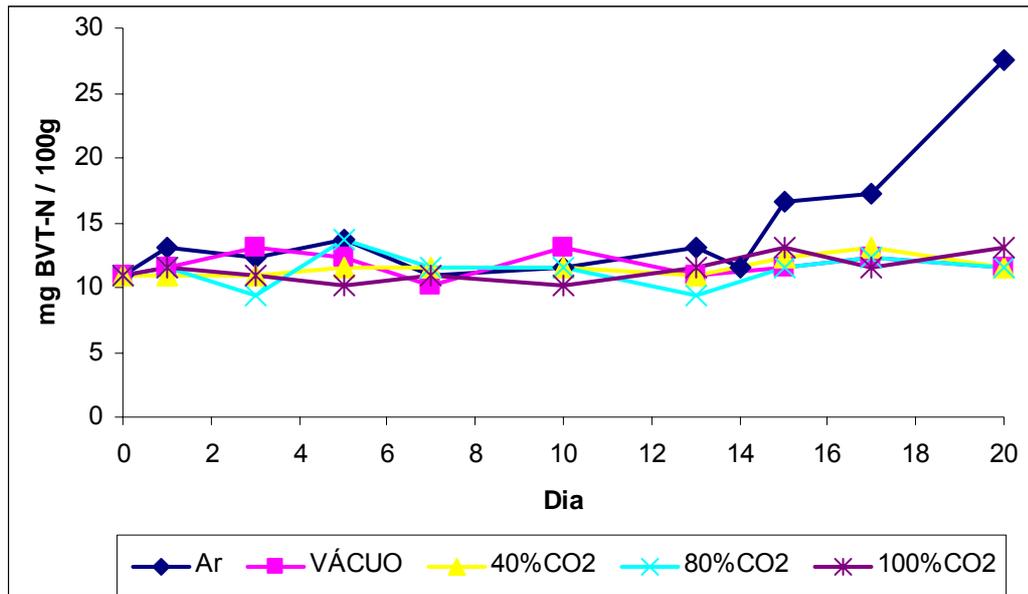
As outras atmosferas mantiveram-se, durante o decorrer do período de estocagem, com valores em torno de 11 mg BVT-N/100 g, apresentando pequenas oscilações, mas não apresentando picos mais expressivos.

**Tabela 1.** Valores médios de mg BVT-N/100 g de amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo, 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	Ar (100%)	VÁCUO	40/60 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	80/20 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> (100%)
0	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9
1	13,0	11,6	10,9	11,6	11,6
3	12,3	13,0	10,9	9,4	10,9
5	13,8	12,3	11,6	13,8	10,1
7	10,9	10,1	11,6	11,6	10,9
10	11,6	13,0	11,6	11,6	10,1
13	13,0	10,9	10,9	9,4	11,6
14	11,6	*	*	*	*
15	16,6	11,6	12,3	11,6	13,0
17	17,2	12,3	13,0	12,3	11,6
20	27,5	11,6	11,6	11,6	13,0

\* - Dados prejudicados

Na Figura 14, observa-se com maior clareza a evolução das bases voláteis totais. Nota-se em todas as atmosferas haver padrão semelhante de produção até o 15º dia de estocagem, mantendo-se constante sem maiores alterações em sua detecção, esta ficando compreendida no intervalo entre 10 e 15 mg BVT-N/100 g. Entretanto, mudanças nos valores observados, ocorreram a partir do 15º dia de estocagem, onde as amostras armazenadas em aerobiose (controle), escapando da tendência mantida pelas outras atmosferas até o final do tempo de estocagem, apresentaram um pico de produção, ultrapassando os 18 mg BVT-N/100 g, continuando a crescer com o decorrer do tempo de estocagem, sendo o valor máximo encontrado de 27,5 mg BVT-N/100 g no 20º dia de estocagem.



**Figura 14** Representação gráfica dos valores médios de mg de BVT-N/100 g de amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo, 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2°C) durante 20 dias.

#### 4.2 pH

Os resultados do pH obtidos para as amostras de atum embaladas ou não em atmosfera modificada podem ser vistos na Tabela 2.

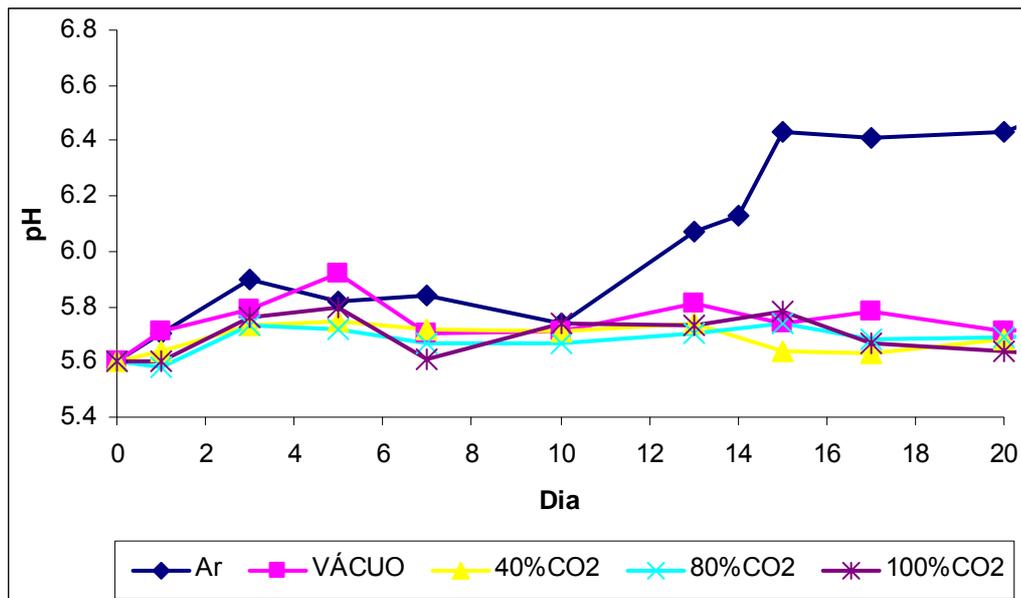
Observa-se que até o 10º dia de estocagem o pH oscilou entre os valores 5,6 e 5,8. Como exceções observamos a atmosfera ar no 3º dia de estocagem e vácuo no 5º dia, que atingiram a faixa de 5,9. A partir do 13º dia de armazenamento, os valores de pH nas amostras embaladas em aerobiose iniciaram uma curva ascendente rumo a faixa de neutralidade de pH, atingindo seu valor máximo (6,43) no 15º dia de estocagem. Nesse mesmo período, as outras atmosferas, mantiveram certa constância, mantendo-se com valores inferiores a 5,81.

**Tabela 2.** Valores médios de pH das amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo, 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração ( $2 \pm 2$  °C) durante 20 dias.

