

**Qualidade Nutracêutica, Suscetibilidade Oxidativa e
Formação de Aminas Biogénicas na Muxama
Influência da Tecnologia de Processamento**

Diana dos Santos Vieira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor Carlos Alberto Nunes dos Santos

Coorientador: Doutor António Pedro Louro Martins

Coorientador: Doutora Luísa Cristina Pereira Roseiro

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogal: Doutor Carlos Alberto Nunes dos Santos, Investigador Principal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Orientador.

Vogal: Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de prestar os meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que me apoiaram e que colaboraram de diversas formas de modo a que este projecto se tornasse possível, de especial forma:

Aos meus orientadores, Doutor Carlos Santos e à Doutora Luísa Cristina Roseiro da unidade de Indústrias Cárneas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, pela possibilidade que me concederam de realizar este trabalho, assim como por todo o apoio, compreensão, inteira disponibilidade e orientação prestada.

À Engenheira Helena Gonçalves por toda a disponibilidade, apoio e ensinamentos prestados a nível laboratorial, que tornou possível a realização deste trabalho experimental.

Ao Professor Doutor Pedro Louro, meu co-orientador, pelos contactos que estabeleceu com o INIAV tornando assim possível a realização deste estágio.

Às minhas colegas Ana Catarina Silva e Ana Sofia Salvador pelo apoio, simpatia e boa disposição durante os meses de estágio.

À Ana Rita Lourenço pela ajuda a nível laboratorial, simpatia e apoio.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho e pela oportunidade que me deram tornando tudo isto possível.

Ao meu namorado Diogo Dias pelo amor, carinho, paciência, compreensão, companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

A todos os meus amigos, pelo apoio e amizade.

A todas as pessoas, que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto e que não aparecem aqui especificamente mencionadas.

RESUMO

A muxama é um produto processado de atum de humidade intermédia, sendo a sua produção uma forma de prolongar a conservação de uma matéria-prima extremamente perecível, mantendo-a disponível muito para além da sua época de captura.

Neste trabalho foi avaliada a influência da adição de antioxidantes como o eritorbato, o alecrim e a sálvia, do tipo de salga (vácuo e ao ar) e da adição de nitrito na muxama ao longo do tempo de maturação (após secagem e com 1 e 3 meses de maturação) na taxa de lipólise e proteólise, na suscetibilidade oxidativa, nos teores de compostos bioativos endógenos como as ubiquinonas, os dipéptidos, o α -tocoferol e o β -caroteno e na formação de aminas biogénicas.

Os resultados demonstraram uma influência significativa ($p < 0,001$) dos fatores antioxidante, tipo de salga e adição de nitrito, na oxidação lipídica do produto.

A elaboração deste estudo permitiu concluir que a utilização do processo de salga sob vácuo, a adição de nitrito e a adição de eritorbato como agente antioxidante conduziu a uma menor oxidação lipídica da muxama. Por outro lado, os antioxidantes endógenos que se encontram em maior quantidade no atum são a anserina, a coenzima Q10 (ubiquinona) e o α -tocoferol.

Palavras-chave: muxama, lipólise, proteólise, antioxidantes, aminas biogénicas.

ABSTRACT

Dried tuna it's a processed product with an intermediary humidity, being its production a way to prolong the shelf-life of the tuna wich is very susceptible to oxidation.

In this study case was evaluated the influence of the antioxidants addition, the type of salting (under vacuum or at open air) and the nitrite addition in dried tuna with maturation (after drying, with 1 month and 3 months of maturation) in rates of lipolysis, poteolysis, in susceptibilty to oxidation, in its concentration of endogenous antioxidants such as ubiquinones, dipeptides, α -tocopherol and β -carotene and in formation of biogenic amines.

The results demonstrated an significative influence ($p < 0,001$) of the antioxidant factor, type of salting and nitrite addition in the product oxidation.

The elaboration of this study culminated in a conclusion that the use of under vaccum conditions during the salting process, the addition of nitrite and the addition of a chemical antioxidant led to a less lipidic oxidation of the dried tuna. On the other hand, the endogenous antioxidants present in higher concentrations in the tuna used in this study were anserine, coenzyme Q10 and α -tocopherol.

Key-words: Dried tuna, lipolysis, proteolysis, antioxidants, biogenic amines.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
ÍNDICE GERAL	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Breve caracterização do sector das pescas em Portugal.....	17
2.2 Muxama	19
2.3 Processo Produtivo	21
2.3.1 Salga	21
2.3.2 Pós-salga.....	22
2.3.3 Secagem e Maturação.....	22
2.4 Tecnologia de barreiras na produção de muxama.....	23
2.5 Atributos nutracêuticos do atum	25
2.5.1 Colesterol.....	25
2.5.2 Vitamina E	26
2.5.3 β -Caroteno.....	28
2.5.4 Péptidos.....	29
2.5.6 Ubiquinonas (Coenzima Q).....	31
2.5.7 Aminoácidos	32
2.6 Suscetibilidade para o desenvolvimento de processos oxidativos e formação de aminas biogénicas.....	34
2.6.1 Oxidação lipídica.....	34

2.5.2	Aldeído malónico	36
2.6.3	Aminas Biogénicas	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Delineamento experimental	40
3.2	Preparação da amostra	41
3.3	Determinação da Humidade	41
3.4	Determinação do pH	42
3.5	Determinação da atividade da água	42
3.6	Determinação dos cloretos	42
3.7	Determinação do azoto dos aminoácidos livres	43
3.8	Determinação da gordura total	43
3.9	Determinação da Acidez	44
3.10	Determinação do aldeído malónico	44
3.11	Determinação das coenzimas Q9 e Q10	45
3.12	Determinação dos dipéptidos bioativos e creatina	47
3.13	Determinação Tocoferol, β -caroteno e colesterol	48
3.14	Determinação das aminas biogénicas	49
3.15	Cálculo dos Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)	50
3.16	Taxa de recuperação	50
3.17	Análise estatística	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Otimização do método de extração das coenzimas Q9 e Q10	52
4.2	Determinação das curvas padrão	53
4.3	Validação dos métodos cromatográficos	53
4.5	Ensaio 1 – Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação	54
4.5.1	Cloretos	54
4.5.2	Azoto dos Aminoácidos livres	55
4.5.3	Gordura	56
4.5.4	Acidez	57

4.5.5 Aldeído Malónico	58
4.5.6 Coenzimas.....	59
4.5.7 Péptidos de cadeia curta.....	60
4.5.8 α -Tocoferol	62
4.5.9 β -Caroteno.....	63
4.5.10 Colesterol.....	64
4.5.11 Aminas Biogénicas	65
4.6 Ensaio 2 – Influência da salga a vácuo e ao ar, com e sem adição de nitrito ao longo do tempo de maturação	68
4.6.1 Cloretos	68
4.6.2 Azoto dos Aminoácidos livres	69
4.6.3 Gordura	70
4.6.4 Acidez.....	71
4.6.5 Aldeído Malónico	73
4.6.6 Coenzimas.....	74
4.6.7 Péptidos de cadeia curta.....	75
4.6.8 α -Tocoferol	77
4.6.9 β -Caroteno.....	78
4.6.10 Colesterol.....	79
4.6.11 Aminas Biogénicas	80
5 CONCLUSÃO	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
7 ANEXOS.....	94
7.1 Curvas padrão dos diferentes compostos analisados	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Total de toneladas de peixes descarregados nas últimas décadas, 1970-2010.	17
Tabela 2 - Percentagem da utilização das quotas de pesca nacional de 2011-2014 ..	18
Tabela 3 - Aminas Biogénicas formadas nos alimentos e respetivos aminoácidos precursores.....	38
Tabela 4 - Equações da reta e respetivos coeficientes de correlação de cada composto analisado.	53
Tabela 5 - Taxa de recuperação, limites de deteção e de quantificação de cada composto analisado.	54
Tabela 6 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de cloretos nas diferentes amostras do Ensaio 1	55
Tabela 7 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aminoácidos livres nas diferentes amostras do Ensaio 1.....	56
Tabela 8 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de acidez nas diferentes amostras do Ensaio 1.	58
Tabela 9 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aldeído malónico nas diferentes amostras do Ensaio 1.....	59
Tabela 10 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de conzimas Q9 e Q10 nas diferentes amostras do Ensaio 1.....	60
Tabela 11 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de dipéptidos nas diferentes amostras do Ensaio 1.	62
Tabela 12 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de α -tocoferol nas diferentes amostras do Ensaio 1.	63
Tabela 13 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de β -caroteno nas diferentes amostras do Ensaio 1.	64

Tabela 14 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de colesterol nas diferentes amostras do Ensaio 1.	64
Tabela 15 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor das diferentes aminas biogénicas nas diferentes amostras do Ensaio 1.	67
Tabela 16 - Índice de aminas biogénicas para cada amostra do Ensaio 1.....	68
Tabela 17 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de cloretos nas diferentes amostras do Ensaio 2.	69
Tabela 18 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aminoácidos livres nas diferentes amostras do Ensaio 2.....	70
Tabela 19 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de gordura nas diferentes amostras do Ensaio 2.	71
Tabela 20 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de acidez nas diferentes amostras do Ensaio 2.	72
Tabela 21 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aldeído malónico nas diferentes amostras do Ensaio 2.....	74
Tabela 22 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de coenzimas nas diferentes amostras do Ensaio 2.	75
Tabela 23 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor dos dipéptidos nas diferentes amostras do Ensaio 2.....	76
Tabela 24 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de α -tocoferol nas diferentes amostras do Ensaio 2.	78
Tabela 25 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de β -caroteno nas diferentes amostras do Ensaio 2.	79

Tabela 26 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de colesterol nas diferentes amostras do Ensaio 2. 80

Tabela 27 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aminas biogénicas nas diferentes amostras do Ensaio 2..... 82

Tabela 28 - Índice de aminas biogénicas para cada amostra do ensaio 2. 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Captura do atum no ano de 2014.....	17
Figura 2 - Distribuição das quotas de pesca por espécie de atum, em Portugal continental e ilhas (toneladas) de 2001-2014.....	18
Figura 3 - Salada de muxama	19
Figura 4 - <i>Thunnus obesus</i>	19
Figura 5 - Distribuição geográfica da captura do atum "Bigeye"	20
Figura 6 - Representação da 1ª categoria (A) e categoria extra (B).	20
Figura 7 - Processo de salga da muxama.	22
Figura 8 - Processo de secagem e maturação.	23
Figura 9 - Estrutura química do colesterol.....	25
Figura 10 - Estrutura do tocoferol.....	26
Figura 11 - Estrutura do tocotrienol.	27
Figura 12 - Estrutura química do β -caroteno.	28
Figura 13 - Estrutura química da creatina, carnosina e anserina, respetivamente.....	29
Figura 14 - Estrutura química da ubiquinona e do ubiquinol, respetivamente.....	31
Figura 15 - Estrutura geral dos aminoácidos.....	32
Figura 16 - Processo de oxidação lipídica.....	35
Figura 17 - Estrutura química do aldeído malónico.	36
Figura 18 - Cromatograma da solução padrão do Aldeído Malónico.	45
Figura 19 - Cromatograma da solução padrão das coenzimas.	46
Figura 20 - Cromatograma da solução padrão dos dipéptidos.	47
Figura 21 - Cromatograma da solução padrão do α -tocoferol.	48
Figura 22 - Cromatograma da solução padrão do β -caroteno.	49
Figura 23 - Cromatograma da solução padrão do colesterol.	49
Figura 24 - Cromatogramas dos diferentes procedimentos testados para o estudo de optimização de extração das coenzimas.....	52
Figura 25 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de cloretos.....	54
Figura 26 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de aminoácidos livres.	55
Figura 27 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de gordura.	56

Figura 28 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de acidez.	57
Figura 29 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de aldeído malónico.....	58
Figura 30 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, nos teores de conzimas Q9 e Q10.	59
Figura 31 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor dos diferentes dipéptidos.....	61
Figura 32 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de α -tocoferol.....	62
Figura 33 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de β -caroteno.....	63
Figura 34 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de colesterol.	64
Figura 35 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor das diferentes aminas biogénicas.....	66
Figura 36 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de cloretos.....	68
Figura 37 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de aminoácidos livres.	69
Figura 38 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de gordura.	71
Figura 39 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de acidez.....	72
Figura 40 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de aldeído malónico.	73
Figura 41 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de conzimas.	74
Figura 42 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de péptidos bioativos.....	75
Figura 43 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de α -tocoferol.	77
Figura 44 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de β -caroteno.	78
Figura 45 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de colesterol.	79

Figura 46 - Influência da salga a vácuo e ao ar e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de aminas biogénicas.....	81
Figura 47 - Curva padrão do Aldeído Malónico	94
Figura 48 - Curva padrão da Coenzima Q9.....	94
Figura 49 - Curva padrão da Coenzima Q10.....	94
Figura 50 - Curva padrão da Anserina.	95
Figura 51 - Curva padrão da Carnosina.	95
Figura 52 - Curva padrão da Creatina.....	95
Figura 53 - Curva padrão do α -tocoferol.	95
Figura 54 - Curva padrão do β -caroteno.	96
Figura 55 - Curva padrão do Colesterol.	96
Figura 56 - Curva padrão da Triptamina.....	96
Figura 57 - Curva padrão da Feniletilamina.	96
Figura 58 - Curva padrão da Putrescina.....	97
Figura 59 - Curva padrão da Cadaverina.	97
Figura 60 - Curva padrão da Histamina.....	97
Figura 61 - Curva padrão da Tiramina.	97
Figura 62 - Curva padrão da Espermidina.....	98
Figura 63 - Curva padrão da Espermina.	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

FAO – Food and Agriculture Organization

HDL – High-Density Lipoprotein

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)

IAB – Índice de aminas biogénicas

INE – Instituto Nacional de Estatística

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

LD – Limite de deteção

LDL - Low-Density Lipoprotein

LQ – Limite de quantificação

n.s – Não significativo

VIH – Virus das Imunodeficiência Humana

VLDL - Very Low-Density Lipoprotein

1. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

O presente trabalho foi elaborado no âmbito da Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar ministrado no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, tendo o estágio sido realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV).

O consumo de carne tem desempenhado, desde sempre, um papel fundamental na evolução da humanidade como componente central de uma dieta equilibrada e saudável, em virtude da sua riqueza nutricional, nomeadamente de proteína de elevado valor biológico, ferro, vitaminas do complexo B (B12), vitaminas A e E, zinco, selénio e fósforo (Higgs, 2000). Porém, o teor de gordura e o perfil dos ácidos gordos a esta habitualmente associados, representam motivos de preocupação recente em virtude da crescente urbanização das sociedades e da alteração dos hábitos sociais e alimentares daí decorrente (Pereira & Vicente, 2013). Como alternativa no reino animal, a maioria das espécies de peixe e outras espécies marinhas vêm detendo uma crescente importância económica em muitos países, seja para consumo em fresco seja após processamento simples (congelação) ou mais elaborado (produtos crus salgados de humidade intermédia, conservas, etc).

Oitenta por cento da massa muscular do peixe, isenta de gordura e humidade, consiste em proteína, em cuja composição constam aminoácidos essenciais de elevada digestibilidade (Kim & Lall, 2000). Acresce o facto da massa muscular do peixe também apresentar ácidos gordos polinsaturados n-3 (n-3 PUFA), neles se incluindo os ácidos eicosapentanoico (EPA – C20:5, n-3) e docosahexanoico (DHA – C22:6, n-3), ambos possuindo actividades anti-cancerígena, protectora do sistema cardiovascular e anti arterioesclerótica (Albert *et al.*, 2002). Porém a sua composição surge extremamente variável, influenciada por vários fatores, de que se destacam a espécie, o local e estação de captura e o grau de maturidade (Zuraini *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Ozogul & Ozogul, 2007).

Para além da sua excelente vocação para a indústria conserveira, o atum tem, igualmente, visto aumentado o consumo em fresco /congelado. Com tradição imemorial no nosso espaço geográfico, a produção de muxama, um produto salgado de humidade intermédia, fumado ou não, processado a partir de músculo de atum, representa uma oportunidade para a indústria de transformação de acrescentar variedade e valor de forma significativa e também prolongar a sua oferta fora da época de captura desta espécie de peixe, com cambiantes possíveis nos respectivos atributos sensoriais.

O presente estudo foi delineado com o objetivo de detalhar aspetos da composição físico-química/bioquímica da massa muscular do *Thunnus obesus* capturado no mar dos Açores e acompanhar a respetiva suscetibilidade quando transformada em muxama com recurso a diferentes abordagens tecnológicas, nomeadamente: 1- salga a seco ao ar ou em embalagem a vácuo; 2- salga com ou sem agentes nitrificantes. Esta avaliação foi efetuada ao longo do processamento e em muxama imediatamente após a conclusão da secagem (produto final) e depois de observadas fases de maturação desenvolvida sob vácuo a 0-4°C durante 1 e 3 meses. Para além da análise de uma gama alargada de compostos bioactivos naturais com atividade antioxidante (α -tocoferol, carotenoides, creatina, carnosina e anserina, Co-enzimas Q9 e Q10), determinaram-se as taxas de lipólise (acidez da gordura) e proteólise (fração azotada dos ácidos aminados livres) e da fracção lipídica (aldeído malónico) e ainda a propensão para a formação de aminas biogénicas (triptamina, tiramina, fenilatilamina, putrescina, cadaverina, histamina, espermina e espermidina).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve caracterização do sector das pescas em Portugal

Desde a pré-história que os produtos de pesca representam um papel importante na alimentação humana. Para além deste importante aspeto de subsistência humana, a pesca também representa um papel importante na economia.

O consumo de produtos de pesca e aquacultura em Portugal é um dos mais elevados da Europa, atingindo um consumo *per capita* de aproximadamente 57,1 kg/habitante/ano. No entanto, a produção pesqueira nacional tem sofrido ao longo das últimas décadas, um declínio acentuado (Tabela 1), facto este que se deve à necessidade de uma gestão de recursos e do meio marinho mais eficaz, equilibrada e sustentada (INE, 2011).

Tabela 1 - Total de toneladas de peixes descarregados nas últimas décadas, 1970-2010 (dados INE).

	1970	1980	1990	2000	2010
Pesca descarregada (Ton)	365.423	271.508	309.929	166.083	172.583

Devido ao elevado consumo de produtos da pesca, Portugal não consegue ser autossuficiente, consumindo mais do que aquilo que captura levando a um grau de autoaprovisionamento relativamente baixo, sendo em 2012 de 44,9% (EA, 2014). Dados mais recentes mostram que este número continua a baixar, uma vez que em 2014, as importações de produtos da e derivados sofreu um acréscimo de 8,7% relativamente a 2013 (INE, 2014).

O atum em Portugal é maioritariamente capturado (Figura 1) na Madeira (54%), seguida dos Açores (37%) (INE, 2014).

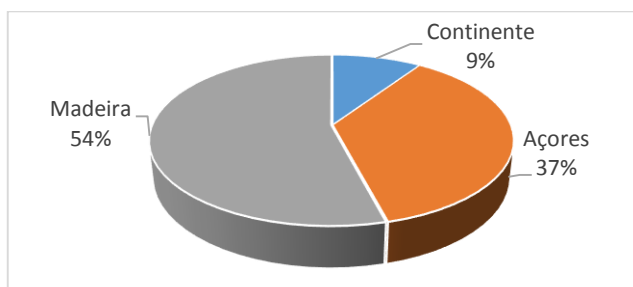


Figura 1 - Captura do atum no ano de 2014 (INE, 2014)

A distribuição das quotas de pesca por espécie de atum em Portugal e nas ilhas entre os anos de 2011-2014 (Figura 2) evidencia o atum-patudo (*Thunnus obesus*), como a espécie alvo do maior nível de captura autorizado com valores 2 vezes superiores aos permitidos ao atum voador (*Thunnus alalunga*). Com níveis de captura significativamente inferiores surge por último o atum rabilho (*Thunnus thynnus*) (INE, 2012; INE, 2013; INE, 2014; INE, 2015a).