DIA	ATMOSFERA				
	Ar (100%)	VÁCUO	40/60 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	80/20 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> (100%)
0	5,60	5,60	5,60	5,60	5,60
1	5,70	5,71	5,64	5,58	5,60
3	5,90	5,79	5,73	5,73	5,76
5	5,82	5,92	5,75	5,72	5,80
7	5,84	5,70	5,72	5,67	5,61
10	5,74	5,71	5,71	5,67	5,74
13	6,07	5,81	5,74	5,70	5,73
14	6,13	*	*	*	*
15	6,43	5,74	5,64	5,74	5,78
17	6,41	5,78	5,63	5,68	5,67
20	6,43	5,71	5,68	5,69	5,64

\* - Dados prejudicados

Na Figura 15, nota-se com maior clareza, que o pH das amostras mantidas em aerobiose, mostrou um aumento rápido, atingindo valores superiores a 6,0 já no 13º dia de estocagem. Por volta do 20º dia de estocagem, o pH continuava a aumentar e tender a neutralidade (6,43). As amostras embaladas em atmosferas com 40 % de CO<sub>2</sub>, 80% de CO<sub>2</sub>, 100% de CO<sub>2</sub> e a vácuo, demonstraram comportamento semelhante, mantendo certa constância, oscilando pouco em relação ao pH inicial da amostra.

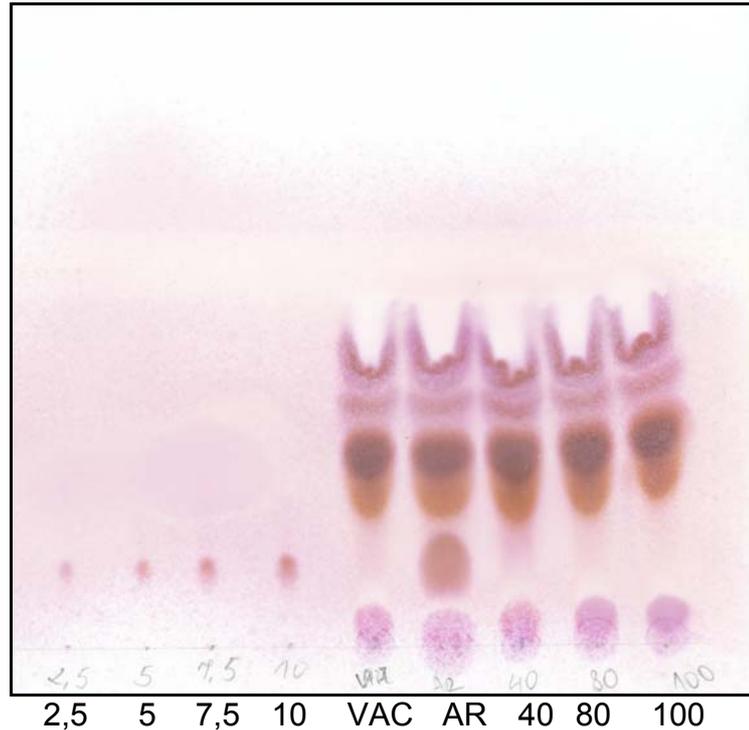


**Figura 15.** Representação gráfica dos valores médios do pH das amostras de atum (*Thunnus albacares*) mantidos em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo, 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias.

### 4.3 HISTAMINA

Com exceção das amostras embaladas sob condições de aerobiose, todas as outras demonstraram índices de histamina não detectáveis durante todo o período de estocagem. As análises realizadas nas amostras mantidas em aerobiose, até o 14º dia de estocagem, da mesma forma que as demais amostras, demonstraram índices de histamina não detectáveis. No 15º dia, porém, foram detectados aproximadamente 10 mg/100 g de histamina formada na musculatura do pescado. Altos índices de histamina continuaram a ser encontrados durante o resto do período de estocagem nas amostras mantidas em aerobiose.

Na Figura 16 observa-se o resultado da cromatografia de camada delgada realizada nas amostras de *T. albacares* no 20º dia estocagem, nota-se com clareza que a formação de histamina foi abundante na amostra mantida em aerobiose, e ausente nas outras atmosferas.



**Figura 16.** Placa de cromatografia das amostras de atum (*Thunnus albacares*) mantidos em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo; 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>; 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, e; 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias.

#### 4.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS

Os resultados das contagens realizadas nas amostras embaladas ou não em atmosfera modificada podem ser vistos na Tabela 3.

Pode-se notar nesta tabela, que as amostras embaladas em aerobiose, a partir do 7º dia de estocagem, começaram a apresentar contagens mais elevadas (5,4 Log de UFC/g), se destacando das demais, esse maior crescimento bacteriológico em relação às outras atmosferas foi mantido até o último dia de estocagem, onde foram encontrados contagens superiores nas amostras mantidas em vácuo e atmosfera com 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, valores acima de 7,0 Log de UFC/g foram encontrados já no 13º dia de estocagem, no 20º dia de estocagem, as amostras mantidas em aerobiose alcançaram seu valor máximo (8,3 Log de UFC/g).

As amostras mantidas em vácuo e em atmosfera com 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, obtiveram contagens próximas durante o decorrer do período de estocagem, ambas ultrapassando o limite proposto de 7 Log de UFC/g no dia 17 (7,3 e 7,6 Log de

UFC/g) vácuo e 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> respectivamente. No último dia de estocagem as duas atmosferas ultrapassaram os valores encontrados para a estocagem em condições de aerobiose, apresentando os valores mais altos encontrados no experimento se comparado a todas as outras atmosferas (8,5 e 8,7 Log de UFC/g).

As atmosferas de 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub> não alcançaram contagens tão altas como as das outras três atmosferas, obtendo contagens inferiores a 6 Log de UFC/g até o dia 17 de estocagem onde foram encontrados os valores 7,2 e 6,6 Log de UFC/g para 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub> respectivamente, a atmosfera com 100% de CO<sub>2</sub> só ultrapassou o limite proposto no último dia de estocagem (7,4 Log de UFC/g).

**Tabela 3.** Valores médios dos logaritmos das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, das amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo, 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração ( $2 \pm 2$  °C) durante 20 dias.

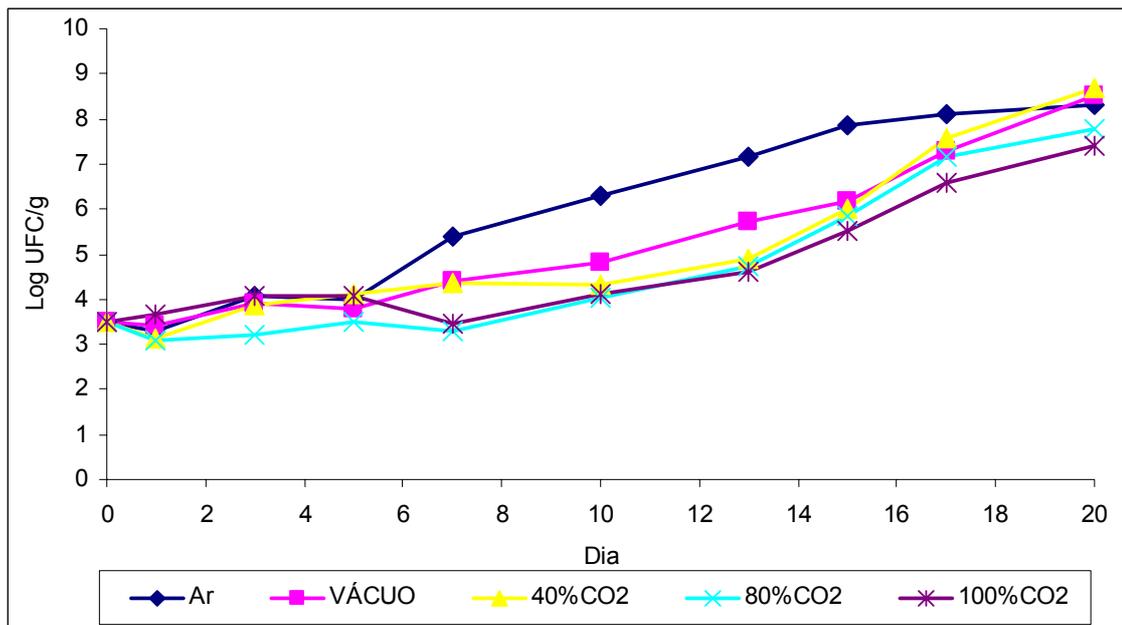
DIA	ATMOSFERA				
	Ar (100%)	VÁCUO	40/60 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	80/20 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> (100%)
0	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
1	3,3	3,4	3,1	3,1	3,7
3	4,1	3,9	3,9	3,2	4,1
5	4,0	3,8	4,1	3,5	4,1
7	5,4	4,4	4,3	3,3	3,4
10	6,3	4,8	4,3	4,0	4,1
13	7,2	5,7	4,9	4,7	4,6
15	7,8	6,2	6,0	5,8	5,5
17	8,1	7,3	7,6	7,2	6,6
20	8,3	8,5	8,7	7,8	7,4

Na Figura 17 nota-se com maior clareza que todas as amostras com exceção daquela contendo 80% de CO<sub>2</sub> obtiveram a representação gráfica de sua curva de crescimento se comportando de maneira semelhante até o 5º dia de estocagem, após isso, o controle (ar) começou a se destacar com um crescimento acelerado da população bacteriana, que no 13º dia de estocagem já era de aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/g. Essa contagem superior se manteve até o 20º dia de estocagem quando foi

novamente alcançada pelo aumento da contagem na atmosfera contendo 40% de CO<sub>2</sub> e na embalagem a vácuo, que mostraram curvas de crescimento similares.

A atmosfera constituída com 80 % de CO<sub>2</sub>, inicialmente, manteve sua contagem com valores baixos, próximos aqueles observados no princípio do experimento, essa tendência foi mantida até o 7º dia de estocagem, após o que, a curva de crescimento começou a descrever uma trajetória ascendente, mantendo-se desta forma até o final do tempo de estocagem, e somente alcançando o valor limite de 10<sup>7</sup> UFC/g por volta do 17º dia de estocagem.

A atmosfera com 100 % de CO<sub>2</sub>, após o 7º dia de estocagem, descreveu uma trajetória bem similar a demonstrada pela atmosfera contendo 80% de CO<sub>2</sub>, porém atingindo valores um pouco mais discretos, só alcançando 10<sup>7</sup> UFC/g no último dia de estocagem.



**Figura 17.** Representação gráfica dos valores médios dos logaritmos das contagens de mesófilos nas amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo, 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias.

Os resultados do tempo de duplicação em dias, fase de latência também em dias e contagem na fase estacionária de crescimento, obtidos pela equação de Baranyi, das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, podem ser observados na Tabela 4.

Nota-se que as amostras embaladas em aerobiose apresentaram o maior tempo de duplicação observado no experimento (0,9 dias), seguida das amostras embaladas a vácuo (0,8 dias), em atmosfera com 100% (0,6 dias), 80% (0,5 dias) e 40% (0,4 dias) de CO<sub>2</sub>.

A menor fase de latência foi observada na estocagem em aerobiose (1,67 dias), seguida pelas amostras embaladas a vácuo (7,55 dias) e em atmosfera modificada com 80% de CO<sub>2</sub> (10,28), a maior fase de latência foi observada nas atmosferas com 40% e 100% de CO<sub>2</sub>, que apresentaram valores muito próximos 11,68 e 11,54 respectivamente.

A atmosfera contendo 40 % de CO<sub>2</sub> apresentou a maior contagem na fase estacionária de crescimento (8,70), seguida pela embalagem a vácuo (8,51) e aerobiose (8,23), as atmosferas contendo 80 e 100% de CO<sub>2</sub> demonstraram os menores valores 7,78 e 7,40 respectivamente.

**Tabela 4.** Valores do tempo de duplicação (TD) em dias, fase de latência (Lag) em dias e contagem na fase estacionária de crescimento (yEND) obtidos pela equação de Baranyi, das contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas, das amostras de atum (*Thunnus albacares*) embalados em aerobiose e em diferentes atmosferas (vácuo, 40/60 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> e 100% CO<sub>2</sub>) e armazenados em refrigeração (2 ± 2 °C) durante 20 dias.

	ATMOSFERA				
	Ar (100%)	VÁCUO	40/60 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	80/20 CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> (100%)
TD	0,9	0,8	0,4	0,5	0,6
Fase LAG	1,67	7,55	11,68	10,28	11,54
yEND	8,23	8,51	8,70	7,78	7,40

## 5 DISCUSSÃO

Nos itens que se seguem, os resultados obtidos nas diferentes análises realizadas serão discutidos com base na literatura compulsada.

### 5.1 pH

O valor de pH inicial das amostras no presente estudo foi de 5,6, o que está em conformidade com a faixa mínima de pH “*post mortem*” citada por alguns autores, que pode variar de 5,4 a 7,2 dependendo da espécie do pescado (GRIKORAKIS et al., 2003), estando de acordo também com outros trabalhos realizados em atum, como o de López-Gálvez et al. (1995), onde o pH inicial das amostras de *T. alalunga* foi de 5,8.

Notou-se, no decorrer do experimento, que os valores de pH das amostras mantidas em aerobiose demonstraram um aumento rápido, atingindo valores superiores a 6,0 já no 13º dia de estocagem. Por volta do 20º dia, observou-se a continuidade do seu aumento (6,43), tendendo à faixa de neutralidade, fato este que pode ser explicado, principalmente, devido ao metabolismo dos microrganismos da decomposição, os quais causam redução do OTMA em TMA, que por sua vez, converte-se em outras bases voláteis, provocando a alcalinidade do meio.