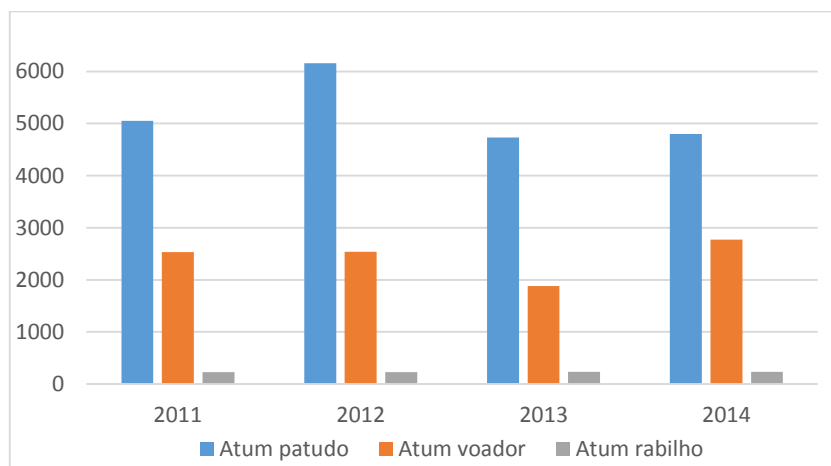


Figura 2 - Distribuição das quotas de pesca por espécie de atum, em Portugal continental e ilhas (toneladas) de 2001-2014 (Dados: INE, 2015)

Na tabela 2, consta a utilização das respetivas quotas de pesca para cada espécie, sendo praticamente todas utilizadas para os atuns patudo e voador (INE, 2012; INE, 2013; INE, 2014; INE, 2015a).

Tabela 2 - Percentagem da utilização das quotas de pesca nacional de 2011-2014 (Dados: INE)

	2011	2012	2013	2014
Atum Patudo	102	99	91	83
Atum Voador	95	0	99	100
Atum Rabilho	50	54	32	81

2.2 Muxama

A muxama é um produto com mais de 2000 anos, que remonta às civilizações Fenícia e Romana, tratando-se de um produto curado/maturado cru de humidade intermédia, preparado a partir da musculatura do atum. Este produto é tradicionalmente consumido nas zonas mediterrâneas e também no Algarve, no sul de Portugal, uma região com características edafo-climáticas muito próximas.



Figura 3 - Salada de muxama

A produção de muxama representou nos primórdios uma forma de prolongar a conservação de uma matéria-prima extremamente perecível, mantendo-a disponível muito para além da época de captura. Com a evolução registada no conhecimento científico inerente ao processamento deste tipo de produto e o desenvolvimento de tecnologias modernas assente em equipamentos sofisticados e versáteis, esta matéria-prima de enorme potencial nutracêutico, tem proporcionado à indústria da muxama importantes oportunidades de sofisticação sensorial e com enorme valor acrescentado.

Inicialmente, a produção de muxama era baseada no atum rabilho (*Thunnus thynnus*) cuja captura é maioritariamente realizada no oceano pacífico e no mar mediterrâneo. No entanto, com o aumento da sua popularidade no mercado do atum fresco japonês para a produção de “sashimi” e “sushi”, tornou-se uma espécie sobrevalorizada e, por esta razão também sobreexplorada, fazendo com que os produtores de muxama procurassem outras espécies para este efeito, nomeadamente o *Thunus obesus*, conhecido em Portugal como atum patudo (Figura 4).

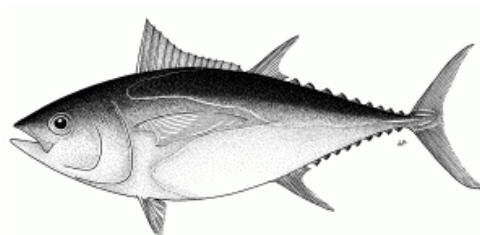


Figura 4 – Atum patudo (*Thunnus obesus*) (Fonte: FAO)

O atum patudo, pertence à família Scombridae, constituída por 4 géneros (*Thunnus*, *Katsuwonus*, *Euthynnus* e *Auxis*), que incluem um total de 14 espécies.

Apesar de muito parecido ao atum albacora (*Thunnus albacares*), o atum patudo (*Thunnus obesus*) diferencia-se fenotipicamente deste, devido ao seu grande olho, sendo espécies parecidas em termos de população e de popularidade. O atum patudo é maioritariamente capturado no oceano Pacífico oriental e ocidental, no oceano Índico, e minoritariamente no Oceano Atlântico (Figura 5), sendo que a sua musculatura apresenta características físico-químicas e tecnológicas desejáveis para a produção de muxama. Para este efeito, promoveu-se a sua diferenciação em três categorias: extra; 1ª categoria e 2ª categoria (Figura 6) As duas categorias mais valiosas são obtidas da parte central do lombo, sendo a extra posicionada dorsalmente à linha média.

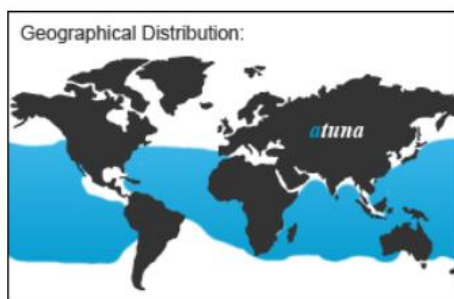


Figura 5 - Distribuição geográfica da captura do atum patudo (*Thunnus thynnus*).



Figura 6 - Representação da 1ª categoria (A) e categoria extra (B).

2.3 Processo Produtivo

A produção de muxama a partir dos lombos de atum limpos e aparados é dividida em três fases: a salga/cura; a pós-salga/uniformização dos aditivos utilizados e a secagem/maturação. No entanto com a alteração da espécie de atum utilizada e consequentemente a mudança geográfica das zonas de captura, a matéria-prima é adquirida congelada pela indústria. Esta alteração é vantajosa para este tipo de processamento, uma vez que a destruição parcial da estrutura das paredes celulares pelos cristais de gelo, durante a congelação, permite realizar uma difusão dos sais mais rápida e assim facilitar a saída dos fluidos, fazendo com que o a_w , um dos pilares básicos da conservação, seja reduzido de forma mais rápida. Para além disso as perdas de água durante a descongelação é uma forma menos onerosa, quando comparada com a efetuada durante a secagem.

2.3.1 Salga

A salga é um dos métodos de conservação de alimentos mais antigos, sendo que a sua aplicação em produtos da pesca remonta às civilizações do Antigo Egito e da Mesopotâmia, há 4 mil anos a.c. Presentemente, para além do sal (NaCl) são utilizados outros, poucos, aditivos por forma a facilitar a concretização das barreiras em que assenta a sua conservação. Basicamente, o nitrito de sódio e o ascorbato ou eritorbato de sódio. O nitrito é utilizado na formação da cor característica (nitrosomioglobina), do flavor e atua especialmente como agente importante na definição da barreira ao desenvolvimento bacteriano nesta fase ainda crítica do processamento. O ascorbato/eritorbato atua como agente estabilizador da cor entretanto formada, aumentando o nível de redução do nitrito a óxido nítrico (NO) e a consequente formação de nitrosomioglobina.

Nesta fase do processo é essencial garantir uma distribuição correta dos aditivos e especiarias por todo o lombo de atum, para obtenção da necessária uniformidade em termos de estabilidade química e microbiológica, de modo a que estas sejam garantidas no produto final. A adição de cloreto de sódio a produtos curados deve-se principalmente à sua função como agente bacteriostático, sendo capaz de reduzir a atividade da água (a_w), aumentando a pressão osmótica do alimento e inibindo assim o crescimento microbiano. Para além dos seus efeitos microbiológicos, o cloreto de sódio produz outros efeitos nos produtos curados como: alterações organoléticas e de textura. Porém, a diminuição da atividade proteolítica e a promoção da rancificação lipídica são outras funções a ter em linha de conta.

O processo de salga utilizado na produção da muxama é a salga em seco, onde todo o lombo é envolto em sal. Durante esta fase, os lombos são colocados em câmaras com temperatura e humidade relativa controlada, sendo que para uma melhor penetração do sal, os lombos devem ser voltados pelo menos uma vez de modo a haver uma melhor penetração do sal. A rapidez da difusão dos aditivos dependerá em larga medida da concentração utilizada, da espessura da peça, da presença/ausência de barreiras naturais (aponevroses e bainhas de tecido conjuntivo internas) e da presença de gordura inter e intramuscular. A gordura com elevado grau de insaturação reduz a taxa de difusão uma vez que se caracteriza por possuir grande quantidade de tecido conjuntivo. Também a embalagem a vácuo facilita a difusão dos sais através da musculatura. A temperatura das câmaras varia entre os 0-4°C, o que permite uma adequada difusão do sal através do músculo e uma inibição da microbiota, permitindo, ainda, evitar a desidratação excessiva da superfície.



Figura 7 - Processo de salga da muxama.

2.3.2 Pós-salga

A etapa de pós-salga consiste numa etapa de repouso, visando a igualização de todos os aditivos adicionados em toda a musculatura, sendo por vezes necessário remover o excesso de sal residual da superfície externa do lombo. Esta fase do processo tem lugar a uma temperatura que ainda é baixa (2-5°C), uma vez que a massa interior da peça ainda não se encontra microbiologicamente estável, isto é, que ainda não atingiu a concentração de cerca de 4,5% (a_w aproximado de 0,95, seguro relativamente às Enterobacteriaceae, tais como *salmonella spp* e *Escherichia coli*).

2.3.3 Secagem e Maturação

Na etapa de secagem os dois principais objetivos são a secagem dos lombos até que estes percam 35 a 40% do seu peso e a potenciação das características sensoriais do produto final. Durante a secagem e maturação, colocam-se os lombos em

câmaras a temperaturas mais elevadas, de modo a favorecer o desenvolvimento da cor, da textura e a formação de compostos responsáveis pelo sabor e pelo aroma da muxama.

Durante esta etapa dá-se a migração da água das zonas internas para a superfície que, posteriormente, é evaporada na câmara, devendo as temperaturas desta oscilar entre os 5 e os 15 °C e a humidade relativa entre os 75 e 85 %. A duração da maturação depende de vários factores como o tamanho do lombo, a quantidade de gordura intermuscular, as condições de secagem e o pH.



Figura 8 - Processo de secagem e maturação.

2.4 Tecnologia de barreiras na produção de muxama

A estabilidade microbiológica e a segurança da maioria dos alimentos é baseada na combinação de vários fatores (barreiras), capazes de inviabilizar o desenvolvimento tanto dos microrganismos habitualmente presentes na microbiota de contaminação bem como dos acidentalmente incorporados nas diferentes fases do processamento, distribuição, comercialização e consumo (Gorris, 1994).

O efeito de barreira é de importância fundamental para a preservação dos alimentos, nomeadamente no controlo do desenvolvimento de microrganismos de deterioração, dos responsáveis por toxinfecções e inclusivamente dos responsáveis pelos processos fermentativos. O conceito inerente à tecnologia de barreiras apenas ilustra o facto das fortes interações entre a temperatura, a_w , pH e potencial redox serem cruciais para a estabilidade microbiológica dos alimentos. A sua aplicação provou ter sucesso, uma vez que a combinação inteligente das barreiras assegura não só a estabilidade microbiológica e a segurança mas também garantem as propriedades sensoriais, nutritivas e benefícios económicos associados a esse alimento.

As barreiras mais utilizadas na conservação dos alimentos são a temperatura (alta ou baixa), o a_w , a acidez/pH, o potencial redox, os conservantes (nitrito, sorbato, e

outros) e no caso dos produtos fermentados, a microbiota competitiva (bactérias lácticas). Contudo, muitas mais são possíveis de implementar, incluindo as ligadas à tecnologia de embalagem (vácuo, atmosfera modificada), pressão (alta ou reduzida), radiação (UV, microondas, irradiação) e processos físicos (calor óhmico, campos eléctricos pulsados, ultrasonicação) entre outras. A sua aplicação, porém, não se limita a garantir o controlo microbiano mas igualmente o controlo de outras vias e mecanismos de deterioração, nomeadamente o fenómeno oxidativo e, por esta via, os atributos sensoriais. No caso do nitrito a sua acção anti-microbiana é também complementada com efeito significativo na aparência e flavor finais (Gorris, 1994).

A muxama, preparada a partir da musculatura do do atum com a estrutura intrínseca inalterada, carece de controlo da flora de contaminação instalada, quantitativa e qualitativamente, dada a sua extrema suscetibilidade para a deterioração. Com uma presença natural elevada de enzimas proteolíticas e lipolíticas, o teor de aminoácidos e ácidos gordos livres é também considerável, estando criadas, se não se conseguir inibir o desenvolvimento da microbiota residente, as condições de base para a sua transformação rápida em compostos indesejáveis para a qualidade sensorial e segurança do produto final, tais como aminas biogénicas, compostos voláteis originários do processo oxidativo, e outros.

Não sendo um produto que se caracterize por alteração sensível do pH da matéria-prima (5,7 – 6,1), tem-se como barreiras de implementação prioritária/obrigatória, o controlo da temperatura ambiente (refrigeração, entre 2-5°C) e a adição de sais (NaCl, nitrito e nitrato) até que o valor do a_w seja suficientemente reduzido através da secagem de modo a representar uma barreira efetiva ao desenvolvimento microbiano. Sublinhe-se o facto da atividade das descarboxilases produzidas permanecer em curso, mesmo se os microrganismos que lhe deram origem já não serem viáveis. Com grande impacto no prazo de vida útil comercial deste tipo de produto, os fenómenos de natureza oxidativa que atingem os lípidos neutros e polares possuidores de ácidos gordos de natureza insaturada, carecem igualmente de controlo prioritário, através de medidas tendentes a reduzir o potencial redox, nomeadamente através de técnicas de embalagem. Esta barreira induzirá a desaceleração de muitos processos com efeito no tipo de microrganismos capazes de se desenvolverem. A utilização de filmes com baixa/muito baixa permeabilidade ao O_2 inibirá também o desenvolvimento da oxidação.

2.5 Atributos nutracêuticos do atum

Na composição química do atum, a água representa cerca de 60% do seu peso, sendo a parte sólida formada pelos nutrientes usuais presentes em todos os alimentos de origem animal (lípidos, proteínas, compostos azotados de natureza não-proteica, hidratos de carbono, vitaminas, e sais minerais), embora com teores e valores nutricionais diferenciados (Bernardo e Martins, 1997a).

A composição química varia de indivíduo para indivíduo, sendo a fase do ciclo reprodutivo, a idade, o sexo, o ambiente e a estação do ano os vários factores que contribuem para esta variação.

2.5.1 Colesterol

O colesterol (Figura 9) é o mais importante dos esteróis animais, podendo ser esterificado. Este álcool apresenta uma estrutura cíclica juntamente com uma estrutura alifática lateral, possuindo ao todo 27 átomos de carbono com uma dupla ligação no carbono 5 e uma função álcool no carbono 3 hidroxilo, pelo qual pode esterificar o carboxilo dos ácidos gordos (Ferreira, 1983).

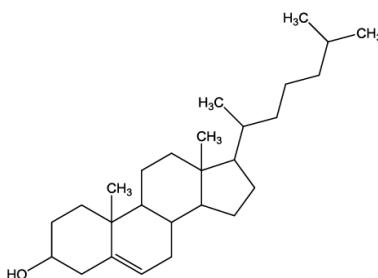


Figura 9 - Estrutura química do colesterol.

O colesterol tem diversas funções biológicas, sendo um precursor das hormonas esteroides, sintetizadas pelas glândulas supra-renais e pelas gónadas (testículos e ovários), e é ainda componente da membrana das células, podendo ser sintetizado pelo fígado (colesterol endógeno) (Breda, 2003).

O colesterol encontra-se em circulação associado a lipoproteínas plasmáticas do sangue, pois tratando-se de uma molécula insolúvel em água e, conseqüentemente, insolúvel no sangue, para se fazer transportar pelo sangue, o colesterol liga-se a lipoproteínas.

As lipoproteínas são compostas por moléculas como o colesterol, triglicerídeos, fosfolípidos e ácidos gordos livres, podendo ser classificadas por ordem decrescente de densidade: quilomicrons, lipoproteínas de menor densidade, VLDL (Very Low-Density Lipoprotein), LDL (Low-Density Lipoprotein) e por último as HDL (High-Density

Lipoprotein). Por norma, à medida que a densidade aumenta e o diâmetro das lipoproteínas diminui, verifica-se uma diminuição do seu teor em triglicéridos e um aumento da sua concentração em proteínas, colesterol e fosfolipídios (Chapman, 1980).

Tratando-se de um lípido monoinsaturado, com uma dupla ligação no carbono 5, o colesterol é uma molécula suscetível de sofrer oxidação na presença de luz, calor, radiação, radicais livres, iões metálicos entre outros fatores (Hur *et al.*, 2007).

Os produtos resultantes da oxidação do colesterol são os óxidos de colesterol, como o colestaneetriol e o 25-hidroxicolesterol, que são prejudiciais para organismo e responsáveis por efeitos biológicos indesejáveis (Hur *et al.*, 2007).

O colesterol é um constituinte de todas as células do corpo, sendo a maior parte de origem biológica, sendo sintetizado no fígado e noutros tecidos (colesterol endógeno) e apenas uma pequena parte fornecido pela dieta (colesterol exógeno) (Hur *et al.*, 2007).

Todos os alimentos de origem animal são fornecedores de colesterol, alguns em concentrações elevadas como as gemas de ovo, outros em quantidades médias como a carne de vaca e outros em quantidades baixas como o leite gordo (Breda, 2003).

2.5.2 Vitamina E

A vitamina E, que faz parte do grupo de vitaminas lipossolúveis, inclui dois grupos de compostos químicos: os tocoferóis e os tocotrienóis. Ambos são estruturalmente semelhantes, sendo constituídos por um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral com dezasseis carbonos na posição carbono 2. No entanto, os tocoferóis (Figura 10) têm uma cadeia fitilo, enquanto os tocotrienóis (Figura 11) têm uma cadeia similar mas com 3 duplas ligações nas posições 3, 7 e 11, denominada por cadeia isoprenóide insaturada. Estas estruturas são comuns ao conjunto de todos os tocoferóis e tocotrienóis, apresentando 4 formas, (α -, β -, γ -, δ -), diferindo pelo número e posição dos grupos metilo no anel aromático (Machilin, 1991; Traber *et al.*, 1992).

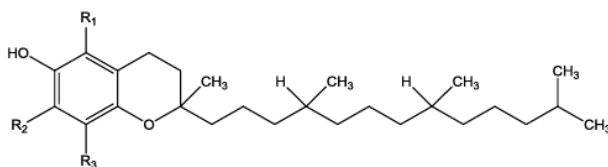


Figura 10 - Estrutura do tocoferol. Sendo que no α -tocoferol: $R_1=R_2=R_3=CH_3$; β -tocoferol: $R_1=R_3=CH_3$ e $R_2=H$; γ -tocoferol: $R_1=H$ e $R_2=R_3=CH_3$; δ -tocoferol: $R_1=R_2=H$ e $R_3=CH_3$. (Ball, 2006)

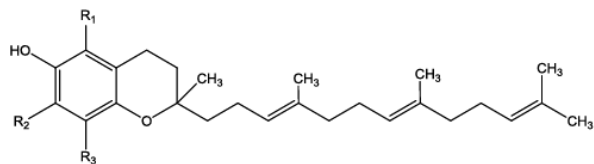


Figura 11 - Estrutura do tocotrienol. Sendo que no α -tocotrienol: $R_1=R_2=R_3=CH_3$; β -tocotrienol: $R_1=R_3=CH_3$ e $R_2=H$; γ -tocotrienol: $R_1=H$ e $R_2=R_3=CH_3$; δ -tocotrienol: $R_1=R_2=H$ e $R_3=CH_3$. (Ball, 2006)

A forma mais ativa biologicamente é o α -tocoferol, representando a maioria da vitamina E encontrada no plasma e eritrócitos do fígado (Bramley *et al.*, 2000; Traber, *et al.*, 1992).

Cada espécie de peixe contém níveis característicos de tocoferol nos seus tecidos, e uma vez que os peixes são incapazes de sintetizar esta molécula, toda a sua quantidade provém da sua dieta (Ackman & Cormier, 1967).

Segundo López *et al.* (1995), o tamanho e a idade do peixe são fatores que influenciam a sua concentração em tocoferol, tendo sido determinadas maiores concentrações de tocoferol em trutas mais novas, não havendo diferenças significativas entre sexos.

Ackman e Cormier (1967) e Petillo *et al.* (1998) encontraram diferenças significativas na concentração de α -tocoferol entre os músculos claros e escuros do bacalhau e da cavala, sendo que as concentrações no músculo escuro são superiores às do músculo claro.

A vitamina E é a principal vitamina lipossolúvel responsável pela proteção das membranas celulares protegendo da oxidação lipídica (Packer, 1991). Devido à sua estrutura lipofílica, esta tende a acumular-se nas lipoproteínas circulantes, membranas celulares e depósitos adiposos, onde reage com o oxigénio molecular e com os radicais livres, sequestrando-os, protegendo assim os ácidos gordos insaturados membranares e as lipoproteínas da peroxidação (Thakur & Srivastava, 1996).

A sua ação antioxidante encontra-se associada à diminuição dos danos nos ácidos nucleicos (ADN) e consequentes processos mutagénicos responsáveis pela diminuição da evolução de algumas doenças crónicas como cancro, doenças degenerativas e cataratas (Thakur & Srivastava, 1996).

2.5.3 β -Caroteno

O β -Caroteno (Figura 12) é um pigmento vegetal que pertence à família dos carotenoides. Tratando-se de um antioxidante lipossolúvel, funciona como um supressor do singlete de oxigénio, protegendo os ácidos gordos insaturados e os lípidos de sofrerem oxidação (Muramoto, 2003).

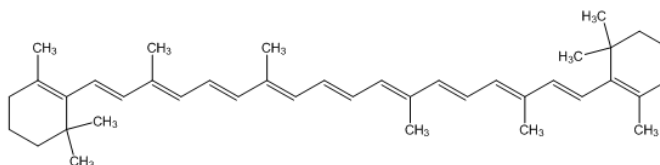


Figura 12 - Estrutura química do β -caroteno.

Os carotenoides são os pigmentos mais abundantes na natureza, sendo sintetizados em bactérias, leveduras, plantas e em alguns animais. No peixe, estes podem ser encontrados na pele, nos tecidos, no fígado nos ovos e nos olhos (Matsuno & Hirao, 1989).

Uma das principais funções biológicas do β -Caroteno é a de precursor do retinol (Vitamina A) nos animais, sendo o fitoplâncton a fonte primária de carotenoides nos animais marinhos.

Ao entrar no organismo, nem todo o β -caroteno ingerido é absorvido, sendo uma parte transformada diretamente em vitamina A e o excedente é depositado no tecido adiposo onde se acumula (Yang *et al.*, 2002).

A vitamina A é fundamental para um correto desenvolvimento fetal, para a manutenção da visão, para a diferenciação celular, permitindo também a manutenção da integridade de vários tecidos e do sistema imunitário (Carmo, 2004).

Vários estudos têm sido realizados sobre a interação sinérgica entre o β -caroteno e os tocoferóis na prevenção oxidativa dos alimentos, tendo sido comprovada que a sua combinação leva a uma maior capacidade antioxidante do que a atividade destas moléculas em separado (Mortensen & Skibsted, 2000; Yanishlieva *et al.*, 1998; Palozza & Krinsky, 1992).

2.5.4 Péptidos

As proteínas presentes no peixe contêm sequências de péptidos bioativos que podem exercer efeitos fisiológicos no organismo. Alguns desses péptidos possuem um potencial nutracêutico, o que tem benefícios para a saúde humana.

Por norma, os péptidos bioativos contêm cerca de 2 a 20 aminoácidos e possuem massa molecular inferior a 6000 Da, em que a sua atividade depende da sua composição e sequência de aminoácidos (Meisel *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004). Na sequência proteica, esta cadeia curta de aminoácidos encontra-se inativa, podendo ser libertada através de três processos distintos: (a) hidrólise por enzimas digestivas, (b) hidrólise por microrganismos proteolíticos e (c) ação de enzimas proteolíticas derivadas de microrganismos ou plantas.

Diversos péptidos possuem capacidade antioxidante, sendo estes péptidos constituídos por 5 a 16 resíduos de aminoácidos (Che *et al.*, 1996). Os péptidos antioxidantes presentes nos alimentos são considerados compostos seguros com baixo peso molecular, alta atividade e de fácil absorção. Os péptidos antioxidantes têm algumas vantagens em relação aos antioxidantes enzimáticos, pois devido à sua estrutura simples tornam-se mais estáveis em diferentes situações, apresentando propriedades funcionais e nutricionais para além da sua atividade antioxidante (Hattori *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2008).

O mecanismo exato que envolve a atividade antioxidante dos péptidos ainda não é completamente entendida, no entanto, vários estudos mostraram que estes têm a capacidade de inibir a oxidação lipídica, de destruir os radicais livres e que são agentes quelantes de metais de transição (Moure *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2008; Rajapakse *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2003).

De acordo com Chen (1998), as propriedades antioxidantes dos péptidos encontram-se relacionadas com a sua composição, estrutura e hidrofobicidade.

A creatina, a carnosina e a anserina (Figura 13) são alguns dos péptidos identificados no extrato do peixe.

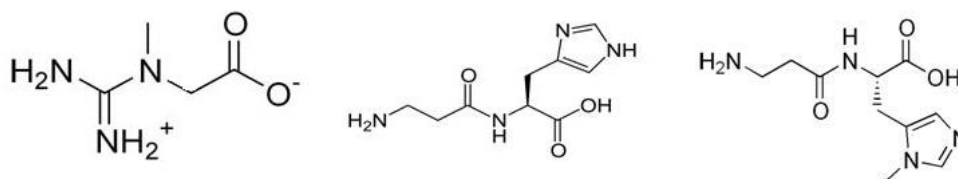


Figura 13 - Estrutura química da creatina, carnosina e anserina, respetivamente.

A creatina (ácido 2-(carbamimidoil-metil-amino)acético) é um ácido orgânico nitrogenado que existe naturalmente nos vertebrados, desempenhando um papel importante no metabolismo energético celular através da sua conversão na forma fosforilada designada por fosfocreatina. A creatina existe em equilíbrio com o seu derivado cíclico denominado por creatinina.

A creatina endógena é sintetizada principalmente nos rins, no pâncreas e no fígado, sendo que a sua síntese envolve três aminoácidos (metionina, glicina e arginina) e 3 enzimas: L-arginina-glicina amidinotransferase (AGAT), metionina adenosiltransferase (MAT) e guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) (Schlattner, 2003; Wyss & Schulze, 2002).

Segundo Lawler *et al.* (2002), a creatina apresenta uma atividade antioxidante seletiva, não demonstrando uma significativa capacidade antioxidante contra não-radicais hidriperóxidos neutros.

A creatina é um dos suplementos mais comuns consumidos por atletas e “bodybuilders”, uma vez que apresenta vários benefícios como o crescimento de tecido muscular, o aumento do rendimento em exercícios de alta intensidade em curto espaço de tempo e ajuda na regulação do metabolismo dos hidratos de carbono (Branch, 2003).

A L-carnosina (β -alanil-L-histidina) é um dipéptido composto pelos aminoácidos β -alanina e L-histidina, que se encontram em grandes concentrações no músculo de diversos peixes, incluindo o atum (Ikeda, 1980). Por seu lado a anserina (β -alanil-N-metilhistidina) é um composto N-metilado análogo da carnosina, encontrado maioritariamente em peixes e em aves, tendo propriedades muito parecidas às da carnosina.

A carnosina tem diversas funções biológicas tais como a função tampão, antioxidante, anti-envelhecimento, funcionando também como agente quelante de diversos metais divalentes (Hipkiss, 2009).

O pKa da carnosina é de 6.8, pertencendo à gama de pH fisiológico das fibras musculares (6.5-7.1), podendo assim aceitar os prótons produzidos durante a contração muscular, sendo a sua capacidade tampão uma das explicações para a sua abundância nos tecidos musculares.

A carnosina atua como agente quelante de metais divalentes através do seu anel imidazol, o que a torna um agente protetor da toxicidade de metais pesados (Trombley *et al.*, 2000). A sua propriedade quelante para iões ferro e outros metais de transição também contribui para a sua capacidade antioxidante, uma vez que os metais de

transição promovem a produção de espécies reativas de oxigénio através da reação de Fenton (Bondy *et al.*, 1998).

A glicação (glicosilação não-enzimática) é uma reação aleatória entre aldeídos e o grupo amina das proteínas, prejudicando o funcionamento destas promovendo o envelhecimento. No entanto, vários estudos *in vitro* demonstraram que a carnosina tem a capacidade de reagir com diversos reagentes da glicação produzindo produtos não mutagénicos, inibindo assim a glicação e prevenindo o envelhecimento (Hipkiss *et al.*, 1995).

2.5.6 Ubiquinonas (Coenzima Q)

As coenzimas Q ou ubiquinonas, são benzoquinonas lipossolúveis, com uma cadeia lateral lipídica constituída por diversas unidades isoprenóides (Kagan *et al.*, 1996). A cadeia lateral isoprenóide pode variar entre 6 a 10 unidades isoprenóides em plantas e microrganismos.

As funções redox das ubiquinonas devem-se à sua capacidade de trocar dois elétrões num ciclo redox entre a forma oxidada (ubiquinona, CoQ) e a forma reduzida (ubiquinol, CoQH₂) (Figura 14) (Lang *et al.*, 1986). Estas formas redox permitem que a coenzima funcione como antioxidante, mas também como prooxidante através do ubisemiquinona intermediária (Nakamura & Hayashi, 1994).

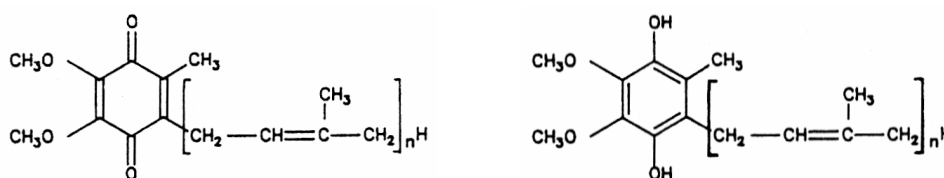


Figura 14 - Estrutura química da ubiquinona e do ubiquinol, respectivamente.

A forma predominante das ubiquinonas nos humanos, nos animais e nos peixes é a Coenzima Q10 (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenilbenzoquinona), contendo 10 unidades isoprenóides na sua cadeia lateral.

Pettilo *et al.* (1998) encontraram diferenças consideráveis na concentração de ambas as formas da Coenzima Q (ubiquinona e ubiquinol) entre o músculo escuro e claro da cavala, sendo a concentração maior no músculo escuro.

A ubiquinona tem diversas atividades biológicas funcionando como transportador de elétrões do complexo I e II para o complexo III da cadeia respiratória mitocondrial, atuando também como antioxidante (Crane & Navas, 1997; Turunen *et al.*, 2004). A sua

síntese ocorre em todos os tecidos e nas membranas intracelulares das células do organismo dos animais, sendo a sua quantidade específica para cada tipo de célula (Turunen *et al.*, 2004).

O mecanismo proposto para a atividade antioxidante das ubiquinonas ainda é conjectural, (Kagan *et al.*, 1996) sendo proposto que o ubiquinol atue como antioxidante através da doação de um hidrogénio reduzindo o radical peróxido. Outro mecanismo proposto para a atividade antioxidante das ubiquinonas é a reciclagem do radical fenoxil da vitamina E.

Como muitos outros antioxidantes, as ubiquinonas também podem funcionar como pro-oxidantes, em que a ubisemiquinona, que é intermediária no ciclo redox da ubiquinona na cadeia de transporte de eletrões, pode funcionar como antioxidante.

2.5.7 Aminoácidos

Cerca de 0,5 a 1% do músculo do peixe é constituído por compostos nitrogenados, em que a sua composição da sua fração não-proteica depende da espécie, da época de captura, da migração, das condições ambientais, da sua dieta, entre outros fatores (Finne, 1992). Os aminoácidos são constituídos por um grupo amina, grupo carboxílico e por uma cadeia lateral (R) (Figura 15).

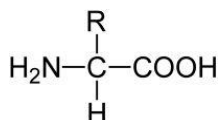


Figura 15 - Estrutura geral dos aminoácidos.

As propriedades dos aminoácidos, assim como das proteínas são influenciadas pela cadeia lateral do aminoácido, podendo estas ser classificadas como: (Belitz *et al.*, 2009)

- Aminoácidos apolares de cadeia neutra: Glicina, Alanina, Leucina, Valina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina, Triptofano e Metionina;
- Aminoácidos polares de cadeia neutra: Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina, Asparagina e Glutamina;
- Aminoácidos ácidos (com cadeia lateral negativa): Ácido aspártico e o ácido glutâmico;
- Aminoácidos básicos (com cadeia lateral positiva): Arginina, Lisina e Histidina.

Com base nos papéis nutricionais/fisiológicos, os aminoácidos podem ser diferenciados como: (Belitz *et al.*, 2009)

- Aminoácidos essenciais: Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina, Triptofano, Metionina, Treonina, Histidina e Lisina;
- Aminoácidos não-essenciais: Glicina, Alanina, Prolina, Serina, Cisteína, Tirosina, Asparagina, Glutamina, Ácido Aspártico e Ácido glutâmico.

Os aminoácidos livres presentes em grandes quantidades no peixe são a glicina, a taurina, a alanina e a lisina, e no caso do atum, sendo um peixe migratório contem grandes quantidades de histidina (Konosu & Yamaguchi, 1982).

Os aminoácidos são essenciais para a síntese de uma grande variedade de proteínas como as transportadoras de oxigénio, as vitaminas e as enzimas. A composição de aminoácidos nas proteínas do peixe é importante devido ao seu valor nutricional e à sua influência nas propriedades funcionais (Santos *et al.*, 2011).

A maioria dos aminoácidos têm propriedades antioxidantes, como por exemplo a tiramina, a triptamina, a metionina, a lisina, a cisteína e a histidina. (Wang & De Mejia, 2005) Alguns aminoácidos exercem efeitos sinérgicos com outros compostos, produzindo compostos com um maior poder antioxidante, como é o caso do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroma-2carboxílico, também conhecido por Trolox-C, um derivado sintético do α -tocoferol (Vitamina E) que quando ligado ao aminoácido produz o troloxyl-aminoácido (TAA), que por sua vez tem um poder antioxidante superior ao do Trolox-C (Taylor *et al.*, 1981).

A disponibilidade de aminoácidos nos alimentos é essencial para a formação de aminas biogénicas, sendo por isso a taxa de aminoácidos livres nos produtos um fator importante na sua produção (Maijala, 1994).

Em geral, nos alimentos frescos, a fração de aminoácidos livres, precursores das aminas biogénicas, não é significativa. No entanto, em produtos maturados, como é o caso da muxama, esta fração aumenta devido à proteólise provocada por enzimas endógenas (procedentes no próprio alimento), ou por enzimas produzidas por microrganismos que crescem de forma natural nas matérias-primas, ou que sejam adicionados na forma de culturas de arranque (Raemaekers & Demeyer, 1996).

2.6 Suscetibilidade para o desenvolvimento de processos oxidativos e formação de aminas biogénicas

Genericamente, no que respeita à quantidade de gordura, os peixes podem ser classificados como: magros, intermédios e gordos. O atum é considerado um peixe gordo, uma vez que tem mais de 5% de gordura nos músculos (Bernardo & Martins, 1997b). Estes depósitos de gordura localizam-se geralmente no tecido subcutâneo, músculos da zona abdominal e músculos responsáveis pelo movimento das barbatanas e cauda. Nos peixes que acumulam uma quantidade muito elevada de lípidos, a gordura deposita-se na cavidade abdominal.

O perfil de ácidos gordos dos peixes inclui uma importante fração polinsaturada (ácido linoleico, linolénico e araquidónico), que lhe confere um elevado valor nutricional. Estes ácidos gordos polinsaturados (PUFA) como os ácidos gordos ómega 3 (eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)) e ómega 6 (ácido linoleico e ácido araquidónico) são reconhecidos como essenciais para o bom funcionamento da pele, evitando o envelhecimento dos tecidos (Bernardo & Martins, 1997b). No peixe, acima de 40% dos ácidos gordos de cadeia longa são insaturados, por outro lado os mamíferos raramente contêm ácidos gordos com mais de duas ligações duplas.

2.6.1 Oxidação lipídica

O peixe, sendo rico em ácidos gordos insaturados torna-se altamente suscetível à oxidação lipídica, sendo este um dos principais responsáveis pelas características sensoriais da muxama (Ackman, 1988; Hardy, 1980).

A oxidação lipídica pode contribuir para a qualidade sensorial, sempre que não ultrapasse uma intensidade que confira características negativas ao produto final, como por exemplo, odores e sabores a ranço e até mesmo a formação de substâncias tóxicas (Enser, 1987; Dobarganes & Marquez, 2003).

Esta oxidação lipídica pode ser causada por mecanismos enzimáticos ou não-enzimáticos, como a temperatura, luz, metais, metaloproteínas, microrganismos e enzimas (Chan, 1987). A reação principal da oxidação lipídica é a auto-oxidação que é um processo complexo em que os ácidos insaturados reagem com o oxigénio molecular produzindo radicais livres iniciando a reação de oxidação, sendo este processo dividido em três fases: iniciação, propagação e terminação (Claus & Marriott, 1995; Melton, 1983).

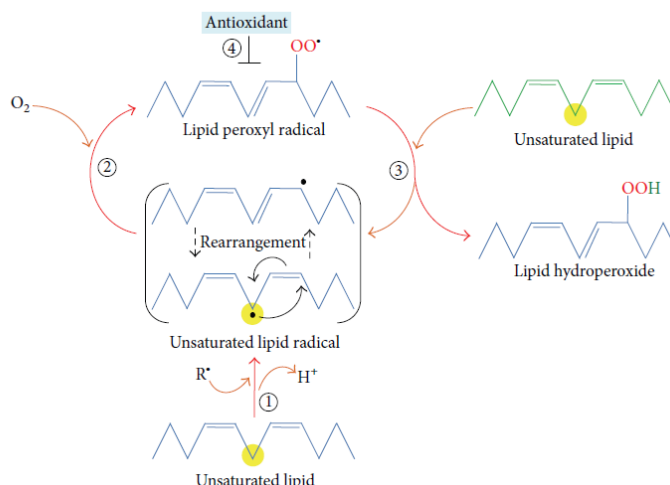


Figura 16 - Processo de oxidação lipídica. 1- Fase de iniciação, 2 e 3- Fase de propagação e 4- Fase de terminação. (Ayla *et al.*, 2014)

Na fase de iniciação (Passo 1 da Figura 16) os lípidos são atacados por um radical pró-oxidante de modo a extrair um H^\bullet do carbono metileno. Quanto maior for a quantidade de duplas ligações presentes nos ácidos gordos, mais fácil se torna a remoção do átomo de hidrogênio e conseqüentemente mais fácil a formação de radicais, o que faz com que os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e os saturados (SFA) sejam mais resistentes aos radicais do que os polinsaturados (PUFA). Segundo Moerck & Ball (1974), a adição de uma dupla ligação num ácido gordo aumenta a sua probabilidade de oxidação para o dobro.

Após a remoção do hidrogênio, dá-se a fase de propagação (Passo 2 e 3 da Figura 16) onde o carbono central do lípido sofre um rearranjo, reagindo com o oxigênio molecular formando o radical peróxido lipídico, que por sua vez, reage com outro lípido retirando-lhe um hidrogênio do seu carbono metileno formando outro radical lipídico e um hidroperóxido lipídico, propagando assim a peroxidação lipídica. Na fase de terminação (Passo 4 da Figura 16) um antioxidante doa um átomo de hidrogênio ao radical peróxido lipídico formando produtos não radicais (Ayla *et al.*, 2014; Carochó & Ferreira, 2013).

Os hidroperóxidos lipídicos não constituem um risco para a qualidade alimentar, embora sofram várias reações que os transformam em compostos responsáveis pelos maus cheiros e sabores. Podem também reagir com o oxigênio formando produtos secundários, como epoxyhidroperóxidos, peróxidos cíclicos e dihidroperóxidos que se quebram formando compostos voláteis (Sun *et al.*, 2011).