No presente estudo, a correlação da redução do OTMA com conseqüente produção de bases voláteis com o pH, fica perfeitamente visível, ao se analisar os resultados encontrados, observando-se a conexão do aumento dos valores de BVT com o pH.

A mudança de pH observada na estocagem em aerobiose seguiu o mesmo padrão evidenciado por López-Gálvez et al. (1995), que também trabalharam com

atum, onde o aumento máximo de pH foi observado nas amostras armazenadas em aerobiose, que partiu do valor de 5,8 (dia 0) chegando a 7,3 no dia 19 de estocagem. O mesmo comportamento também foi observado por Pastoriza et al. (1998) onde suas amostras controle (ar), mostraram pH de 7,74 após 14 dias de estocagem em gelo, partindo de um pH inicial de 6,74.

Grikorakis et al. (2003) estudaram a deterioração de dourada estocada em gelo. Diferenças significativas entre o pH inicial foram aparentes após o 11º dia de estocagem, para as amostras colhidas no verão, e 15º dia para as colhidas no inverno, encontrando valores de pH de 6,34 e 6,53 após 15 dias de estocagem, valores muito próximos aos encontrados no presente estudo.

As amostras embaladas em atmosferas com 40 % de CO<sub>2</sub>, 80% de CO<sub>2</sub> e 100% de CO<sub>2</sub> demonstraram comportamento semelhante, mantendo certa constância, oscilando pouco em relação ao pH inicial da amostra. Este fato, no presente trabalho, está de acordo com a proposição de que os microrganismos Gram-negativos, oxidase positivos foram inibidos pelo CO<sub>2</sub>, inibindo a produção de BVT e conseqüentemente a elevação do pH. Comportamento semelhante foi observado por Dalgaard et al. (1993) durante a estocagem em atmosferas com baixa concentração de CO<sub>2</sub>, onde houve um incremento dos valores de pH, mas nas atmosferas com altas concentrações de CO<sub>2</sub>, o pH permaneceu constante. Mano et al. (2000) também relataram em seu estudo que as variações de pH foram menores nas atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>, os aumentos dos valores atingiram 0,5 unidades de pH com dificuldade. Ordóñez et al. (2000) observaram no final do experimento o incremento de 0,7 unidades para atmosfera com 20% de CO<sub>2</sub> e 0,4 para 40% de CO<sub>2</sub>. No presente estudo os aumentos de valores de pH não ultrapassaram 0,2 unidades de pH. Entretanto em outros trabalhos, mesmo com o aumento dos valores de BVT, os valores de pH continuaram constantes, fato ocasionado pela difusão do CO<sub>2</sub> no tecido do pescado, gerando formação de ácido carbônico, que produz uma barreira contra o aumento do pH pela produção de bases voláteis, resultando em uma estabilização do pH (DEBEVERE E BOSKOU, 1996; LOPES et al., 2004)

Assim como no presente estudo, Pastoriza et al. (1998) comprovaram o efeito do CO<sub>2</sub> sobre a elevação do pH, em seu estudo, o peixe mantido em EAM, mostrou valores de pH significativamente menores do que o controle em ar, após 10 dias de estocagem.

Tomando-se como instrumento de julgo o pH, de acordo com a legislação brasileira, somente o atum mantido em aerobiose chegou próximo a ser considerado impróprio para o consumo após os 20 dias de estocagem, já que o RIISPOA (1952) no art. 443 diz que, nos peixes, o pH da carne externa deve ser inferior a 6,8 e o da interna inferior a 6,5.

## 5.2 BASES VOLÁTEIS TOTAIS

Observou-se, que as amostras mantidas em aerobiose alcançaram valores superiores quando comparadas com as outras atmosferas. O pico máximo de produção foi observado no 20º dia de estocagem (27,5 mg N/100 g), chegando próximo do limite de aceitação proposto pela legislação brasileira, que é de 30 mg por 100 g de amostra, tanto pelo RIISPOA (1952), quanto pela Portaria nº 185 de 1997 (BRASIL, 1997). Este resultado está em conformidade com o trabalho de Grikorakis et al. (2003), que estudando a preservação da dourada em atmosfera normal, encontraram, após 15 dias de estocagem em gelo, valores para BVT de 25 mg N/100 g.

A grande elevação dos valores de BVT observada na estocagem em aerobiose, saltando de 17,2 mg N/100 g no 17º dia de estocagem para 27,5 mg N/100 g no 20º dia, é explicada pelo fato de que o microrganismo predominante na decomposição de pescados em aerobiose é a *S. putrefaciens* (GRAM et al., 1987; SURENDRAN et al., 1989; JØRGENSEN E HUSS, 1989; GRAM E HUSS, 1996; ORDÓÑEZ et al., 2000), possuidora da capacidade de converter o óxido de trimetilamina (OTMA), abundante em grande parte do pescado de origem marinha, em trimetilamina (TMA), que é um dos principais substratos para produção de bases voláteis, tendo portanto, uma correlação direta com o valor do BVT. Estudando o metabolismo deste microrganismo, só foi observada a conversão do OTMA em TMA a partir de contagens próximas a  $10^7$  UFC/g (JØRGENSEN E HUSS, 1989) estas só obtidas em nosso estudo por volta do 13º dia de estocagem.

A correlação entre os valores de BVT e TMA foi comprovada pelo trabalho de Dalgaard et al. (1993) com filés de bacalhau mantidos em vácuo e EAM. Seus resultados mostraram que o aumento dos valores de BVT seguiu o aumento dos valores de TMA, indicando que pouco ou nenhum  $\text{NH}_3$  foi produzido. O  $\text{CO}_2$  retardou

o aumento das concentrações de TMA. No ponto de rejeição do pescado, foram encontrados valores de 30 mg TMA-N/100 g de amostra (atmosferas contendo 2, 3, 29, 48% de CO<sub>2</sub>), com exceção da embalagem com 97% de CO<sub>2</sub>, onde no ponto de rejeição, os valores estavam em torno de 10 mg de TMA-N/100g de amostra, este fato vem ao encontro dos resultados do presente estudo, onde após 20 dias de estocagem, nas atmosferas contendo 80 e 100 % de CO<sub>2</sub> os valores de BVT ainda se encontravam por volta dos 11 mg de N/100g de amostra. A correlação entre os valores de BVT e TMA também foi comprovada pelo trabalho de Ordóñez et al. (2000), onde o comportamento das bases voláteis totais foi muito similar aos da trimetilamina e os valores de BVT foram muito próximos aos observados para TMA sozinha.