2.5.2 Aldeído malónico

O processo de oxidação lipídica encontra-se associado ao desenvolvimento da sua rançificação assim como à deterioração oxidativa. O peixe, sendo um produto rico em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), é altamente suscetível à oxidação lipídica durante a manipulação, processamento e durante a confeção. Uma das consequências da oxidação lipídica é a formação de hidroperóxidos lipídicos, que são compostos incolores, inodoros e sem sabor. No entanto, este produto primário da oxidação é um composto muito instável, decompondo-se em produtos secundários de oxidação como os aldeídos, as cetonas, os álcoois, os ácidos e os hidrocarbonetos (St. Angelo, 1996). Estes produtos de oxidação secundária são responsáveis pela alteração da qualidade dos alimentos, principalmente pela alteração da cor, da textura, do sabor e do odor.

A quantificação dos produtos primários da oxidação lipídica (hidroperóxidos) é um processo complicado devido à sua natureza instável e reativa, por isso a determinação da oxidação lipídica de um determinado produto é normalmente realizada através da quantificação dos produtos secundários de oxidação, como é o caso do aldeído malónico (MDA), que se trata de um iniciador carcinogénico e mutagénico, sendo o aldeído malónico muitas vezes utilizado como marcador dos danos oxidativos nas amostras biológicas (Kinter, 1995).

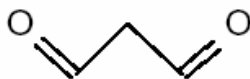


Figura 17 - Estrutura química do aldeído malónico.

O aldeído malónico (Figura 17), cuja fórmula molecular é $C_3H_4O_2$ é o principal e o mais estudado produto secundário de oxidação dos ácidos gordos polinsaturados. Desde 1960 que têm sido desenvolvidos vários métodos, *in vivo* e *in vitro*, para a quantificação desta molécula de modo a quantificar o nível de stress oxidativo (Kinter, 1995).

O aldeído malónico é produzido biologicamente através da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados com dois ou mais carbonos metileno interrompidos por ligações duplas de carbono, podendo ser encontrado em alimentos, no plasma, nos tecidos e na urina. Vários estudos reportaram a sua formação durante o desenvolvimento de várias doenças crónicas como a hepatite C, a diabetes e em crianças seropositivas ao HIV (Higueras *et al.*, 1994; Losada & Alio, 1997; Tiku *et al.*, 1998).

2.6.3 Aminas Biogénicas

As aminas biogénicas são bases orgânicas azotadas de baixo peso molecular resultantes da descarboxilação enzimática dos aminoácidos livres e da aminação ou transaminação dos aldeídos e cetonas (Santos, 1996). A sua designação como biogénicas deve-se à sua origem biológica, resultante da ação de organismos vivos na descarboxilação dos aminoácidos (Shalaby, 1996). Do ponto de vista estrutural, as aminas biogénicas podem ser classificadas como alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), heterocíclicas (histamina e feniletilamina) e aromáticas (tiramina e feniletilamina) (Santos, 1996).

O processo de descarboxilação dos aminoácidos livres é a principal via de formação das aminas biogénicas consistindo na remoção do grupo α -carboxyl da estrutura do aminoácido, libertando dióxido de carbono e formando a amina correspondente (Shalaby, 1996). Esta descarboxilação pode ocorrer por duas vias bioquímicas: através de enzimas descarboxilase endógenas que se encontram naturalmente presentes nos alimentos ou através de enzimas descarboxilase exógenas produzidas por microrganismos associados aos alimentos. No entanto a produção exógena de aminas é significativamente superior à produção endógena (Santos, 1996; Flick & Granata, 2005).

As aminas biogénicas podem ser encontradas numa vasta gama de alimentos e produtos alimentares desde que contenham proteínas e aminoácidos livres e que estejam sujeitos a condições envolvendo microrganismos ou atividade bioquímica. Entre esta vasta gama de alimentos encontra-se os produtos da pesca, produtos cárneos, produtos fermentados, cervejas, vinho, frutas, vegetais, frutos secos e chocolate (Brink *et al.*, 1990). No entanto, a sua formação e concentração encontra-se diretamente relacionada com a composição do alimento, da sua microbiota e com diversos parâmetros intrínsecos e extrínsecos como a temperatura e o pH, presença de fontes de carbono, presença de vitaminas, co-enzimas e concentração de aminoácidos livres.

Na Tabela 3 é possível encontrar as principais aminas biogénicas, assim como os respetivos aminoácidos precursores.

Tabela 3 - Aminas Biogénicas formadas nos alimentos e respetivos aminoácidos precursores (Flick & Granata, 2005; Santos,1996).

Aminas Biogénicas	Aminoácidos Precursores
Histamina	Histidina
Tiramina	Tirosina
Triptamina	Triptofano
Cadaverina	Lisina
Feniletilamina	Fenilalanina
Espermina e Espermidina	Metionina
Putrescina	Arginina

As aminas biogénicas podem ser classificadas como vasoactivas, tais como a tiramina, a triptamina e a feniletilamina, que têm efeitos vasoconstritores, e a histamina e serotonina, que têm efeitos vasodilatadores, ou como psicoactivas, tais como a dopamina e a serotonina que são neurotransmissores do sistema nervoso central. Por outro lado, algumas aminas biogénicas podem reagir com o nitrito e formar nitrosaminas carcinogénicas (Bardócz, 1995).

A importância da determinação do teor em aminas biogénicas nos alimentos deve essencialmente a dois fatores importantes tais como: a sua potencial toxicidade e a possibilidade de uso como marcador de qualidade alimentar (Shalaby, 1996).

Segundo Claro (2009), o período de maturação é um fator crítico que determina o grau de acumulação das aminas biogénicas nos alimentos, especialmente de tiramina. Em contrapartida, uma grande formação de diaminas durante o fabrico, especialmente de cadaverina, tem sido relatada como dependente do tipo de maturação. Uma maturação rápida permite um maior aumento das aminas biogénicas em comparação com uma maturação lenta. Estes resultados são atribuídos às altas temperaturas aplicadas durante a secagem/cura. Os fenómenos proteolíticos que ocorrem durante o amadurecimento aumentam a concentração dos aminoácidos precursores que se correlacionam com a formação das aminas biogénicas.

A maior causa de intoxicações alimentares devido a aminas biogénicas deve-se à histamina, também conhecida como “Histamine fish poisoning” (HFP) ou “Scombroid fish poisoning” devido ao consumo de atum, sardinhas e cavala (Halász *et al.*, 1994). Os elevados teores de histamina nestas espécies podem ser explicadas pelo seu elevado teor de histidina (Taylor, 1986), que segundo Ijomah *et al.* (1992) podem variar desde 1 g/kg até 15 g/kg de atum, sendo que teores de aminoácidos livres nos produtos da pesca normalmente aumentam com o armazenamento devido à ação de proteases endógenas e exógenas (Halász *et al.*, 1994).

Os sintomas mais comuns da intoxicação histamínica são as tonturas, desmaios, comichão, incapacidade de engolir assim como a sensação de ardor na língua, sendo que por norma a recuperação ocorre ao fim de 8 horas, ou não!

Em 1998 a FDA (American Food and Drug Administration) declarou um limite máximo permitido de histamina no peixe de 5mg/100g de peixe (FDA, 1998). No entanto em vários estudos realizados foram directamente administrados 67 e 180 mg de histamina por via oral sem que houvesse sinais de toxicidade nos indivíduos voluntários, demonstrando que a toxicidade das aminas depende principalmente da capacidade do individuo de desintoxicar (Halász *et al.*, 1994).

As aminas biogénicas presentes nos alimentos, por norma, não representam um risco para a saúde humana, a não ser que sejam ingeridas grandes quantidades, ou que os mecanismos naturais para o catabolismo de uma ou mais aminas sejam inibidos ou sejam geneticamente deficientes.

Durante a ingestão dos alimentos, pequenas quantidades de aminas biogénicas são catabolizadas em produtos fisiologicamente menos ativos, através de enzimas aminoxidases como a monoamina oxidase (MAO) e a diamina oxidase (DAO). No entanto, quando as aminas biogénicas são ingeridas em grandes quantidades, o sistema de desintoxicação não as consegue eliminar eficientemente (Dadáková, 2009).

Apesar de a histamina ser a principal causa de intoxicação, a putrescina, a cadaverina, a espermina e a espermidina, que não têm efeitos adversos para a saúde, juntas potenciam a toxicidade da histamina e da tiramina ao inibirem a atividade das enzimas de desintoxicação – aminoxidases.

Uma vez que a determinação da histamina por si só nem sempre é útil como indicador da qualidade do peixe, Mietz e Karmas (1977) propuseram um método que avalia a qualidade de um determinado produto a partir do seu teor em aminas, expresso em mg/kg, actualmente designado por Índice de Aminas Biogénicas (IAB). Este indicador, que avalia a qualidade e a frescura dos alimentos, é estabelecido pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Histamina} + \text{Putrescina} + \text{Cadaverina}}{1 + \text{Espermina} + \text{Espermidina}} = \text{IAB}$$

Para valores de IAB > 1, indicação de produto impróprio para o consumo humano e para valores de IAB < 1, indicação de produto de elevada qualidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de vários fatores tecnológicos na evolução físico-química e bioquímica da *Muxama* produzida a partir de músculo de atum de distintas regiões anatómicas, tendo-se, para o efeito, realizado 2 ensaios.

No primeiro ensaio (Ensaio 1) avaliou-se a influência da adição de diferentes antioxidantes nas características físico-químicas e bioquímicas da muxama no produto final, antes e após a maturação, desenvolvida sob vácuo a 0-4°C durante 1 e 3 meses. Após a sua receção em gelo, o atum fresco, atum patudo (*Thunnus obesus*) proveniente dos Açores, foi submetido a desmancha e corte da região dorsal do lombo (categoria extra) em várias peças de cerca de 2 kg, para a produção de muxama com os diferentes antioxidantes em estudo (eritorbato, alecrim e sálvia). As amostras de muxama foram produzidas pelo processo de salga a seco sob vácuo e mantidas a 2-4°C durante 15 dias. A quantidade de sal utilizada foi calculada por forma a atingir-se um teor médio de 4% no produto final, tendo em conta uma quebra de peso durante a secagem de cerca de 35-40%. O nitrato e nitrito de sódio foram adicionados na concentração de 200 mg/kg. Para avaliar a influência de diferentes antioxidantes, as amostras de muxama foram adicionadas de eritorbato de sódio na concentração de 0,5g/kg e extratos de alecrim e sálvia na concentração de 2g/kg. Após o período de salga/cura, as amostras foram retiradas da embalagem a vácuo, removido o excesso de humidade à superfície e transferidas para uma câmara de secagem com temperatura e humidade relativa controladas (Fitoclima, modelo S600 PLH). A secagem das amostras iniciou-se a uma temperatura de 5°C e uma humidade relativa (HR) de 70 % durante 24 h para remover o excesso de humidade da superfície das peças de atum. Após este período as amostras foram mantidas a 5°C e 85% de HR até ser atingido cerca de 20% de perda de peso e numa 3ª fase mantidas a 10-12°C e 60% de HR (sem ventilação) até 35%-40% de perda de peso (a_w final de cerca 0,84-0,86). As amostras foram então embaladas a vácuo e conservadas a 4°C durante 1 e 3 meses.

No segundo ensaio (Ensaio 2) avaliou-se o tipo de salga (a vácuo e ao ar) e a adição de nitrito nas amostras de muxama mantidas durante 1 e 3 meses de maturação. As amostras de muxama foram produzidas a partir da região intermédia do lombo do atum (1ª categoria) o qual foi dividido em várias peças de cerca de 2 kg, tal como no ensaio anterior, para a produção de muxama com as diferentes condições em estudo (salga a vácuo/ar e com/sem nitrito). Neste ensaio todas as amostras foram adicionadas de

eritorbato (0,5g/kg). O processo tecnológico de produção das diferentes amostras de muxama foi semelhante ao já descrito para o Ensaio 1.

Para além da análise de uma gama alargada de compostos bioativos naturais com atividade antioxidante como os péptidos, ubiquinonas, vitamina A e E, determinaram-se as taxas de lipólise (acidez da gordura) e proteólise (fração azotada dos ácidos aminados livres) bem como a estabilidade oxidativa da fração lipídica (aldeído malónico) e ainda a propensão para a formação de aminas biogénicas, de acordo com os protocolos a seguir indicados.

3.2 Preparação da amostra

Antes da execução das técnicas para determinação dos vários parâmetros químicos e bioquímicos, as amostras foram cortadas e trituradas num Grindomix GM 200, Retsch com o objetivo de obter amostras homogeneizadas e representativas da totalidade do material amostrado e de aumentar a sua área superficial para facilitar a extração dos diversos compostos que se pretende quantificar.

3.3 Determinação da Humidade

A humidade das amostras foi determinada de acordo com a NP-1614-1 (2009). Para uma cápsula de porcelana, pesaram-se cerca de 20 g de areia e uma vareta de vidro, que foi colocada numa estufa (Memmert, Germany) a 103°C durante 1 hora. Após este período, adicionou-se 5 g de amostra que se envolveu muito bem na areia e se colocou novamente na estufa durante 3 horas à mesma temperatura. Após arrefecimento em exsiccador, pesou-se e posteriormente, repetiu-se a operação de hora a hora até ser atingido um peso constante. O teor de humidade, expresso em percentagem (w/w), foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{Humidade (\%)} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$$

onde:

m_0 - massa da cápsula com areia e vareta, expressa em gramas

m_1 - massa da cápsula com areia, vareta e toma para análise antes da secagem, expressa em gramas

m_2 - massa da cápsula com areia, vareta e toma para análise depois da secagem, expressa em gramas

3.4 Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada de acordo com a NP-3441 (2008) num potenciómetro 654 pH meter (Metrohm Herisau, Switzerland) equipado com um electrodo de vidro combinado (Mettler Toledo, Switzerland). Antes de iniciar o procedimento e em cada dia de análise procedeu-se à calibração do potenciómetro, utilizando os padrões de pH 4 e 7. Pesaram-se 5g de amostra para um copo de vidro, adicionou-se 10 g água destilada e homogeneizou-se com uma vareta de vidro, sendo posteriormente realizada a leitura direta no potenciómetro.

3.5 Determinação da atividade da água

A determinação da atividade (a_w) da água foi efetuada utilizando um medidor de a_w (Rotronic Hygromer) a 20°C, com uma sonda AwV C-DIO (Rotronic AG, Switzerland). Uma porção da amostra homogeneizada foi colocada dentro da cápsula da sonda de medição durante o tempo necessário à sua estabilização.

3.6 Determinação dos cloretos

De acordo com a NP-1845 (1982), pesaram-se 10 g de cada amostra para um copo de vidro e macerou-se em água destilada a ferver, utilizando uma vareta de vidro. De seguida, foi transferido, através de um funil, para um balão volumétrico de 100 mL e adicionado de 2 mL de ferrocianeto de potássio e 2 mL de acetato de zinco. Após um repouso de 10 minutos, aferiu-se o volume do balão com água destilada. Após filtração, retirou-se 10 mL da solução para um erlenmeyer e adicionou-se 1mL de ácido nítrico, 50mL de água destilada e 20 mL de nitrato de prata 0,1 N, deixando-se a repousar durante 10 minutos ao abrigo da luz. De seguida, titulou-se com tiocianato de potássio 0,1 N, utilizando como indicador a solução de sulfato duplo de ferro e de amónia. O teor de cloretos das várias amostras foi expresso em percentagem de cloreto de sódio e calculado através da equação seguinte:

$$\text{Cloretos (\%)} = 5,844 / m (10-v)$$

onde:

m - massa da toma para análise, expresso em gramas

v – volume da solução de tiocianato de potássio adicionada na titulação, expressa em mililitros.

3.7 Determinação do azoto dos aminoácidos livres

A determinação do azoto dos aminoácidos livres foi efetuada segundo a NP-3443 (1990) Pesaram-se 25 g de cada amostra aos quais foram adicionados 25 mL de TCA 20% e 90 mL de água destilada, sendo de seguida homogeneizado em Polytron modelo PT3100 (Kinematica AG, Switzerland) e colocado no frigorífico por duas horas. Após este tempo foi feita uma filtração para balão volumétrico de 200 mL, sendo o volume aferido com água destilada. A esta solução foram retirados 25 mL para um erlenmeyer e adicionados 10 mL de formol tendo sido posteriormente realizada uma titulação com NaOH 0,02 N. O teor do azoto dos aminoácidos livres (AAAL) foi expresso em percentagem e calculado segundo a equação:

$$AAAL (\%) = 5,6 \times V / m \times V_1$$

onde:

V – volume de NaOH gasto na titulação

V₁ – volume do filtrado utilizado

m – massa da toma da amostra

3.8 Determinação da gordura total

Para a determinação dos lípidos totais foi utilizado o método descrito por Folch *et al.* (1957). Para tal foram homogeneizadas, em Polytron, 20 g de amostra com 50 mL de uma mistura constituída por diclorometano e metanol (2v:1v) durante 6 minutos. Após a trituração da amostra procedeu-se à sua filtração em vácuo, utilizando papel de filtro de fibra de vidro, sendo o resíduo do filtrado recolocado novamente no tubo de vidro para se proceder a uma nova extração. Após a segunda filtração, colocou-se a mistura numa ampola de decantação de 250 mL juntamente com 37,5 mL de NaCl 0,73%. Após agitação foi deixada a repousar durante 24 horas. Decorrido este tempo recuperou-se a fase inferior (fase orgânica) para o respetivo balão de 250 mL previamente identificado e tarado. De seguida procedeu-se à eliminação do solvente utilizando um evaporador rotativo a 45°C, utilizando na fase final o vácuo de modo a eliminar quaisquer resíduos de solvente. Após a evaporação, os balões foram colocados por uma hora na estufa a 100°C e pesados após arrefecimento. Foram de seguida colocados no exsiccador durante 24 horas e pesados ao fim deste tempo. O teor de gordura foi expresso em percentagem.

3.9 Determinação da Acidez

Para a determinação da acidez, efetuada segundo a técnica descrita por Pearson (1973), efetuou-se a extração da gordura total seguida da determinação da acidez livre.

- *Extração da gordura total*

Trinta gramas de amostra foram homogeneizados, em Polytron, com 50 mL de diclorometano e filtrados utilizando um filtro de pregas Whatman nº 41. Em seguida procedeu-se a uma segunda filtração com sulfato de sódio anidro para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com diclorometano.

- *Teor de gordura*

Para um balão de vidro devidamente identificado e tarado foram retirados 10 mL do extrato obtido anteriormente, procedendo-se de seguida à eliminação do solvente utilizando um evaporador rotativo a 61°C e utilizando na fase final o vácuo de modo a eliminar quaisquer resíduos de solvente. Após a evaporação, os balões foram colocados por uma hora na estufa a 100°C e posteriormente pesados.

- *Acidez livre*

A 25 mL do extrato obtido na etapa de extração adicionaram-se 25 mL de etanol a 95% neutralizado, sendo a mistura titulada com NaOH 0,1 M, utilizando a fenolftaleína como indicador. O teor de acidez foi expresso em g de ácido oleico por 100 g de gordura e calculado através da seguinte equação:

$$\text{Acidez (g/100g gordura)} = (282 \times 0,1 \times V) / (25 \times m)$$

onde:

V – volume de NaOH gasto na titulação, expresso em ml

m – peso de gordura existente em 25 ml do extrato.

3.10 Determinação do aldeído malónico

- *Extração*

A determinação do aldeído malónico foi efetuada de acordo com a técnica descrita por Mendes *et al.* (2009). Num tubo de centrifuga rolhado foram pesados 10 g de amostra às quais foram adicionados 20 mL de ácido tricloroacético 7,5%, 25 mg de galato de propilo e 35 mg de EDTA. Após a homogeneização da solução em Polytron a 5000 rpm durante 1 minuto, procedeu-se a uma centrifugação a 6000 rpm durante 10 min, sendo o sobrenadante filtrado com papel de filtro Whatman nº 1. O filtrado resultante foi de novo filtrado em Acrodisc 0,2 µm PTFE, sendo 200 µL transferidos para

um vial do sistema cromatográfico e derivatizados pela adição de 20 μL de DNPH 5 mM em HCL 2 M, durante 30 minutos antes da injeção no HPLC.

- Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A análise por HPLC do complexo MA-DNPH foi realizada num módulo de separação Alliance 2695 utilizando uma coluna de fase reversa (Spherisorb ODS2, 4.6x 250 mm, 5 mm) da Waters (Milford, MA). A coluna foi eluída isocraticamente com uma fase móvel constituída por água:acetonitrilo:ácido acético (55: 45: 0,2 v/v/v) a uma velocidade de fluxo de 1 mL.min⁻¹. O derivado de DNPH-MA foi detetado num Photodiode Array (PDA) Waters 996 (Waters, Milford, MA) a 310 nm e quantificado através do método do padrão externo, utilizando-se uma solução de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) 2,5 mM em ácido tricloroacético a 7,5% como solução stock.

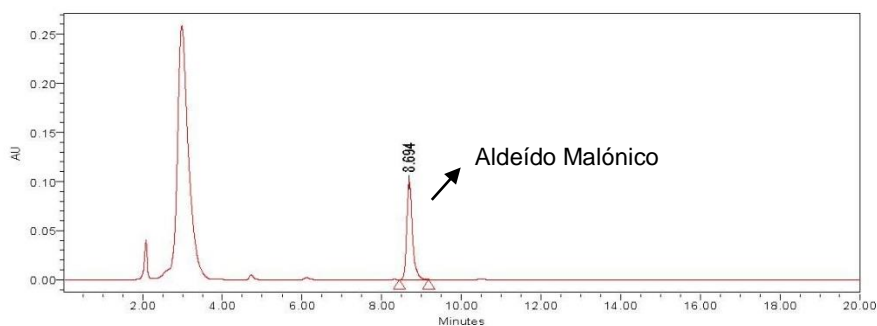


Figura 18 - Cromatograma da solução padrão do Aldeído Malónico.

3.11 Determinação das coenzimas Q9 e Q10

A determinação das coenzimas Q9 e Q10 (ubiquinona) foi efetuada com base na técnica descrita por Souchet & Laplante (2007), tendo no entanto sido necessário proceder a alterações das condições iniciais para aumentar a eficácia da extração. Para isso utilizaram-se 3 diferentes metodologias de extração de modo a otimizar o processo.

- Procedimento A (Souchet & Laplante, 2007)

Homogeneizou-se, em Polytron, 1 g de amostra juntamente com 5 mL de NaCl 0,15 M e 5 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1 M. Após a homogeneização retirou-se 1 mL da suspensão para um tubo de centrifuga rolhado e adicionou-se 2 mL de etanol e 5 mL de n-hexano, agitando-se vigorosamente em vortex durante 2 minutos. De seguida procedeu-se a uma centrifugação a 5000xg durante 5 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante, que consiste na fase orgânica de n-hexano, transferida para um erlenmeyer e a parte inferior novamente extraída com nova alíquota de 5 mL de n-hexano. Os 2 extratos foram combinados, e o n-hexano evaporado a 61°C, sendo o

resíduo colocado a 4°C durante a noite. O resíduo resultante da evaporação foi dissolvido em 2 mL de isopropanol, filtrado através de um Acrodisc PTFE 0,45µm e analisado por HPLC no mesmo dia de modo a prevenir uma possível degradação da amostra.

- Procedimento B

O procedimento B é idêntico ao procedimento A, com as seguintes alterações:

1. Aumento da toma da amostra para 2 g;
2. Utilização de SDS com uma concentração de 0,2 M;
3. Após a homogeneização em Polytron, foram utilizados 5 mL do homogeneizado, em vez de 1 mL.

- Procedimento C

O procedimento C é idêntico ao procedimento A, com as seguintes alterações:

1. Aumento da toma da amostra para 2 g;
2. Utilização de SDS com uma concentração de 0,2 M;

- Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A identificação e quantificação das coenzimas Q9 e Q10 foi efetuada num sistema HPLC da marca Waters constituído por um módulo de separação Alliance 2695 e um detetor de Photodiode Array (PDA) Waters 996 (Waters, Milford, MA). O software Empower Pro foi utilizado para análise dos cromatogramas obtidos.

A separação das coenzimas foi efetuada numa coluna Atlantis dC18 4.6x150mm, 3 µm, (Waters, Milford, MA) em fase isocrática e à temperatura ambiente. A fase móvel, constituída por acetonitrilo:tetrahidrofurano:água (55:40:5, v/v/v), foi utilizada à velocidade de fluxo de 1,5 mL min⁻¹. As coenzimas foram detetadas a 275 nm e quantificadas através do método do padrão externo.

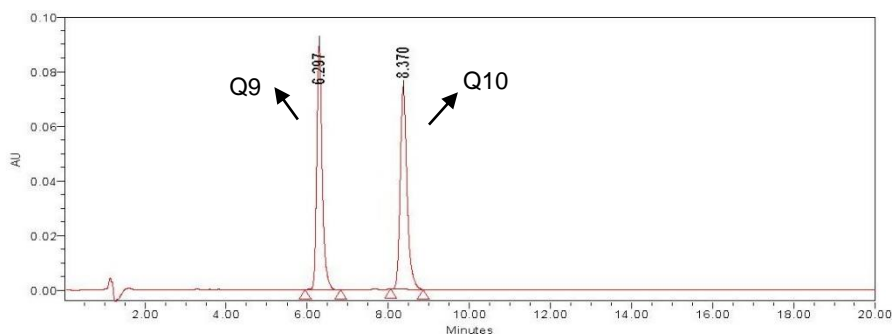


Figura 19 - Cromatograma da solução padrão das coenzimas.

3.12 Determinação dos dipéptidos bioativos e creatina

- Extração

Os dipéptidos bioativos e a creatina foram extraídos de acordo com o método proposto por Mora *et al.* (2007). Cinco gramas de amostra foram homogeneizados em Polytron PT 3100 (Kinematica AG, Suíça) na presença de 15 mL de HCl (0.01 M). O extrato foi então centrifugado a uma velocidade de 10 000xg durante 40 minutos a 4 °C (Sorvall Instruments, Wilmington, Delaware, EUA), sendo o sobrenadante sujeito a uma filtração a vácuo com filtro de fibra de vidro. A 2 ml do filtrado foram adicionados 6 ml de acetonitrilo sendo a mistura mantida em repouso durante 20 minutos a 4°C. Após este período, a mistura foi sujeita a uma nova centrifugação a 10000xg durante 10 minutos a 4°C sendo o sobrenadante novamente filtrado através de Acrodisc 0,45 µm.

- Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A análise cromatográfica dos péptidos bioativos foi efetuada num sistema HPLC da marca Waters constituído por um módulo de separação Alliance 2695 e um detetor de UV Waters 2487. Para a separação dos dipéptidos e da creatina utilizou-se uma coluna Atlantis HILIC sílica 4.6x150 mm, 3 µm (Waters, Milford, MA) à temperatura ambiente. A eluição foi efetuada em gradiente linear com uma mistura de acetato de amónio 0.65 mM (pH 5.5) em água/acetonitrilo (25:75) como solvente A e acetato de amónio 4.55 mM (pH 5.5) em água/acetonitrilo (70:30) como solvente B. O gradiente variou de 0 a 100% do solvente B em 13 min a uma velocidade de fluxo de 1,4 mL min⁻¹. A separação foi monitorizada usando um detetor UV/VIS (Waters 2487 Dual λ Absorbance detector, Waters, Milford, MA) a 214 nm.

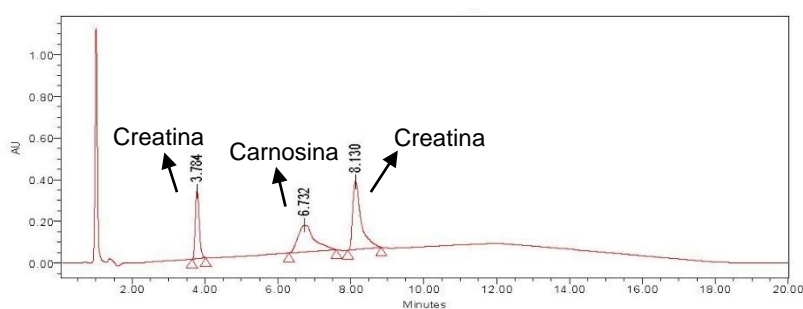


Figura 20 - Cromatograma da solução padrão dos dipéptidos.

3.13 Determinação Tocoferol, β -caroteno e colesterol

-Extração

A determinação do α -tocoferol, β -caroteno e colesterol foi efetuada simultaneamente por HPLC de acordo com o método descrito por Prates *et al.* (2006). A 5g de amostra foram adicionados 0,6 g de ácido ascórbico e 20 mL da solução de saponificação num tubo rolhado, sendo de seguida agitado em vortex e colocado em banho de água com agitação a 80°C durante 15 minutos. Findo este tempo, os tubos foram arrefecidos sob água corrente durante 1 minuto, adicionando-se, de seguida 6 mL de água destilada e 12 mL de solução de hidroxitolueno butilado. A mistura foi agitada em vortex durante 2 minutos e a camada superior filtrada por sulfato de anidro e através de Acrodisc 0,45 μ m.

- Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A separação e quantificação do α -tocoferol, β -caroteno e colesterol foi efetuada utilizando um sistema de HPLC Waters que consiste de uma bomba Waters 515, injetor automático (Waters 717) e dois detetores colocados em série (UV e Fluorescência) para a detecção simultânea dos 3 compostos em análise.

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna de sílica de fase normal (Waters, Milford, MA), usando eluição isocrática com uma mistura de isopropanol em n-hexano 1% (v / v) a uma velocidade de fluxo de 1 mL min⁻¹. A detecção foi efetuada em fluorescência para α -tocoferol (excitação 295 nm e emissão 325 nm) e UV para detecção do β -caroteno (450 nm) e colesterol (202 nm).

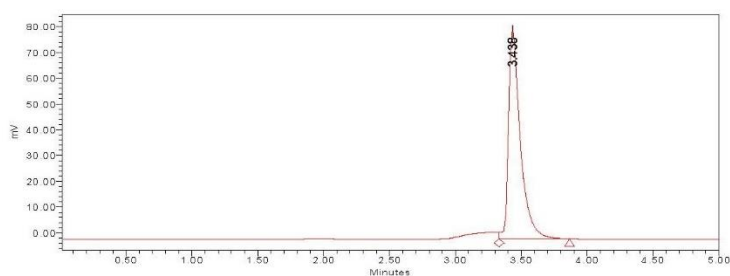


Figura 21 - Cromatograma da solução padrão do α -tocoferol.

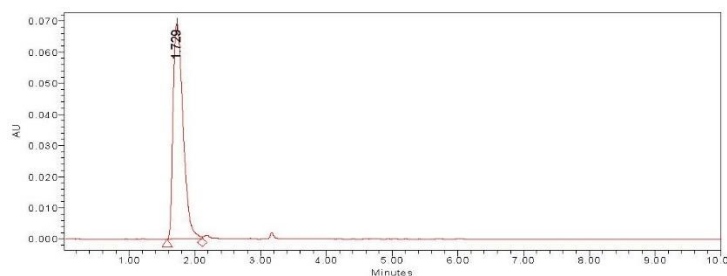


Figura 22 - Cromatograma da solução padrão do β -caroteno.

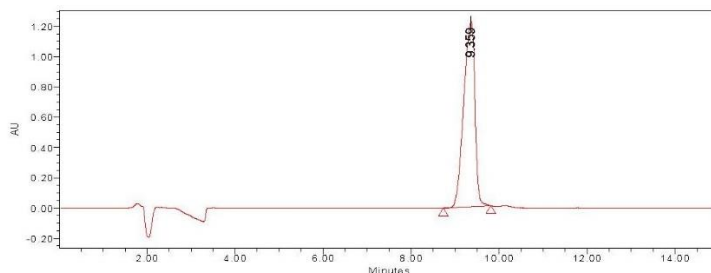


Figura 23 - Cromatograma da solução padrão do colesterol.

3.14 Determinação das aminas biogénicas

-Extração

As aminas biogénicas foram determinadas por HPLC seguindo a técnica descrita por Eerola *et al.* (1993) com algumas modificações. Num tubo de centrífuga, 5 g de amostra foram adicionados de 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 6% e a mistura homogeneizada em Polytron durante 3 minutos. Após a homogeneização procedeu-se a uma centrifugação a 10000xg durante 10 minutos a 4°C sendo o sobrenadante filtrado para um balão de 50 mL utilizando papel de filtro Whatman 41. O resíduo foi submetido a nova extração com 20 mL de TCA 6%, agitando a solução no vortex e repetida a centrifugação a 10000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado para o mesmo balão de 50 mL e o volume aferido utilizando TCA 6%.

-Derivatização dos extratos

Para a derivatização dos extratos, foram retirados 0,5 mL da solução preparada anteriormente, para um tubo de ensaio e adicionados de 100 μ L de solução de hidróxido de sódio 2N e 150 μ L de bicarbonato de sódio. De seguida foi adicionado 1 mL de cloreto de dansilo em acetona (10 mg/1 mL de acetona), tendo sido agitado ligeiramente no vortex e colocado na estufa a 40°C durante 45 minutos. Findo este tempo foram adicionados 50 μ L de amónia de modo a parar a reação. Após 30 minutos, foram adicionados 700 μ L de acetonitrilo e filtrado através de um Acrodisc 0,45 μ m.

- Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

As aminas biogénicas foram separadas e quantificadas num sistema de HPLC Waters constituído por um módulo de separação Alliance 2695 e um detetor de Photodiode Array (PDA) Waters 996 (Waters, Milford, MA).

A separação foi realizada numa coluna de fase reversa Spherisorb ODS2, 5 µm, 4,0x125 mm, utilizando um programa de eluição em gradiente com a seguinte mistura de solventes: acetato de amónio 0,1 M como solvente A e acetonitrilo como solvente B. O gradiente iniciou a 50% e terminou com 90% de acetonitrilo em 19 min. O teor de aminas biogénicas foi expresso em mg kg⁻¹ e a sua quantificação, efetuada por meio de calibração externa, com recurso a uma mistura de padrões individuais, de concentração conhecida, das 8 aminas em análise (triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina).

3.15 Cálculo dos Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

O limite de deteção é a menor concentração do analito que pode ser detetada na amostra, nas condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis. Neste estudo, considerou-se como limite de quantificação a concentração correspondente ao ponto mais baixo da curva de calibração, enquanto que o limite de deteção foi determinado pela comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração que produziu uma relação sinal/ruído de 3.

3.16 Taxa de recuperação

A taxa de recuperação (ou fator de recuperação) é definida como a relação da quantidade da substância a analisar que é extraída e passível de ser quantificada em função da quantidade presente ou adicionada (valor conhecido). No processo de adição, em geral, usa-se uma solução padrão da substância a analisar que é adicionada à matriz similar à amostra (branco) isenta da substância ou à amostra (fortificação, incorporação, termos provenientes do inglês “spiking”).

A taxa de recuperação é calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Taxa de Recuperação (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} * 100$$

Onde:

- C1 – concentração determinada na amostra adicionada
- C2 – concentração determinada na amostra não adicionada
- C3 – concentração adicionada

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, dependendo da complexidade do método analítico e da matriz da amostra, *r* pode ser de 50 a 120%, com desvio padrão relativo até 15%.

3.17 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi efetuada através do software JMP statistical (Version 9.0.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA, 2010).

A influência da adição dos diferentes antioxidantes adicionados e do tempo de maturação nos diversos parâmetros analisados (Ensaio 1) foi avaliada através de uma Análise de Variância (two-way ANOVA).

No Ensaio 2, o efeito do tipo de salga, adição de nitrito e tempo de maturação foi avaliado através de uma Análise de Variância (three-way ANOVA).

Quando os fatores ou as suas interações apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD post hoc test.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo referem-se aos diferentes procedimentos realizados, com vista ao estudo dos dois principais objetivos: Ensaio 1- Impacto da adição de antioxidantes como o Eritorbato, o Alecrim, e a Sálvia ao longo do tempo de maturação; Ensaio 2 – Impacto da salga ao ar e sob vácuo, com e sem nitrito ao longo do tempo de maturação.

4.1 Otimização do método de extração das coenzimas Q9 e Q10

Para a otimização do método de extração das coenzimas Q9 e Q10 foram testados os três procedimentos descritos no capítulo Material e Métodos, apresentando-se na Figura 24 os cromatogramas obtidos em cada um dos procedimentos. Da análise da figura é possível observar que a extração de coenzima Q9 permitiu obter teores idênticos nos três procedimentos (A=0,97, B=0,63 e C=0,83 mg/100g). Pelo contrário o procedimento B permitiu uma extração mais eficiente de coenzima Q10 (A=0,58, B=1,69 e C=0,67 mg/100g), tendo-se adotado este procedimento experimental para o estudo da influência dos diversos fatores neste composto bioativo.

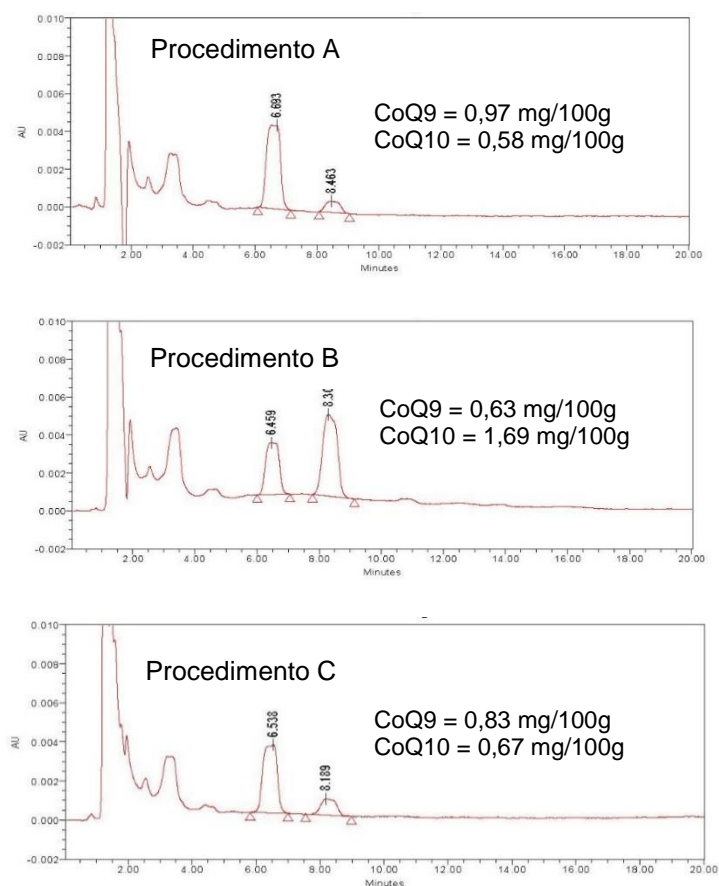


Figura 24 - Cromatogramas dos diferentes procedimentos testados para o estudo de otimização de extração das coenzimas.

4.2 Determinação das curvas padrão

De modo a proceder-se à quantificação das amostras, foi necessário realizar uma curva-padrão para cada composto a analisar.

As curvas padrão foram obtidas através da injeção de concentrações conhecidas dos padrões de cada composto, sendo apresentadas as respetivas equações e coeficientes de correlação na Tabela 4, sendo que a representação das retas se encontram no Anexo 7.1.

Tabela 4 - Equações da reta e respetivos coeficientes de correlação de cada composto analisado.

Composto	Equação da reta	Coefficiente de correlação (R ²)
Aldeído Malónico	$y = 18761x + 3607$	0,9993
Anserina	$y = 324983x + 1282,5$	0,9994
Carnosina	$y = 516273x - 4710,2$	0,9972
Creatina	$y = 992664x + 4723,5$	0,9992
Coenzima Q9	$y = 2301,1x + 314,45$	0,9996
Coenzima Q10	$y = 1917,1x - 1259,7$	0,9993
Colesterol	$y = 4 \times 10^6 x + 32719$	0,9991
α -Tocoferol	$y = 16713x - 389,77$	0,9997
β -Caroteno	$y = 173815x + 149,48$	0,9998
Triptamina	$y = 1721,9x + 755,31$	0,9934
Fenietilamina	$y = 1438,1x - 47,233$	0,9997
Putrescina	$y = 4752,3x - 536,38$	0,9969
Cadaverina	$y = 5326x - 248,85$	0,9986
Histamina	$y = 3921,3x - 283,22$	0,9993
Tiramina	$y = 3501x - 432,75$	0,9978
Espermidina	$y = 4538,3x - 509,74$	0,9977
Espermina	$y = 3083,2x - 387,27$	0,9978

4.3 Validação dos métodos cromatográficos

De modo a validar os métodos cromatográficos, foram realizados os cálculos das taxas de recuperação (TR), dos limites de deteção (LD) e limites de quantificação (LQ) para cada um dos compostos a analisar, encontrando-se os valores obtidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Taxa de recuperação, limites de detecção e de quantificação de cada composto analisado.

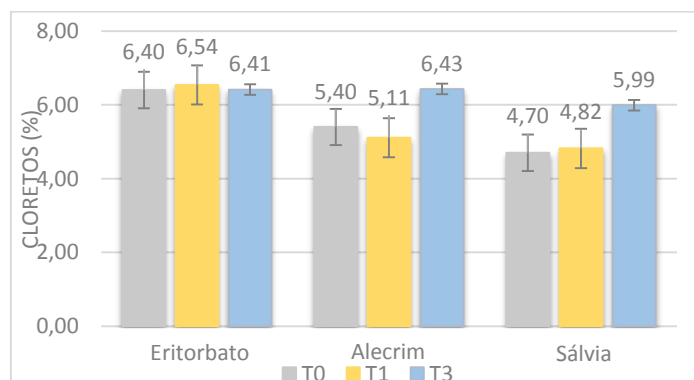
Composto	Taxa de Recuperação (%)	Limites de Detecção (LD)	Limites de Quantificação (LQ)
Aldéido Malônico (mg/Kg)	62,3	0,06	0,18
Coenzima Q9 (mg/100g)	33	0,33	0,98
Coenzima Q10 (mg/100g)	33	0,34	1,03
Anserina (mg/100g)	66,9	2,32	6,95
Carnosina (mg/100g)	64,8	11,08	33,24
Creatina (mg/100g)	100	4,13	12,40
α-Tocoferol (μg/g)	54,1	0,096	0,29
β-Caroteno (μg/g)	96,3	0,082	0,25
Colesterol (mg/g)	100	0,046	0,14
Triptamina (mg/Kg)	85,4	0,34	1,03
Fenietilamina (mg/Kg)	100	0,34	1,03
Putrescina (mg/Kg)	76,7	3,79	11,38
Cadaverina (mg/Kg)	98,6	2,89	8,68
Histamina (mg/Kg)	104,1	1,00	2,99
Tiramina (mg/Kg)	45	2,13	6,40
Espermidina (mg/Kg)	100	2,16	6,47
Espermina (mg/Kg)	110	2,55	7,65

4.5 Ensaio 1 – Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação

O Ensaio 1 foi realizado utilizando o músculo da categoria extra, tendo a salga sido realizada a vácuo e utilizando nitrito. Neste ensaio foi estudada a influência da adição de diferentes antioxidantes (eritorbato, alecrim e sálvia) nos diferentes compostos a analisar no produto final (T0), após maturação de 1 mês (T1) e com 3 meses de maturação (T3).

4.5.1 Cloretos

Na Figura 25 encontram-se os resultados obtidos para o teor de cloretos presente em cada amostra ao longo do tempo de maturação.

**Figura 25** - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de cloretos.

No processo de salga, a adição de sal foi efetuada de modo a que o produto final apresentasse cerca de 4% de teor de cloretos, podendo verificar-se, pela análise do gráfico da Figura 25, uma variação dos teores de sal entre 4,70% no produto final contendo sálvia e 6,54% no produto com eritorbato e 1 mês de maturação.

Esta variação no teor de cloretos nas diferentes amostras analisadas pode dever-se ao facto de a difusão dos aditivos, nomeadamente do sal, depender não só da quantidade adicionada, mas também da espessura da peça e da quantidade de gordura inter e intramuscular presente. Tendo em conta que dentro do mesmo músculo existem grandes variações nos teores de gordura, a penetração do sal no produto será diferente.

Tabela 6 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de cloretos nas diferentes amostras do Ensaio 1

Fator	F	p	Nível de significância
Antioxidante	430,06	<0,0001	***
Tempo	209,545	<0,0001	***
Antioxidante*Tempo	65,8776	<0,0001	***

4.5.2 Azoto dos Aminoácidos livres

O processo de hidrólise das proteínas, a que se dá o nome de proteólise, ocorre por ação de enzimas existentes no músculo do próprio peixe e/ou nos microrganismos eventualmente presentes. Neste processo, as proteínas originam compostos mais pequenos, péptidos e aminoácidos livres os quais podem ser determinados como um indicador do grau de proteólise existente.

Na Figura 26 encontram-se os resultados obtidos para o teor de azoto de aminoácidos livres presente em cada amostra ao longo do tempo de maturação.

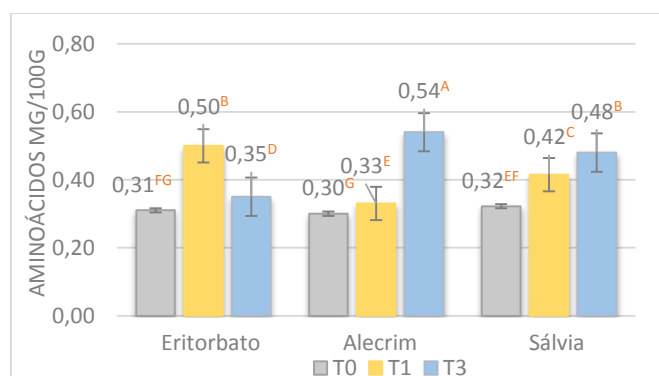


Figura 26 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de aminoácidos livres. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Através da análise de variância efetuada aos teores de azoto de aminoácidos livres (Tabela 7) é possível verificar-se uma influência altamente significativa do fator

antioxidante ($F=20,7697$, $p<0,0001$), apresentando as amostras adicionadas de sálvia, teores médios superiores, ($0,41\pm 0,05$ mg/100g) aos das amostras com alecrim ($0,39\pm 0,08$ mg/100g) e eritorbato ($0,39\pm 0,06$ mg/100g).

O fator tempo também revelou uma influência significativa nos teores de aminoácidos livres ($F=1101,58$, $p<0,0001$), verificando-se um aumento nesses teores com o aumento do tempo de maturação. O produto após o processo de secagem (T0) apresentou valores médios de $0,31\pm 0,01$ mg/100g, após 1 mês de maturação (T1) os valores médios subiram para $0,42\pm 0,05$ mg/100g e ao fim de 3 meses de maturação (T3) atingiu $0,46\pm 0,06$ mg/100g. Segundo Raemaekers e Demeyer (1996), esta evolução com o tempo de maturação seria esperada, pois em produtos maturados, como é o caso da muxama, a fração de aminoácidos livres aumenta por processos de proteólise, provocados por enzimas endógenas, procedentes do próprio alimento, ou por enzimas produzidas por microrganismos.

Tabela 7 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aminoácidos livres nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Fator	F	p	Nível de significância
Antioxidante	20,7697	<0,0001	***
Tempo	1101,58	<0,0001	***
Antioxidante*Tempo	522,4535	<0,0001	***

4.5.3 Gordura

Na Figura 27 encontram-se representados os valores obtidos para o teor de gordura presente nas diferentes amostras ao longo do tempo de maturação.

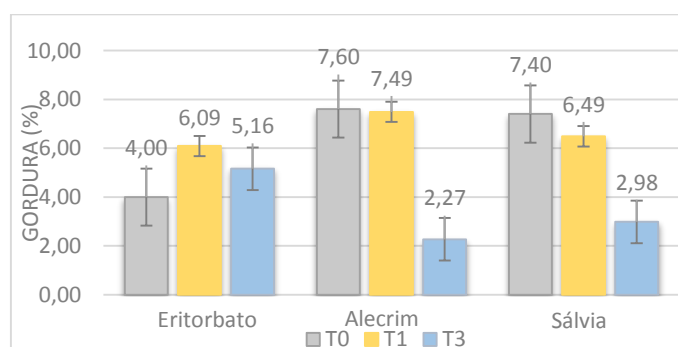


Figura 27 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de gordura.

A variação lipídica no músculo dos peixes depende do tipo de músculo e da parte do músculo analisado (Ackman, 1967). Apesar de haver vários estudos que referem uma variação da distribuição lipídica em função do músculo e da sua localização anatômica, não existe uma descrição estruturada desta distribuição para as várias espécies de peixe.

Pela análise do gráfico da Figura 27 podemos verificar que a variação dos teores de gordura observada nas muxamas produzidas nas várias condições em estudo foi relevante, variando desde 2,27% na amostra com alecrim após 3 meses de maturação até 7,60% na mesma amostra após a secagem (T0). A média de gordura das várias muxamas foi de $5,5 \pm 0,82\%$. É também de assinalar que o teor de gordura das várias amostras de matéria-prima (atum fresco) analisadas variou entre 2,65% e 6%, apresentando um teor médio de 4,30%. Peng *et al.* (2013), num estudo onde avaliaram a composição em lípidos de músculo de atum verificaram um teor de 1,93% e 2,06% para o atum albacora (*Thunnus albacares*) e atum patudo (*Thunnus obesus*), respetivamente.

Tendo em conta que dentro do mesmo músculo existem variações na distribuição de gordura, o ideal seria o uso do mesmo pedaço de músculo para a quantificação dos diversos compostos, o que foi impossível tendo em conta a quantidade de análises efetuadas neste trabalho experimental.

4.5.4 Acidez

Na Figura 28 encontram-se representados os resultados obtidos para o teor de acidez de cada amostra ao longo do tempo de maturação.

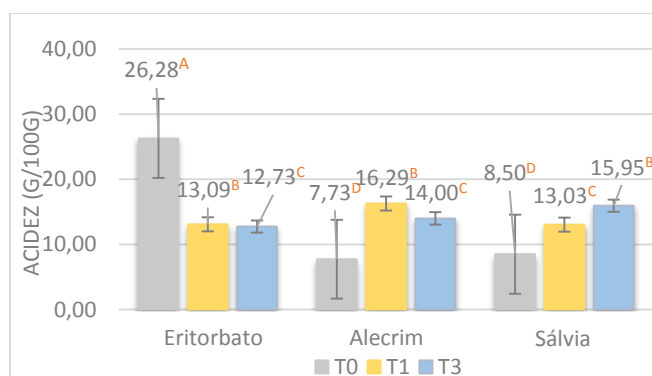


Figura 28 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de acidez. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Pela análise de variância efetuada aos teores de acidez (Tabela 8) é possível verificar-se uma influência significativa do fator antioxidante ($F=220,8399$, $p<0,0001$), apresentando as amostras com eritorbato um valor médio superior ($17,37 \pm 4,46$ g/100g) ao das amostras com alecrim ($12,67 \pm 2,56$ g/100g) e sálvia ($12,49 \pm 2,16$ g/100g).

Por seu lado a interação entre os fatores antioxidante e tempo também se mostrou significativamente influente ($F=450,27$, $p<0,0001$) no teor de acidez das amostras sendo possível verificar-se um aumento deste com o tempo de maturação

para a amostra com alecrim (T0:7,73±0,31 g/100g para T3:14,00±0,26 g/100g) e para a amostra com sálvia (T0: 8,50±0,22 g/100g para T3:15,95±0,7 g/100g) e uma diminuição da acidez para a amostra com eritorbato (T0:26,28±0,00 g/100g para T3:12,73±0,05 g/100g).

O aumento da acidez com o tempo de maturação nas amostras contendo sálvia e alecrim indicam um aumento da lipólise com o tempo de maturação.

Tabela 8 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de acidez nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Fator	F	p	Nível de significância
Antioxidante	220,8399	<0,0001	***
Tempo	0,0642	0,938	n.s
Antioxidante*Tempo	450,2653	<0,0001	***

4.5.5 Aldeído Malônico

Os teores de aldeído malônico, principal produto secundário resultante da oxidação lipídica, encontra-se na Figura 29.

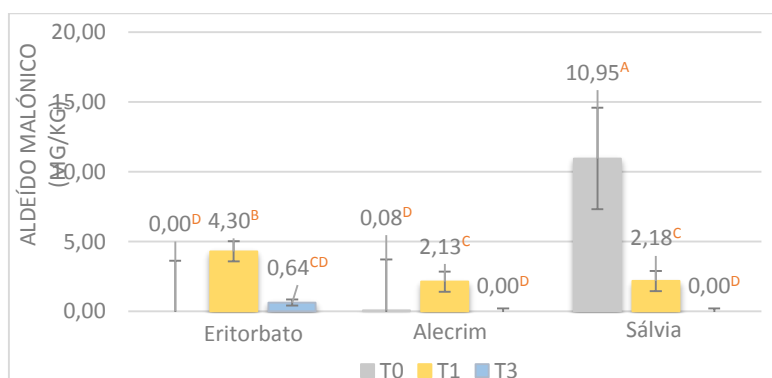


Figura 29 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de aldeído malônico. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

A análise de variância efetuada ao teor de aldeído malônico (Tabela 9) revelou um efeito altamente significativo do fator antioxidante ($F=136,6$; $p<0,0001$) verificando-se um menor teor de aldeído malônico e consequente menor oxidação, para as amostras com alecrim ($0,74\pm0,70$ mg/kg) comparativamente com as amostras de eritorbato ($1,65\pm1,34$ mg/kg) e de sálvia ($4,37\pm3,35$ mg/kg).

O fator tempo também revelou uma influência altamente significativa nos teores de aldeído malônico ($F=123,7$; $p<0,0001$), verificando-se uma diminuição dos teores com o aumento do tempo de maturação, revelando o produto final (T0) valores médios de $3,68\pm3,64$ mg/kg, com 1 mês de maturação (T1) $2,87\pm0,72$ mg/kg e após três meses de maturação (T3) atingiu um valor médio de $0,21\pm0,21$ mg/kg.

Sendo o aldeído malônico um produto secundário de oxidação lipídica, a sua quantificação permite determinar os danos oxidativos ocorridos numa determinada amostra, sendo a sua formação maior quanto maior for a oxidação lipídica (Kinter, 1995). Este estudo revelou a existência de uma maior oxidação na amostra com sálvia e uma menor oxidação na amostra com alecrim.

Para além de ser um indicador de oxidação lipídica, o aldeído malônico é um composto considerado carcinogénico e mutagénico, podendo o seu consumo ser prejudicial ao ser humano. Neste ensaio o valor médio obtido de aldeído malônico foi de $2,25 \pm 1,19$ mg/kg.

Tabela 9 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aldeído malônico nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Fator	F	p	Nível de significância
Antioxidante	136,6	<0,0001	***
Tempo	123,7	<0,0001	***
Antioxidante*Tempo	192,9	<0,0001	***

4.5.6 Coenzimas

Na Figura 30 encontram-se representados os valores das coenzimas Q9 e Q10 obtidos para cada amostra.

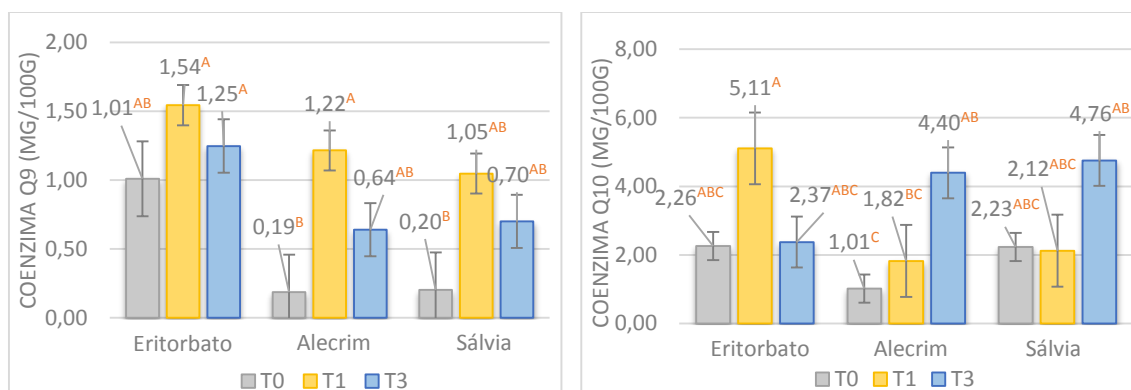


Figura 30 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, nos teores de coenzimas Q9 e Q10. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Na análise de variância realizada aos teores de coenzima Q9 (Tabela 10) foi possível verificar-se uma influência significativa do fator antioxidante ($F=12,07$; $p=0,003$) apresentando as amostras com eritorbato um valor superior ($1,27 \pm 0,15$ mg/100g) comparativamente às amostras com alecrim ($0,68 \pm 0,30$ mg/100g) e sálvia ($0,65 \pm 0,24$ mg/100g). O fator tempo mostrou também uma influência significativa nos teores de coenzima Q9 ($F=15,95$; $p=0,001$), havendo um aumento da sua concentração com o tempo de maturação. O produto após o processo de secagem (T0) apresentou valores

médios de $0,46 \pm 0,27$ mg/100g e ao fim de três meses de maturação (T3) atingiu um valor médio de $0,86 \pm 0,19$ mg/100g. A concentração média obtida para a coenzima Q9 neste ensaio foi de $0,87 \pm 0,16$ mg/100g.

De entre os fatores analisados, apenas o fator tempo teve uma influência significativa ($F=9,151$; $p=0,007$) sobre os teores de coenzima Q10, havendo um aumento da sua concentração com o tempo de maturação. O produto final após secagem (T0) apresentou valores médios de $1,83 \pm 0,41$ mg/100g, aumentando para $3,02 \pm 1,05$ mg/100g e $3,84 \pm 0,74$ mg/100g após 1 e 3 meses de maturação, respectivamente.

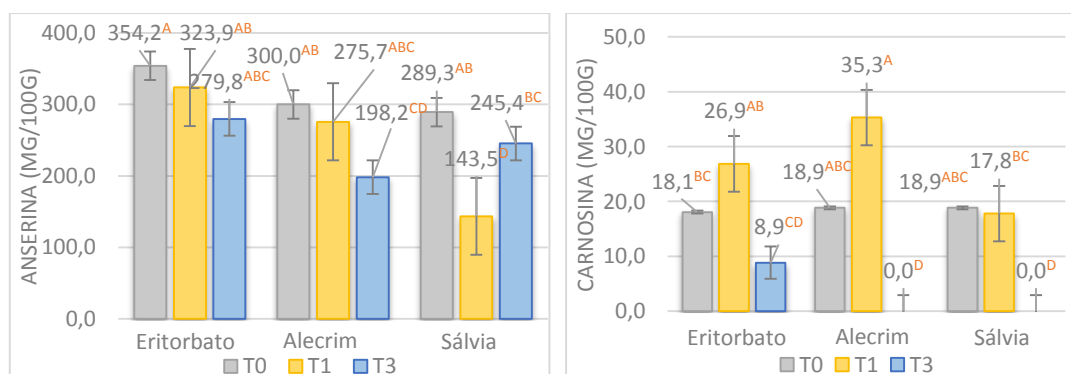
Kamei *et al.* (1986) obtiveram teores de coenzima Q10 no atum albacora (*Thunnus albacares*) de 2,07 mg/100g, valor este que se encontra na média de valores obtidos ($2,90 \pm 0,49$ mg/100g).

Tabela 10 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de coenzimas Q9 e Q10 nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Composto	Fator	F	p	Nível de significância
Q9	Antioxidante	12,07	0,003	**
	Tempo	15,95	0,001	**
	Antioxidante*Tempo	0,567	0,693	n.s
Q10	Antioxidante	1,697	0,237	n.s
	Tempo	9,151	0,007	**
	Antioxidante*Tempo	7,327	0,007	**

4.5.7 Péptidos de cadeia curta

Na Figura 31 encontram-se representados os teores de anserina, carnosina e creatina obtidos para cada amostra.