No presente estudo, as outras atmosferas mantiveram-se, durante o decorrer do período de estocagem, com valores em torno de 11 mg N/100 g, apresentando pequenas oscilações e não revelando picos mais expressivos. Esses resultados podem vir a comprovar a eficácia do CO<sub>2</sub> como inibidor do crescimento bacteriano, particularmente efetivo contra as bactérias aeróbias Gram-negativas da decomposição como *Pseudomonas* e *S. putrefasciens* (PARRY, 1993). Pastoriza et al. (1998) comprovaram a eficácia da EAM para controlar os valores de BVT, em seu estudo, os valores de BVT das amostras de filés de merluza mantidas em ar foram 2 vezes superiores aos das amostras mantidas em EAM. O mesmo fato foi observado por López-Gálvez et al. (1995) em filés de atum em temperatura de refrigeração, onde foi percebido que as atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>, inibiram a produção de bases voláteis. Özogul et al. (2004) evidenciaram diferença significativa ( $p < 0.05$ ) nos valores de BVT entre sardinha estocada em ar, vácuo e particularmente em EAM (60% de CO<sub>2</sub> e 40% de N<sub>2</sub>) onde os menores valores de BVT foram alcançados.

López-Gálvez et al. (1995) encontraram um maior aumento dos valores de BVT (aproximadamente 13 mg de N/100 g) no atum embalado em atmosfera modificada com 20% de CO<sub>2</sub> e 80 % de ar, seguido pela estocagem em aerobiose. A atmosfera com melhor desempenho e menor produção, foi a com maior concentração de CO<sub>2</sub> empregada pelo autor (40% de CO<sub>2</sub> e 60 % de O<sub>2</sub>), apresentando valores de 6 mg N/100 g após 20 dias de estocagem, não foram testadas atmosferas com maiores concentrações de CO<sub>2</sub>, que provavelmente obteriam índices ainda melhores quanto a produção das bases voláteis totais.

Entretanto, existem trabalhos (DEBEVERE E BOSKOU, 1996) afirmando que a atmosfera modificada possui um efeito inibitório sobre o crescimento da microbiota, mais precisamente sobre *S. putrefasciens*, produtora normal de H<sub>2</sub>S e TMA, mas uma inibição limitada sobre a produção de BVT e TMA, apontando *Photobacterium phosphoreum* como provável causa dessa elevação, pela sua maior resistência ao CO<sub>2</sub> e alta capacidade de redução do OTMA. Este fato não foi observado no presente estudo, provavelmente pelo microrganismo em questão não ser muito comum em águas tropicais (GRAM E HUSS, 1996), levando a um decréscimo na produção de TMA. Dalgaard (1995) também comprovou a alta capacidade de formação de TMA do *P. phosphoreum* isolado a partir de bacalhau embalado a vácuo e atmosfera modificada, observando que este microrganismo é capaz de produzir 30 vezes mais TMA do que *S. putrefasciens*, encontrando valores de 30 mg de TMA-N/100 g de amostra no ponto de rejeição do pescado.

Jørgensen e Huss (1989) encontraram uma alta correlação entre a contagem de *S. putrefasciens* e a produção de TMA e odores indesejáveis. Surendran et al. (1989) em seus resultados, observaram uma correlação dos valores de TMA com a contagem bacteriológica, o mesmo não acontecendo com os valores de BVT, o autor não dá maiores explicações sobre o fenômeno, que pode ser devido às bases voláteis geradas pela autólise do pescado, fato que foi observado por Lopes et al. (2004) estudando o efeito da EAM em sardinha, onde todas as atmosferas estudadas atingiram valores de BVT de 30 mg N/100 g, mesmo com contagens baixas de microrganismos, sugerindo-se que mesmo nos tratamentos onde houve inibição do crescimento microbiano, ocorreram alterações degradativas, possivelmente devido a processos autolíticos. Entretanto, alguns trabalhos como o de Pastoriza et al. (1998), já afirmam o oposto, mostrando uma grande correlação entre contagem de microrganismos heterotróficos aeróbios mesófilos viáveis e BVT, tanto em peixe mantido em atmosfera normal de ar, quanto em EAM, fato não observado em nosso estudo em que todas as atmosferas se apresentavam impróprias após 20 dias de estocagem considerando-se 10<sup>7</sup> UFC por grama como limite de aceitação, mas nenhuma atmosfera ultrapassou o limite proposto pela legislação brasileira para BVT que é de 30 mg N/100g.

Foi notado que as atmosferas com 40% de CO<sub>2</sub> e vácuo não apresentaram elevações nos valores de BVT, mas suas contagens foram bem expressivas, ambas ultrapassando a faixa de 8,0 Log de UFC/g no 20º dia de estocagem. Fica claro que

o microrganismo presente nessas contagens não é *S. putrefaciens* nem mesmo *P. phosphoreum* que seria resistente a concentrações maiores de CO<sub>2</sub>, e também um potente redutor do OTMA (DALGAARD et al., 1993; DALGAARD, 1995; DEBEVERE E BOSKOU, 1996; GULDAGER, 1998; EMBORG et al., 2002), porém é pouco comum em peixes capturados em águas tropicais. Provavelmente essa alta contagem seja de bactérias ácido-láticas, resultando no decréscimo da produção de TMA e conseqüentemente dos valores de BVT (BANKS et al., 1980 e GRAM E HUSS, 1996), já que esses microrganismos não produzem deteriora, mesmo que seu número seja elevado (SAWAYA et al., 1995). O desenvolvimento de bactérias ácido-láticas em EAM é comprovado por Ordóñez et al. (2000), que encontraram um aumento nas contagens de bactérias ácido-láticas nas atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>. Estas bactérias chegaram a compor 30% da microbiota na atmosfera com 40% de CO<sub>2</sub> e também por Sawaya et al. (1995) que inicialmente encontrou alta porcentagem de *Pseudomonas* (90%) na composição da biota do frango em EAM e após 28 dias este microrganismo representava somente 6% do total de microrganismos enquanto que a proporção de bactérias ácido-láticas aumentou.

Foi observado no presente estudo, certa correlação entre a elevação do pH e o aumento dos valores de BVT, fato que pode ser explicado pela interação entre esses fatores, pois, com a formação de BVT ocorre a alcalinização do meio, e com a alcalinização do meio, existe o favorecimento da atividade das desaminases aumentando a produção de BVT (SOCCOL, 2002).

### 5.3 HISTAMINA

Com exceção das amostras mantidas em aerobiose, todas as outras demonstraram índices de histamina não detectáveis durante todo o período de estocagem. No 15º dia de estocagem foram detectados aproximadamente 10 mg/100g de histamina formada na musculatura do pescado mantido em aerobiose, altas concentrações continuaram a ser encontradas durante o resto do período de estocagem. Esse intervalo para o início da produção de histamina também foi observado por Lopes et al. (2004) em sardinha, onde o início da produção de histamina foi observado em todas as amostras entre o 8º e 11º dia de estocagem e por Lopes-Sabater et al. (1995), em atum, onde não observaram a 0 °C, a presença

de bactérias formadoras de histamina (BFH) antes do 9º a 12º dia de estocagem e presença de histamina formada antes do 12º dia.