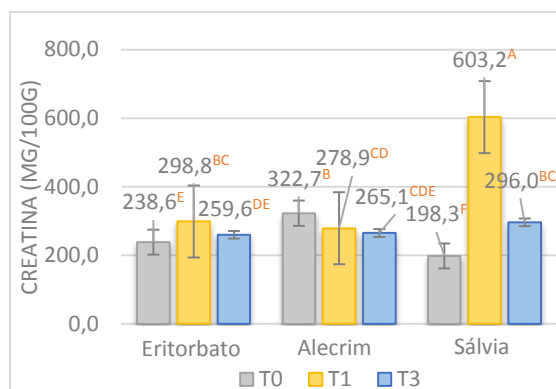


Figura 31 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor dos diferentes dipéptidos. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

A análise de variância efetuada aos teores de anserina (Tabela 11) revelou uma influência altamente significativa do fator antioxidante ($F=30,86$; $p<0,0001$) apresentando uma concentração maior nas amostras com eritorbato ($319,30\pm 21,61$ mg/100g) relativamente às amostras com alecrim ($257,98\pm 60,69$ mg/100g) e sálvia ($226,06\pm 43,20$ mg/100g). O fator tempo também mostrou uma influência significativa nos teores de anserina ($F=22,64$; $p<0,0001$) havendo uma diminuição da sua concentração com o aumento do tempo de maturação, tendo o produto após o processo de secagem (T0) uma concentração média de $314,50\pm 20,09$ mg/100g, com 1 mês de maturação (T1) $247,70\pm 53,95$ mg/100g e após três meses de maturação (T3) atingiu um valor médio de $241,15\pm 23,64$ mg/100g.

Ikeda (1980) verificou teores de anserina para o atum albacora (*Thunnus albacares*) de 234 mg/100g, o que se encontra dentro da média dos valores obtidos neste ensaio ($267,78\pm 21,45$ mg/100g).

Relativamente aos teores de carnosina, o fator tempo foi o que exerceu uma maior influência ($F=48,69$, $p<0,0001$), tendo-se verificado uma diminuição ao longo do tempo de maturação. O produto após o processo de secagem (T0) apresentou valores médios de $18,58\pm 0,27$ mg/100g e ao fim de três meses de maturação (T3) atingiu um valor médio de $2,95\pm 2,95$ mg/100g, revelando a amostra com 1 mês de maturação (T1) valores de $26,65\pm 5,05$ mg/100g. Os valores médios obtidos neste estudo para a carnosina ($16,06\pm 3,87$ mg/100g) encontram-se abaixo dos valores verificados por Ikeda (1980) no atum albacora (*Thunnus albacares*) (55 mg/100g).

No caso do teor de creatina, foi possível verificar-se uma influência altamente significativa do fator antioxidante ($F=200,3$; $p<0,0001$), sendo a concentração deste péptido superior nas amostras adicionadas de sálvia, cujo valor médio é de $365,85\pm 121,99$ mg/100g, relativamente às amostras com alecrim ($288,90\pm 17,37$

mg/100g) e eritorbato ($265,66 \pm 17,65$ mg/100g). O fator tempo também mostrou uma influência significativa nos teores de creatina ($F=419,5$; $p<0,0001$) havendo um aumento da sua concentração com o aumento do tempo de maturação, tendo o produto após o processo de secagem (T0) uma concentração média de $253,22 \pm 36,64$ mg/100g e ao fim de três meses de maturação (T3) um teor médio de 273,54 mg/100g.

Tabela 11 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de dipéptidos nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Composto	Fator	F	p	Nível de significância
Anserina	Antioxidante	30,86	<0,0001	***
	Tempo	22,64	0,0003	***
	Antioxidante*Tempo	11,18	0,0015	**
Carnosina	Antioxidante	3,73	0,066	n.s
	Tempo	48,69	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	3,901	0,042	*
Creatina	Antioxidante	200,3	<0,0001	***
	Tempo	419,5	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	354,4	<0,0001	***

4.5.8 α -Tocoferol

Na Figura 32 encontram-se representados os valores obtidos de α -tocoferol nas diferentes condições analisadas.

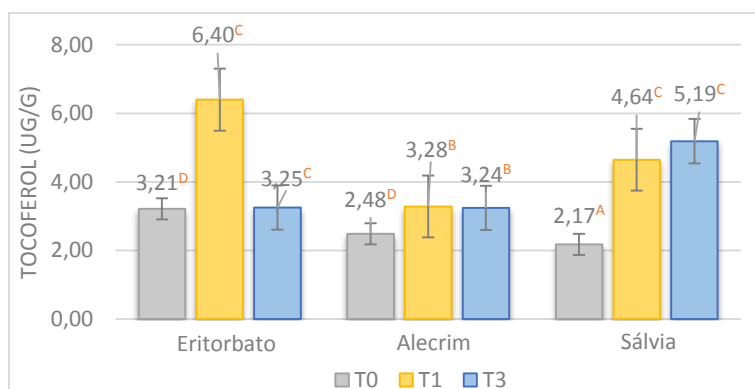


Figura 32 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de α -tocoferol. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

De entre os fatores analisados (Tabela 12), apenas o fator antioxidante teve uma influência significativa ($F=103,35$; $p<0,0001$) sobre os teores de α -tocoferol, apresentando a amostra produzidas com eritorbato uma concentração mais elevada ($4,29 \pm 1,06$ $\mu\text{g/g}$) comparativamente às amostras com sálvia ($4,00 \pm 0,93$ $\mu\text{g/g}$) e alecrim ($2,99 \pm 0,26$ $\mu\text{g/g}$).

As amostras analisadas neste estudo apresentaram em termos médios teores de α -tocoferol de $3,76 \pm 0,46$ $\mu\text{g/g}$ de músculo e $5,50 \pm 0,67\%$ de gordura, o que

corresponde a 68,36 mg de α -tocoferol/kg de gordura. Syväoja e Salminen (1985) observaram que peixes gordos apresentam um rácio tocoferol:gordura menor do que os peixes magros, sendo o teor médio de α -tocoferol nos peixes magros de 1100 mg/kg de gordura e 160 mg/kg de gordura nos peixes gordos. No nosso estudo os teores de α -tocoferol obtidos foram inferiores ao esperado, uma vez que o atum é considerado um peixe gordo.

Tabela 12 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de α -tocoferol nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Fator	F	p	Nível de significância
Antioxidante	103,35	<0,0001	***
Tempo	2,57	0,1306	n.s
Antioxidante*Tempo	230,61	<0,0001	***

4.5.9 β -Caroteno

Na Figura 33 encontram-se representados os valores obtidos de β -caroteno das amostras produzidas nas diferentes condições em estudo.

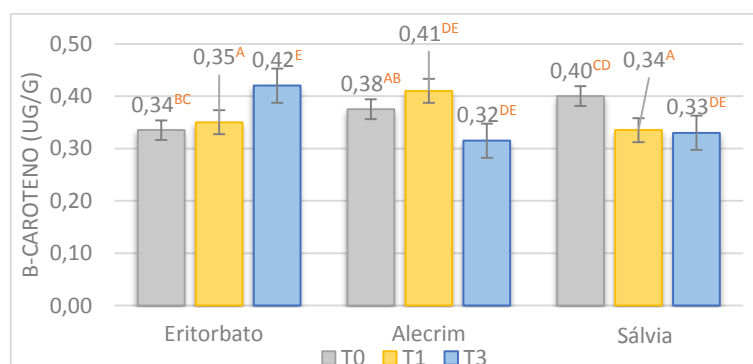


Figura 33 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de β -caroteno. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

O teor de β -caroteno nas diferentes amostras do ensaio 1 foi significativamente influenciado pelo fator tempo ($F=94,75$; $p<0,0001$) (Tabela 13), havendo uma diminuição da concentração com o tempo de maturação, apresentando o produto após o processo de secagem (T0) valores médios de $0,37\pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$, após um mês de maturação (T1) uma concentração média de $0,37\pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ e ao fim de três meses de maturação (T3) um valor médio de $0,36\pm 0,03$ $\mu\text{g/g}$.

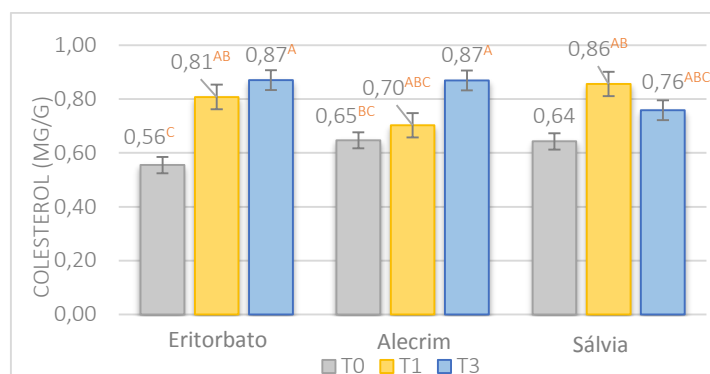
As amostras apresentaram concentrações médias de β -caroteno de $0,36\pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$, no entanto as concentrações deste antioxidante nos peixes variam consoante a dieta, o tamanho e o sexo do peixe (Hatlen *et al.*, 1995).

Tabela 13 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de β -caroteno nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Fator	F	p	Nível de significância
Antioxidante	4,75	0,0391	*
Tempo	94,75	<0,0001	***
Antioxidante*Tempo	41	<0,0001	***

4.5.10 Colesterol

Na Figura 34 encontram-se representados os valores obtidos de colesterol para cada amostra.

**Figura 34** - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor de colesterol. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

A análise de variância efetuada para os valores obtidos de colesterol (Tabela 14) revelou uma influência significativa do fator tempo ($F=26,19$; $p=0,0002$) havendo um aumento da concentração com o tempo de maturação, sendo que o produto no T0 apresentou valores médios de $0,62\pm 0,03$ mg/g, no T1 $0,79\pm 0,05$ mg/g e no T3 atingiu valores médios de $0,83\pm 0,04$ mg/g.

As amostras apresentaram em média, concentrações de colesterol ($0,75\pm 0,04$ mg/g) bastante inferiores ao limite de 300 mg recomendado pela FAO (1994).

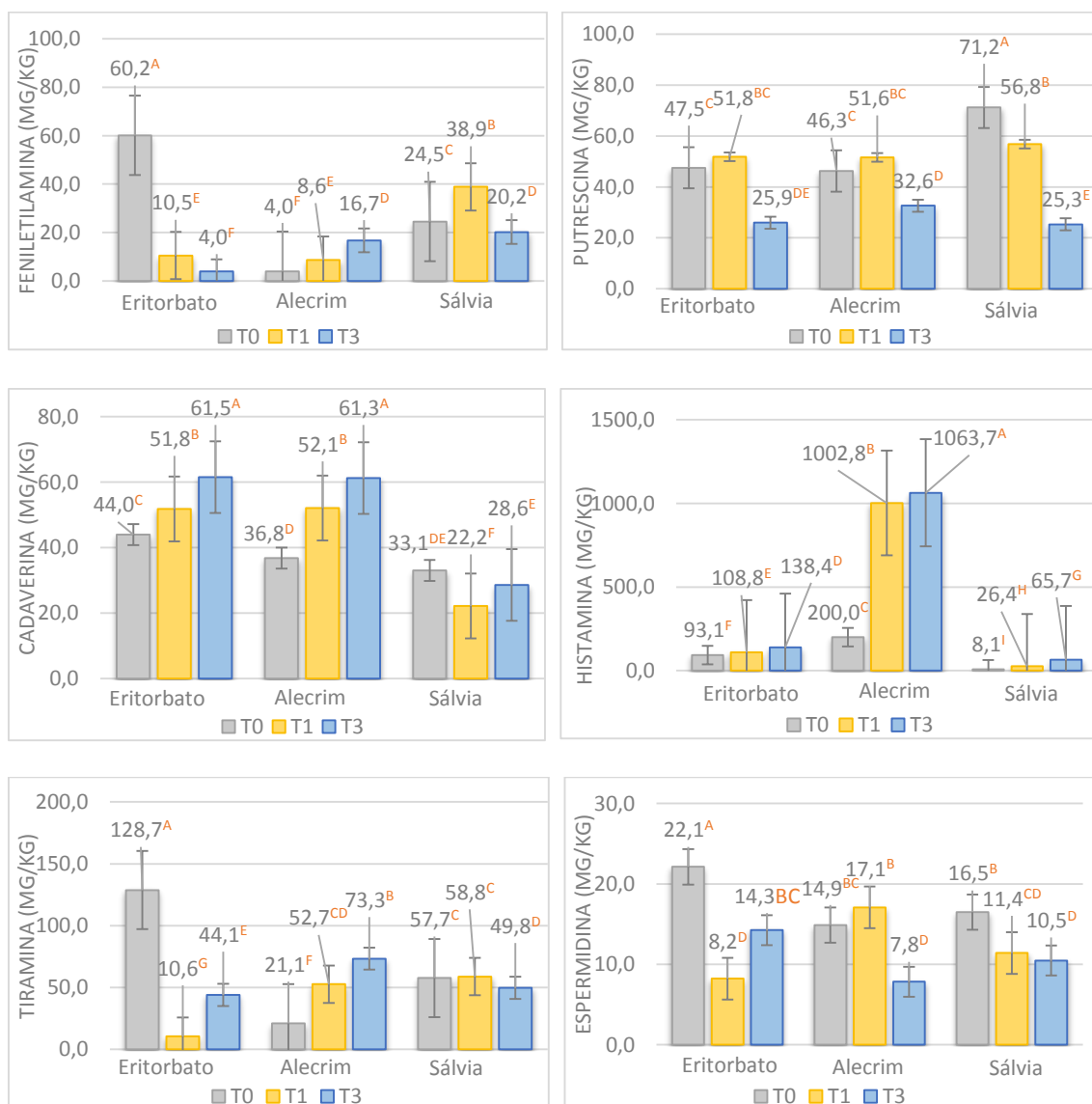
Tabela 14 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de colesterol nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Fator	F	p	Nível de significância
Antioxidante	0,111	0,895	n.s
Tempo	26,19	0,0002	***
Antioxidante*Tempo	4,245	0,033	*

4.5.11 Aminas Biogênicas

As aminas biogênicas são compostos produzidos a partir da descarboxilação enzimática dos aminoácidos livres, a cargo de microrganismos presentes no músculo do peixe. A ingestão de elevadas quantidades destes compostos, nomeadamente histamina e tiramina, está normalmente associada a vários problemas alérgicos. Os peixes da família *Scombridae* apresentam teores mais elevados de histidina livre (aminoácido precursor da histamina), apresentando uma maior probabilidade de provocar intoxicação histamínica, caso se estabeleçam as condições apropriadas. Assim, foi também objetivo deste estudo avaliar a propensão para a formação de aminas biogênicas na muxama em função de diferentes fatores tecnológicos.

Na Figura 35 encontram-se representados os resultados obtidos para o teor das aminas biogênicas nas diferentes amostras ao longo do tempo de maturação.



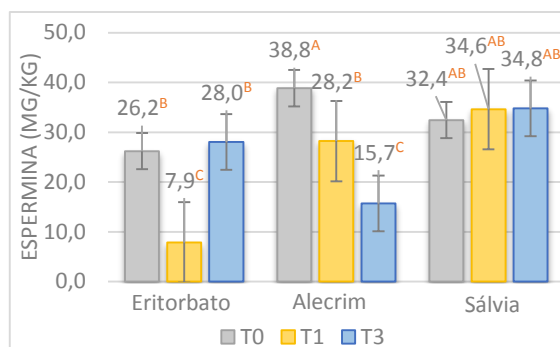


Figura 35 - Influência dos antioxidantes ao longo do tempo de maturação, no teor das diferentes aminas biogénicas. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Através da análise de variância efetuada aos valores obtidos (Tabela 15) foi possível verificar que o fator antioxidante revelou uma influência significativa no teor de todas as aminas biogénicas. A amostra com Eritorbato apresentou um teor médio superior de cadaverina ($52,44 \pm 5,07$ mg/kg), tiramina ($61,15 \pm 35,15$ mg/kg) e de espermidina ($20,70 \pm 6,44$ mg/kg) relativamente às outras amostras. Os produtos com alecrim apresentaram valores superiores para o teor de histamina, sendo a concentração média de $755,50 \pm 278,30$ mg/kg. Por seu lado os produtos com sálvia apresentaram, relativamente às restantes amostras, uma concentração superior de feniletilamina ($27,85 \pm 5,06$ mg/kg), de putrescina ($51,09 \pm 13,56$ mg/kg) e de espermina ($33,95 \pm 0,76$ mg/kg).

O fator tempo também revelou uma influência significativa nos teores de todas as aminas biogénicas, verificando-se apenas um aumento nos teores de cadaverina e de histamina ao longo do tempo de maturação, tendo a cadaverina e a histamina apresentado um teor médio de $37,96 \pm 3,21$ mg/kg e $100,38 \pm 55,53$ mg/kg nas amostras avaliadas após processo de secagem (T0) e um teor médio de $50,47 \pm 10,94$ mg/kg e $422,59 \pm 321,26$ mg/kg, nas amostras com 3 meses de maturação. As restantes aminas apresentaram uma diminuição na concentração ao longo do tempo de maturação: feniletilamina (T0: $29,55 \pm 16,42$ mg/kg para T3: $13,62 \pm 4,93$ mg/kg), putrescina (T0: $55,01 \pm 8,11$ mg/kg para T3: $27,94 \pm 2,34$ mg/kg), tiramina (T0: $69,19 \pm 16,83$ mg/kg para T3: $55,73 \pm 8,95$ mg/kg), espermidina (T0: $17,83 \pm 2,19$ mg/kg para T3: $10,85 \pm 1,86$ mg/kg) e a espermina (T0: $32,49 \pm 3,65$ mg/kg para T3: $26,18 \pm 5,58$ mg/kg).

Uma grande quantidade de aminas biogénicas presentes em qualquer alimento, em geral, indica que houve condições favoráveis para a proliferação de microrganismos com a capacidade de descarboxilar os aminoácidos livres, resultantes de uma proteólise. O teor de aminas biogénicas aumenta após a captura do peixe devido à elevada quantidade de enzimas proteolíticas presentes no seu trato intestinal,

combinada com o rápido processo autolítico que se desenvolve *post-mortem*, podendo, assim o teor de aminas biogénicas servir como um indicador da qualidade do pescado.

Os teores de histamina encontrados neste ensaio ($300,77 \pm 139,82$ mg/kg) ultrapassam o limite de 200 mg/kg estabelecido pelo regulamento (CE) N^o 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 para os produtos da pesca submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura, fabricados a partir de espécies de peixe associados a um elevado teor de histidina. Pela análise dos Índices de aminas biogénicas apresentados na Tabela 16 é possível verificar que todas as amostras revelaram uma qualidade imprópria para consumo humano. Esta concentração excessiva de aminas biogénicas deve-se a uma possível contaminação inicial da matéria-prima e tendo em conta que neste ensaio foram utilizados diferentes atuns, podem existir diferentes concentrações no mesmo tipo de condição imposta.

Tabela 15 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor das diferentes aminas biogénicas nas diferentes amostras do Ensaio 1.

Composto	Fator	F	p	Nível de significância
Feniletilamina	Antioxidante	484,063	<0,0001	***
	Tempo	335,238	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	760,6696	<0,0001	***
Putrescina	Antioxidante	50,2128	<0,0001	***
	Tempo	469,1172	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	50,3276	<0,0001	***
Cadaverina	Antioxidante	513,7609	<0,0001	***
	Tempo	114,5891	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	64,5803	<0,0001	***
Histamina	Antioxidante	212942,9	<0,0001	***
	Tempo	41564,39	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	32164,3	<0,0001	***
Tiramina	Antioxidante	133,5084	<0,0001	***
	Tempo	759,254	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	2303,684	<0,0001	***
Espermidina	Antioxidante	8,1383	0,0096	**
	Tempo	93,9444	<0,0001	***
	Antioxidante*Tempo	47,6026	<0,0001	***
Espermina	Antioxidante	52,5336	<0,0001	***
	Tempo	25,149	0,0002	***
	Antioxidante*Tempo	39,2154	<0,0001	***

Tabela 16 - Índice de aminas biogênicas para cada amostra do Ensaio 1.

Amostra	IAB	Qualidade
Eritorbato	T0	5,8
	T1	83,9
	T2	5,2
Alecrim	T0	5,2
	T1	36,1
	T2	63,6
Sálvia	T0	2,3
	T1	2,2
	T2	2,6

4.6 Ensaio 2 – Influência da salga a vácuo e ao ar, com e sem adição de nitrito ao longo do tempo de maturação

No Ensaio 2 utilizou-se o músculo da 1ª categoria, tendo sido analisado o tipo de salga (a vácuo e ao ar) e a adição de nitrito no produto final (T0), após um período de maturação de 1 mês (T1) e ao fim de três meses de maturação (T3).