O presente estudo demonstrou a eficácia do CO<sub>2</sub> em minimizar o risco da intoxicação histamínica, pois, provavelmente ocorreu a inibição do desenvolvimento da microbiota descarboxiladora da histidina, já que, somente o atum mantido em aerobiose apresentou produção de histamina detectável. A eficácia do CO<sub>2</sub> em inibir o crescimento de bactérias formadoras de histamina (BFH) foi comprovada por Özogul et al. (2004) estudando sardinhas em ar, vácuo e EAM. Seus resultados demonstraram que o menor número de BFH foi encontrado em EAM (60% CO<sub>2</sub> e 40% de N<sub>2</sub>) e por López-Caballero et al. (2001) que encontraram que a concentração final de histamina do pescado usado em seu experimento foi 60 e 70% menor em atmosferas contendo 60 e 40% de CO<sub>2</sub> respectivamente do que o controle em ar.

Özogul et al. (2004) encontraram, após 15 dias de estocagem, valores de 20 mg/100g de histamina para a sardinha armazenada em aerobiose, 13 mg/100g na embalada a vácuo e 10 mg/100g na mantida em EAM (60% CO<sub>2</sub> e 40% de N<sub>2</sub>), novamente demonstrando a inibição que o CO<sub>2</sub> exerce sobre a microbiota formadora de histamina.

Ao contrário do presente estudo, que demonstrou uma forte ação inibitória do CO<sub>2</sub> sobre a biota produtora de histamina, alguns trabalhos como o de Oka et al. (1993) estudando atum, afirmaram que a atmosfera modificada proporciona somente uma leve inibição sobre as bactérias formadoras de histamina.

No presente estudo, mesmo a temperaturas baixas ( $2 \pm 2$  °C) a intoxicação por escombrideos foi um perigo real, merecedor de atenção, tanto por parte dos órgãos de fiscalização, quanto pela indústria de processamento de pescado, pois no 15º dia de estocagem, o peixe mantido em condições de aerobiose, já apresentava índices altos de histamina, atingindo os limites impostos pela legislação vigente. Entretanto, o pH e a produção de BVT permaneciam dentro de limites aceitáveis.

Proposta semelhante foi apresentada por Lopes-Sabater et al. (1995) que concluíram em seu estudo que quando o atum é armazenado em temperatura de refrigeração (8 °C) a produção de histamina continua, e os caracteres sensoriais do pescado não são um bom critério para avaliar o risco potencial para saúde, o que poderia explicar a alta incidência deste tipo de intoxicação. Concluindo também que para prevenir a intoxicação histamínica, o consumidor deveria consumir o atum o mais rápido possível, três dias após a aquisição do produto. A produção de

histamina a temperaturas mais baixas, também já foi demonstrada em outros trabalhos (BEN-GIGIREY et al., 1999; LOPES-SABATER et al. 1995).

As amostras mantidas em condições de aerobiose, de acordo com a legislação brasileira, poderiam ser condenadas pela Portaria nº 185 de 1997 (BRASIL, 1997), que estabelece o nível máximo de histamina tolerado em 100 ppm nos músculos das espécies pertencentes às famílias Scombridae, Scombresocidae, Clupeidae, Coryphaenidae e Pomatidae.

#### 5.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS

Nota-se observando a Figura 17, que a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas (CM) observada nas amostras mantidas em aerobiose, começou a demonstrar valores mais altos a partir do dia 7 de estocagem.

A altas CM observadas nas amostras mantidas em aerobiose foram indicativas do crescimento do microrganismo *S. putrefasciens*, reconhecidamente ativo na deterioração de pescados armazenados sob refrigeração (GRAM et al., 1987; SURENDRAN et al., 1989; JØRGENSEN E HUSS, 1989; GRAM E HUSS, 1996). Sustentando esta afirmação, está o fato de que quando a contagem atingiu valores próximos a  $10^7$ , valor tido como mínimo para início da conversão do OTMA a TMA por este microrganismo (JØRGENSEN E HUSS, 1989), os valores de BVT aumentaram rapidamente.

Embora de maneira mais tardia, as demais atmosferas também sofreram aumentos significativos de suas respectivas CM, todas elas ultrapassando o limite de  $10^7$  UFC/g sem entretanto, apresentarem valores elevados de BVT.

Como a inibição de *S. putrefasciens* pelo  $\text{CO}_2$  é um fato, Lopes-Caballero et al. (2001) afirmam em seus resultados que *S. putrefasciens* foi claramente inibida pela presença do  $\text{CO}_2$  e Dalgaard (1995) conclui que *S. putrefasciens* não apresenta tanta importância na deterioração do bacalhau embalado em EAM e vácuo. E assumindo-se como verdade os trabalhos de Dalgaard et al. (1993); Dalgaard (1995); Debevere e Boskou (1996); Guldager (1998); Bøknæs et al. (2000); Emborg et al. (2002), onde *P. phosphoreum* foi apontado como microrganismo predominante na deterioração de pescado em condições de EAM, pela resistência desta bactéria a concentrações maiores de  $\text{CO}_2$  e também pela alta capacidade redutora do OTMA

(30 vezes maior do que *S. putrefasciens*), seria esperado um aumento proporcional da CM e dos valores de BVT, já que é necessária somente uma contagem de  $10^7$  UFC/g desse microrganismo para produzir valores significativos de TMA (30 mg N/100g) e conseqüentemente BVT e, em nosso trabalho, contagens mais altas foram alcançadas. Entretanto, também é conhecido que a ocorrência desta bactéria é pouco freqüente em peixes capturados em águas tropicais (GRAM E HUSS, 1996). Portanto, em nosso estudo, o aumento da contagem das atmosferas com CO<sub>2</sub> e vácuo foi devido, principalmente, ao crescimento de bactérias ácido-láticas, fato já relatado em outros estudos (BANKS et al., 1980), cujo crescimento mostrou forte correlação com os valores da CM (resultados não apresentados). O que explicaria perfeitamente a manutenção nessas atmosferas dos valores baixos de BVT, apesar das altas contagens observadas, já que de acordo com Sawaya et al. (1995), esses microrganismos não produzem deteriora, mesmo que seu número seja elevado.

Ordóñez et al. (2000) comprovaram o aumento de bactérias ácido-láticas em EAM, encontrando um aumento nas contagens dessas bactérias nas atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>. Essas bactérias chegaram a compor 30% da microbiota encontrada na atmosfera com 40% de CO<sub>2</sub>.

Esse aumento também foi comprovado por Sawaya et al. (1995) que, inicialmente, encontraram alta porcentagem de *Pseudomonas* (90%) na composição da biota do frango em EAM e, após 28 dias, este microrganismo representava somente 6% do total de microrganismos enquanto que a proporção de bactérias ácido-láticas aumentou.

Apesar de Dalgaard et al. (1993) terem afirmado que a ocorrência de bactérias ácido-láticas foi sem importância quantitativa no deteriora dos filés de bacalhau em vácuo e EAM, os resultados do presente trabalho discordam, provavelmente, devido a já comentada diferença entre a microbiota do pescado de águas temperadas e tropicais.

O CO<sub>2</sub> em alta concentração mostrou-se útil para o aumento da vida útil do atum, retardando na atmosfera com maior concentração desse gás (100% de CO<sub>2</sub>) o aparecimento de contagens da ordem de  $10^7$  UFC/g, adotada como limite máximo de aceitação nesse estudo, que só foi observada no 20º dia de estocagem. Esse comportamento vai de encontro com outros trabalhos (ÖZOGUL et al., 2000; ÖZOGUL et al., 2004) onde os resultados encontrados para CM em EAM (60% CO<sub>2</sub>), demonstraram a fase logarítmica da curva de crescimento aparentemente estendida.

Resultados muito semelhantes ao do presente estudo, foram encontrados por Conte-Júnior et al. (2003) onde as amostras submetidas as concentrações de 80 e 100% de CO<sub>2</sub>, apresentaram um significativo aumento da vida útil microbiana do pescado utilizado no estudo, sendo que as demais atmosferas não apresentaram resultados que justificassem o emprego dessa tecnologia.

A efetividade da EAM sobre a CM, foi comprovada por Pastoriza et al. (1998) que notaram em seus resultados que a embalagem em atmosfera modificada preveniu a CM de atingir seu limite de aceitabilidade após 2 semanas de estocagem, e também por Özogul et al. (2004), descrevendo em seus resultados que as bactérias cresceram mais rápido na sardinha estocada em ar, e as menores contagens foram registradas em EAM.

Observou-se também que a embalagem a vácuo apresentou um bom desempenho, semelhante ao encontrado na atmosfera contendo 40% de CO<sub>2</sub>, e se levarmos em conta somente o período de vida comercial comparável também a atmosfera com 80% de CO<sub>2</sub>, esse fato não deixa de realçar o efeito do CO<sub>2</sub> sobre o crescimento bacteriano, pela afirmação de que o oxigênio residual da embalagem é rapidamente consumido pela respiração da carne, sendo substituído por CO<sub>2</sub>, que aumenta no interior da embalagem atingindo concentrações de 10 a 20% (Parry, 1993).

Nosso estudo mostrou forte correlação entre o aumento da fase de latência da curva de crescimento e aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na embalagem. Vários trabalhos ressaltam a capacidade do CO<sub>2</sub> de estender a fase de latência: Mano et al. (2000) afirmam em seu estudo que a fase de latência foi maior nas atmosferas com maior concentração de CO<sub>2</sub> e Lopes et al. (2004) afirmam que os microrganismos mesófilos, nas atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>, apresentaram fases de latência (~5,5 d) superiores aos obtidos nas atmosferas contendo N<sub>2</sub> e ar (aproximadamente 4,0 d). Portanto, estes estudos estão de acordo com os resultados apresentados no presente trabalho.

Em nosso estudo, o tempo de duplicação foi relativamente maior nas amostras mantidas em aerobiose (21,6 horas) e vácuo (19,2 horas) do que nas atmosferas contendo CO<sub>2</sub> (10,6 horas na atmosfera com 40 % de CO<sub>2</sub>). Esse fato aparentemente controverso pode ser explicado pelo fato do CO<sub>2</sub> não retardar o crescimento de todos os microrganismos e, pelo contrário, potencializar o crescimento de outros. Um exemplo disso seriam as bactérias ácido-láticas que tem

seu crescimento incentivado pela presença do CO<sub>2</sub> e níveis baixos de O<sub>2</sub> (Parry, 1993). Fato realmente comprovado pelas altas contagens de bactérias ácido-láticas encontradas em nosso estudo (resultados não apresentados). Entretanto, Mano et al. (2000) concluíram em seu trabalho que as bactérias ácido-láticas não foram afetadas significativamente pelas atmosferas modificadas estudadas, pois o tempo de duplicação foi similar em quase todos os casos, enquanto que a fase de latência usualmente foi maior nas atmosferas enriquecidas com CO<sub>2</sub>, resultados estes que vão de encontro aos resultados do presente estudo.

## 6 CONCLUSÃO E SUGESTÕES

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

- No presente estudo a mistura com 100% de CO<sub>2</sub>, se destacou das demais, apresentando um bom desempenho na preservação do lombo de atum.
- A embalagem a vácuo, embora com desempenho inferior à embalagem em atmosfera modificada com 100% de CO<sub>2</sub>, mostrou ser uma alternativa viável em prolongar a vida comercial do atum fresco a um custo menor.
- As amostras mantidas em atmosfera modificada, apresentaram o prazo de vida comercial estendido, quando comparado com o controle em aerobiose, e ainda, concentrações maiores de CO<sub>2</sub>, proporcionaram maior dilatação do prazo de vida comercial.
- A embalagem em atmosfera modificada foi eficaz para manutenção dos parâmetros físico-químicos dentro dos limites de aceitabilidade propostos pela legislação vigente.
- A embalagem em atmosfera modificada foi capaz de inibir a biota normal de decomposição do pescado, e mesmo em contagens mais altas, em vácuo e 40% de CO<sub>2</sub>, o alimento não sofreu maiores alterações de suas características físico-químicas.
- A intoxicação por escombrideos é um perigo real, merecedor de atenção especial tanto por parte dos órgãos de fiscalização, quanto pela indústria de processamento de pescado.

Sugere-se, de acordo com as conclusões acima e com apoio na literatura compulsada, que:

- Já que não é possível avaliar se o atum sofreu abusos de temperatura e os caracteres sensoriais não são confiáveis, este deve ser consumido rapidamente, visto que ficou provado que a estocagem prolongada em temperatura de refrigeração pode resultar em um rápido aumento da concentração de histamina e um risco potencial a saúde do consumidor.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHIE, I. J.; SMITH, J. P.; SIMPSOM, B. K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, USA, v. 36, n. 1-2, p. 87-121, 1996.

BANKS, H.; NICKELSON, I, R.; FINNE, G. Shelf life studies on carbon dioxide packed finfish from de Gulf of Mexico. *Journal of Food Science*, USA, v. 45, p. 157-162, 1980.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, p. 277-294, 1994.

BARNETT, H. J. et al. A study in the use of high concentration of CO<sub>2</sub> in a modified atmosphere to preserve fresh salmon. *Marine Fisheries Review*, USA, v. 44, n. 3, p. 7-11, 1982.

BEAN, N. H.; GRIFFIN, P. M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles and trends. *Journal of Food Protection*, USA, v. 53, p. 804-817, 1990.

BEN-GIGIREY, B. et al. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, v. 62, n. 8, p. 933-939, 1999.

BØKNÆS, N. et al. Influence of freshness and frozen storage temperature on quality of thawed cod fillets stored in modified atmosphere packing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 33, p. 244-248, 2000.

BØKNÆS, N. et al. Thawed Chilled Barents Sea Cod Fillets in Modified Atmosphere Packaging-Application of Multivariate Data Analysis to Select Key Parameters in Good Manufacturing Practice. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 35, n. 5, p. 436-443, 2002.

BONNATERRE, J. P. Tableau encyclopédique et méthodique des trois règnes de la nature...Ichthyologie. *Tableau Encyclopédique Méthodique Ichthyologie*, Paris, p. 1-125, 1778.

BRASIL. Decreto n° 30691 de 29 de março de 1952, alterado pelo decreto n° 1255 de 25 de junho de 1962, 1.236 de 02 de setembro de 1994, n° 1.812 de 08-de

fevereiro de 1996 e nº 2.244 de 04 de junho de 1997. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília - DF, 7 de julho de 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório 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. 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, 123 p.

BRASIL. Portaria nº 185 , de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 19 de maio de 1997.

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

CODEX ALIMENTARIUS. Código Internacional de Práticas para el pescado [on line]. 1976. Disponível em: <[http://codexalimentarius.net/more\\_info.asp?id\\_sta=117](http://codexalimentarius.net/more_info.asp?id_sta=117)>. Acesso em: 24 dez. 2002.

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

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

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

DALGAARD, P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, v. 26, n. 3, p. 319-333, 1995.

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

EMBORG, J. et al. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 °C. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 4, p. 790-799, 2002.

FERREIRA A. B. H. *Novo Dicionário Aurélio - Século XXI*: Editora Nova Fronteira, 1999. CDROM.

FLETCHER, G. C. et al. Spoilage of King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Fillets Stored under Different Atmospheres. *Journal of Food Science*, USA, v. 67, n. 6, p. 2362-2374, 2002.

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

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

GENNARI M.; TOMASELLI S. Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *International Journal of Food Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 341-347, 1988.

GRAM, L.; TROLLE G.; HUSS, H. H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 65-72, 1987.

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.

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

GULDAGER, H. S. et al. Thawed cod fillets spoil less rapidly than unfrozen fillets when stored under modified atmosphere at 2 degrees C. *Journal of Food Protection*, USA, v. 61, n. 9, p. 1129-1136, 1998.

JØRGENSEN B. R.; HUSS H. H. Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 51-62, 1989.

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

KIM, S. H. et al. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection*, USA, v. 63, n. 2, p. 244-251, 2000.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, v. 58, n. 1-2, p. 1-37, 2000.

LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, J. A.; MORAL, A. Growth and metabolic activity of *Shewanella putrefaciens* maintained under different CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 277-287, 2001.

LÓPEZ-GÁLVEZ, D.; HOZ, L.; ORDÓÑEZ, J. A. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical changes in refrigerated tuna

(*Thunnus alalunga*) steaks. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, USA, v. 43, p. 483-490, 1995.

LOPES-SABATER, E. I. et al. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *International Journal of Food Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 411-418, 1996.

LOPES-SABATER, E. I. et al. Sensory Quality and Histamine Formation During Controlled Decomposition of Tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Food Protection*, USA, v. 59, n. 2, p. 167-174, 1995.

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).

MANO, S. B. et al. Growth/survival of natural flora and *Listeria monocytogenes* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged under modified atmospheres. *Journal of Food Safety*, v. 15, p. 305-319, 1995.

MANO, S. B. et al. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophyla* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, v. 17, p. 657-669, 2000.

MOLIN, G.; STENSTROM, I.M. Effect of temperature on the microbial flora of herring fillets stored in air or carbon dioxide. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 56, n. 2, p. 275-282, 1984.

MUKUNDAN, M. K.; ANTONY, P. D.; NAIR, M. R. A review on autolysis in fish. *Fisheries Research*, v. 4, p. 259-269, 1986.

NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE, FISHERIES STATISTICS AND ECONOMICS DIVISION. [online], USA. Disponível em: <<http://www.st.nmfs.gov>>. Acesso em: 01 de fev. 2004.

OGAWA, M. *Manual da Pesca: Ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430 p.

OKA, S.; ITO, H.; TAKAMA, K. Growth pattern and enterotoxin production of food poisoning bacteria in fish fillets stored under different modified atmospheres. *Bulletin of the Faculty of Fisheries*, Hokkaido University, Japan, v. 43, n. 3, p. 105-114, 1992.

OKA, S. et al. Growth of histamine producing bacteria in fish fillets stored under modified atmospheres. *Bulletin of the Faculty of Fisheries*, Hokkaido University, Japan, v. 44, n. 1, p. 46-54, 1993.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. Microbial and physicochemical modifications of hake (*Merluccius merluccius*) steaks stored under carbon dioxide enriched atmospheres. *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, n. 1, p. 49-57, 2004.

ÖZOGUL, F. et al. Chemical, microbiological and sensory evaluation of Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored in ice, modified atmosphere and vacuum pack. *Food Chemistry*, v. 71, n. 2, p. 267-273, 2000.

ÖZOGUL, F. et al. Changes in biogenic amines in herring stored under modified atmosphere and vacuum pack [online]. Jun. 2001. Disponível em: <[http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/paper\\_6709.htm](http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/paper_6709.htm)>. Acesso em: 30 dez. 2002.

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 on 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.

SAWAYA, W. N. et al. Storage Stability of Chicken as Affected by MAP and Lactic Acid Treatment. *Journal of Food Science*, v. 60, n. 3, p. 611-614, 1995.

SIKORSK, Z. E. *Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*. Florida: CRC Press, 1990. 247 p.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packing conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, n. 1-2, p. 35-45, 2002.

SOCCOL, M. C. H. *Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*), minimamente processada e armazenada sob refrigeração*. Piracicaba, 2002. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

SURENDRAN, P. K. et al. Studies of spoilage of commercially important tropical fishes under iced storage. *Fisheries Research*, v. 7, n. 1-2, p. 1-9, 1989.

SZPILMAN, M. *Peixes Marinhos do Brasil: Guia prático de identificação*. Rio de Janeiro: Instituto Ecológico Aqualung, 2000. 288 p.

TEWARI, G.; JAYAS, D. S.; HOLLEY, R. A. Centralized packaging of retail meat cuts: a review. *Journal of Food Protection*, USA, v. 62, n. 4, p. 418-425, 1999.

U.S. IMPORTS OF FISHERY PRODUCTS ENTERED FOR CONSUMPTION, 2002 OCTOBER. Atuna [online], USA, October 2002. Disponível em: <<http://www.atuna.com/>>. Acesso em: 30 de dez. 2002.