4.6.1 Cloretos

Na Figura 36 encontram-se representados os valores obtidos para o teor de cloretos presente nas diferentes amostras ao longo do tempo de maturação.

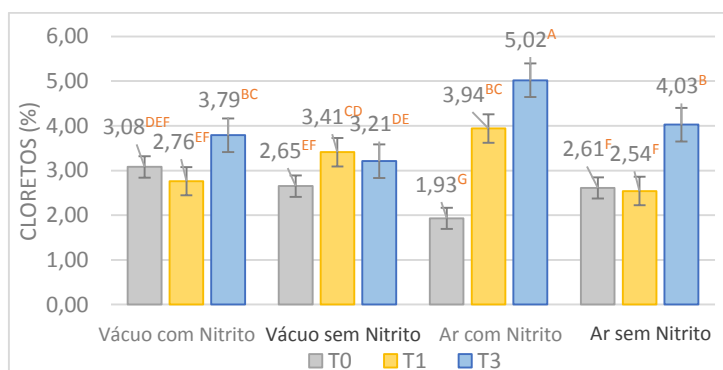


Figura 36 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de cloretos. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Neste ensaio a adição de sal foi efetuada de modo a que o produto final contivesse cerca de 4% de teor de cloretos. Na verdade a média obtida para os produtos produzidos neste ensaio foi de $3,25 \pm 0,24\%$. No entanto, pela análise do gráfico da Figura 36 é possível verificar-se uma variação dos teores de sal entre 1,93% na amostra cuja salga foi efetuada ao ar após secagem e 5,02% para a amostra cuja salga foi efetuada ao ar com três meses de maturação. Esta variação no teor de cloretos, tal

como no Ensaio 1 poderá ser explicada pela variação existente na difusão do aditivo nas diferentes partes do músculo.

Tabela 17 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de cloretos nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Salga	9,0036	0,0062	
Nitrito	28,7468	<0,0001	***
Tempo	167,664	<0,0001	***
Salga*Nitrito	12,3001	0,0018	
Salga*Tempo	52,1765	<0,0001	***
Nitrito*Tempo	16,7513	<0,0001	***
Salga*Nitrito*Tempo	49,8138	<0,0001	***

4.6.2 Azoto dos Aminoácidos livres

Na figura 37 estão representados os valores médios obtidos deste parâmetro indicador do nível de proteólise, para as diferentes condições tecnológicas e tempos de maturação ensaiados.

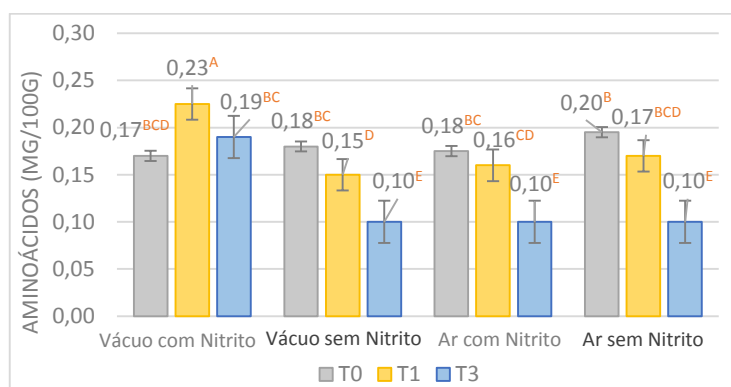


Figura 37 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de aminoácidos livres. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Através da análise de variância efetuada (Tabela 18) são evidenciadas influências significativas para todos os fatores estudados considerados de forma isolada ou como resultado da respetiva interação ($p < 0,0001$). Porém o nível de afetação dos resultados revelou-se, como era expectável, consideravelmente superior para o tempo de maturação ($F=172,42$), seguindo-se a interação entre o tipo de salga e a adição de nitrito ($F=102,09$).

Apesar da tendência para uma redução dos valores médios com o tempo de maturação, este registo só se expressa para a condição de salga sob vácuo sem adição de nitrito e para a realizada ao ar, independentemente da adição ou não de nitrito. Para a salga a vácuo com adição de nitrito verifica-se, pelo contrário, um aumento do teor

médio entre o produto analisado no fim do processamento (T0) ($0,17\pm 0,02$ mg/100g) e após um mês de maturação ($0,23\pm 0,01$ mg/100g), registando-se ao fim de três meses de maturação (T3) uma queda ligeira mas significativa dos valores obtidos ($0,19\pm 0,01$ mg/100g).

No que respeita ao tipo de salga, as amostras obtidas do processo sob vácuo apresentaram um teor médio superior ($0,17\pm 0,02$ mg/100g) ao das amostras realizadas ao ar ($0,15\pm 0,02$ mg/100g). As amostras às quais foram adicionadas nitrito demonstraram também um teor superior ($0,17\pm 0,02$ mg/100g) comparativamente às amostras processadas sem recurso ao nitrito ($0,15\pm 0,02$ mg/100g).

A fração azotada dos ácidos aminados livres está relacionada com a atividade dos agentes enzimáticos intrínsecos (protéases musculares) e extrínsecos (protéases e descarboxilases microbianas) (Raemaekers & Demeyer, 1996).

Os resultados obtidos neste estudo refletem uma perda progressiva da atividade proteolítica dos principais agentes envolvidos, ao longo do tempo de maturação, associada provavelmente ao aumento da força iónica do meio. Outro dos mecanismos possivelmente envolvidos nesta redução está relacionada com a atividade microbiana da microbiota de contaminação, nomeadamente no que diz respeito à formação de aminas biogénicas, utilizando para este efeito os aminoácidos acumulados pela atividade proteolítica.

Tabela 18 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aminoácidos livres nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Tipo de Salga	40,9553	<0,0001	***
Adição de Nitrito	49,8403	<0,0001	***
Tempo	172,4206	<0,0001	***
Tipo de Salga*Adição de Nitrito	102,0851	<0,0001	***
Tipo de Salga*Tempo	29,8995	<0,0001	***
Adição de Nitrito*Tempo	37,1301	<0,0001	***
Salga*Nitrito*Tempo	17,8853	<0,0001	***

4.6.3 Gordura

Na Figura 38 encontram-se representados os valores obtidos de gordura para as amostras produzidas nas diferentes condições em estudo ao longo do tempo de maturação.

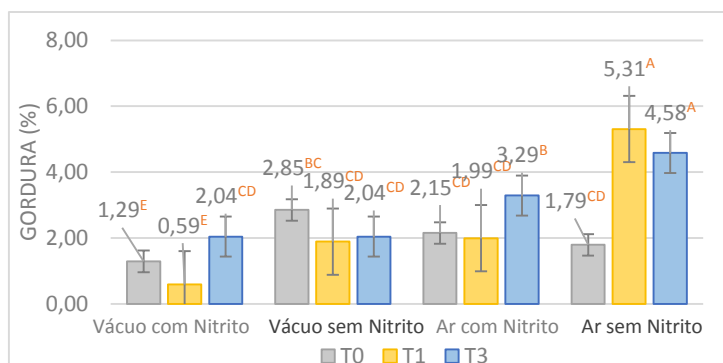


Figura 38 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de gordura. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Tal como no ensaio 1, também no músculo da 1ª categoria é possível verificarem-se variações nos teores de gordura, variando este entre 0,59% na amostra cuja salga foi efetuada a vácuo e com a adição de nitrito, e 5,31% na amostra cuja salga foi efetuada ao ar e sem a adição de nitrito. Tal como foi já explicado anteriormente na análise dos dados do ensaio 1 e demonstrado por Katikou *et al.* (2001) existe uma grande variação nos teores de gordura em função do tipo de músculo e da região dentro do próprio músculo. O valor médio de gordura obtido para as diferentes amostras utilizadas neste ensaio foi de $2,48 \pm 0,39\%$.

Tabela 19 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de gordura nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Salga	127,4004	<0,0001	***
Nitrito	91,017	<0,0001	***
Tempo	20,3552	<0,0001	***
Salga*Nitrito	3,4905	0,074	n.s
Salga*Tempo	38,0342	<0,0001	***
Nitrito*Tempo	20,4964	<0,0001	***
Salga*Nitrito*Tempo	23,6372	<0,0001	***

4.6.4 Acidez

O teor de acidez obtido para as diferentes amostras após a secagem e as mantidas durante 1 e 3 meses de maturação está apresentado na Figura 39.

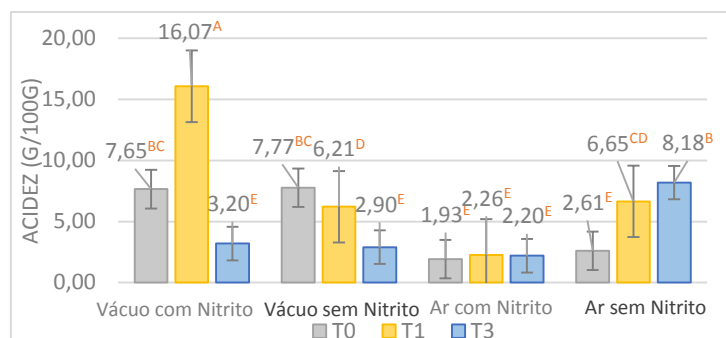


Figura 39 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de acidez. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

O teor de acidez das amostras foi significativamente influenciado pelo tipo de salga ($F=442,296$, $p<0,0001$) (Tabela 20), tendo-se verificado um teor de acidez superior para as amostras cuja salga foi efetuada a vácuo, ($7,30\pm 1,95$ g/100g), comparativamente às amostras cuja salga foi efetuada ao ar que apresentou valores de $3,97\pm 1,11$ g/100g (Figura 34).

Apesar do fator tempo não ser significativo nos teores de acidez, a interação entre o fator tipo de salga e o fator tempo mostrou uma influência significativa, havendo uma diminuição nos teores de acidez ao longo do tempo de maturação para as amostras salgadas sob vácuo (T0: $7,71\pm 0,06$ g/100g para T3: $3,04\pm 1,58$ g/100g) e um aumento nesses teores para as amostras salgadas ao ar (T0: $2,27\pm 0,34$ g/100g para T3: $5,19\pm 2,99$ g/100g). Estes dados apontam para o facto da salga efetuada a vácuo inibir a lipólise ao longo do tempo de maturação, diminuindo os teores de acidez.

Tabela 20 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de acidez nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Tipo de Salga	442,296	<0,0001	***
Adição de Nitrito	1,1511	0,294	n.s
Tempo	196,7432	<0,0001	***
Tipo de Salga*Adição de Nitrito	493,6327	<0,0001	***
Tipo de Salga*Tempo	304,022	<0,0001	***
Adição de Nitrito*Tempo	104,1279	<0,0001	***
Salga*Nitrito*Tempo	157,6722	<0,0001	***

4.6.5 Aldeído Malónico

Na Figura 40 encontram-se representados os valores obtidos para o teor de aldeído malónico presente nas diferentes amostras ao longo do tempo.

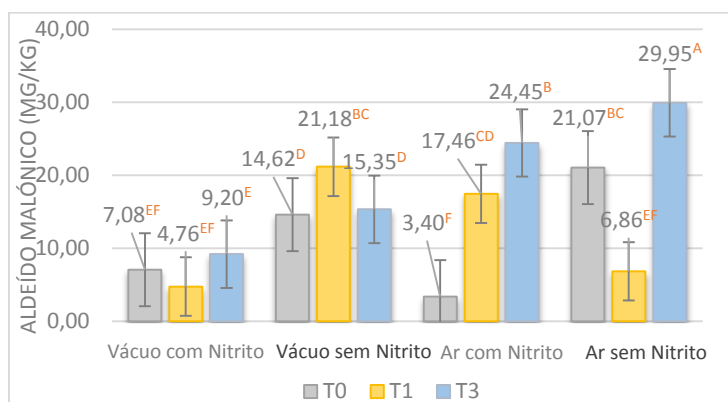


Figura 40 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de aldeído malónico. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

A análise de variância efetuada (Tabela 21) nas diferentes amostras revelou efeitos altamente significativos para todos os fatores e respetivas interações ($p < 0,0001$), sendo o impacto associado ao fator nitrito consideravelmente mais elevado ($F = 217,86$) comparativamente aos restantes. Esta relevância da presença do nitrito na evolução do processo oxidativo expressa-se por uma redução dos teores de aldeído malónico nas amostras com nitrito ($11,05 \pm 3,36$ mg/kg) comparativamente com as que não têm nitrito ($17,19 \pm 4,19$ mg/kg). Esta redução nos teores de aldeído malónico devem-se fundamentalmente ao facto crucial deste aditivo estabilizar o pigmento hémico (mioglobina e hemoglobina) das amostras através da formação de nitrosomioglobina, minimizando a libertação do ferro incluso de carácter extremamente oxidante.

A menor prevalência de aldeído malónico nas amostras processadas sob vácuo ($12,03 \pm 2,50$ mg/kg) comparativamente às salgadas ao ar ($17,19 \pm 4,19$ mg/kg) confirma a importância das substâncias reativas ao oxigénio, no desenvolvimento do processo oxidativo.

A maior concentração deste produto da oxidação lipídica em função do tempo de maturação ensaiado (T0: $11,54 \pm 4,55$ mg/kg, T1: $12,56 \pm 4,61$ mg/kg e T3: $19,74 \pm 5,34$ mg/kg) confirma o carácter acumulativo destes compostos secundários do processo oxidativo, apesar da possibilidade da respetiva conjugação com elementos resultantes da proteólise, tornando-se indetetável pelo método utilizado para este efeito.

Tabela 21 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aldeído malônico nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Tipo de Salga	114,88	<0,0001	***
Adição de Nitrito	217,86	<0,0001	***
Tempo	114,46	<0,0001	***
Tipo de Salga*Adição de Nitrito	104,19	<0,0001	***
Tipo de Salga*Tempo	35,52	<0,0001	***
Adição de Nitrito*Tempo	36,736	<0,0001	***
Salga*Nitrito*Tempo	130,99	<0,0001	***

4.6.6 Coenzimas

Na Figura 41 encontram-se representados os valores obtidos para o teor de coenzimas presente nas diferentes amostras ao longo do tempo.

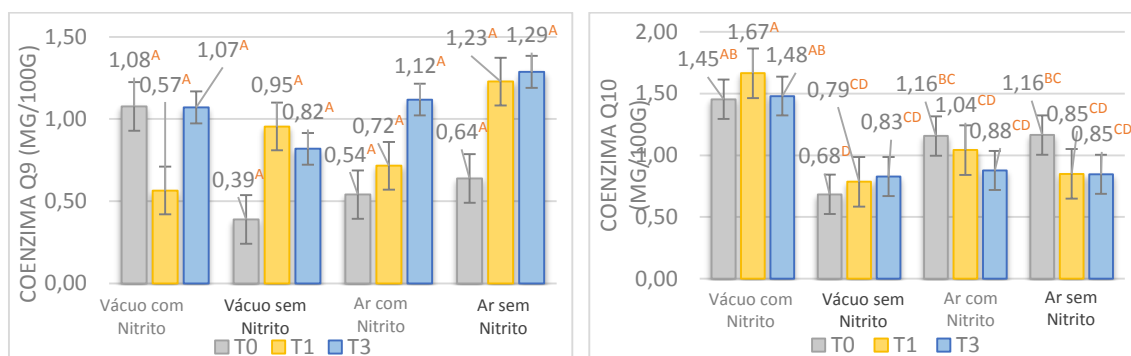


Figura 41 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de coenzimas. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

De entre os fatores analisados (Tabela 22), apenas o tempo de maturação afetou significativamente ($F=6,4973$, $p=0,0122$) os teores de coenzima Q9, tendo-se verificado um aumento dos teores com o tempo de maturação apresentando o produto no T0 valores médios de $0,66 \pm 0,15$ mg/100g, no T1 valores médios de $0,87 \pm 0,14$ mg/100g e no T3 atingiu um valor médio de $1,07 \pm 0,10$ mg/100g. Registou-se uma influência significativa das interações tipo de salga com tempo e da adição de nitrito com o tempo.

Na análise de variância realizada aos teores de coenzima Q10 foi possível verificar-se uma influência significativa da adição de nitrito ($F=105,38$, $p<0,0001$) tendo este fator apresentado valores mais elevados para as amostras contendo nitrito ($1,28 \pm 0,12$ mg/100g) do que para as que não foi adicionado nitrito ($0,86 \pm 0,08$ mg/100g). Outro fator que também apresentou influência nos teores de coenzima Q10 foi o tipo de salga, revelando uma maior quantidade desta coenzima nas amostras cuja salga foi

efetuada a vácuo, com valores médios de $1,15 \pm 0,18$ mg/100g do que nas amostras cuja salga foi realizada ao ar, apresentando estas um valor médio de $0,99 \pm 0,06$ mg/100g.

Os valores médios de Q10 registados em atum por Kamei *et al.* (1986) (2,07 mg/100g) bem como os verificados por Weber *et al.* (1997) em diferentes espécies de peixe (entre 4 e 27 mg/100g) não se confirmaram neste estudo, que se apresentaram consideravelmente mais baixos ($1,07 \pm 0,09$ mg/100g na muxama, correspondendo a 0,642 mg/100g na matéria-prima).

Tabela 22 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de coenzimas nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Composto	Fator	F	p	Nível de significância
Q9	Tipo de Salga	1,3236	0,2724	n.s
	Adição de Nitrito	0,1611	0,6952	n.s
	Tempo	6,4973	0,0122	**
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	1,8428	0,2005	n.s
	Tipo de Salga*Tempo	5,4338	0,0209	*
	Adição de Nitrito*Tempo	5,7553	0,0336	*
	Salga*Nitrito*Tempo	1,0576	0,3775	n.s
Q10	Tipo de Salga	15,514	0,002	**
	Adição de Nitrito	105,38	<0,0001	***
	Tempo	2,339	0,1387	n.s
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	9,6277	0,0032	**
	Tipo de Salga*Tempo	2,2007	0,1534	n.s
	Adição de Nitrito*Tempo	71,731	<,0001	***
	Salga*Nitrito*Tempo	0,2466	0,7853	n.s

4.6.7 Péptidos de cadeia curta

Na Figura 42 encontram-se representados os valores médios de anserina e creatina na muxama, em função dos fatores tecnológicos e do tempo de maturação considerados no âmbito do presente estudo.

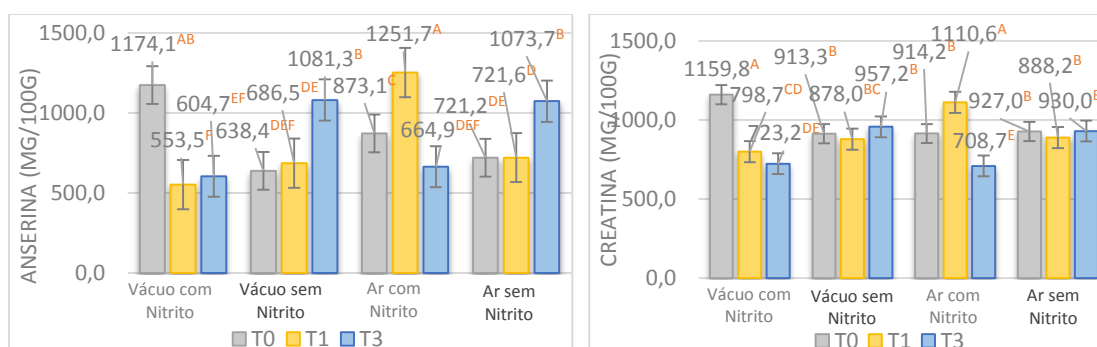


Figura 42 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de péptidos bioativos. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Todos os fatores estudados (Tabela 23) tiveram influência significativa nos resultados obtidos para a anserina, com particular destaque para o tipo de salga ($F=62,19$, $p<0,0001$) sendo superior aos efeitos registrados para o tempo de maturação ($F=7,9503$, $p=0,0063$) e adição de nitrito ($F=7,6736$, $p=0,017$). As amostras processadas por salga a vácuo apresentaram um valor médio ligeiramente inferior ($789,75\pm 108,99$ mg/100g) ao verificado para as processadas ao ar ($884,36\pm 95,26$ mg/100g).

Independentemente das condições utilizadas no processamento e do tempo de maturação o valor médio global de anserina na muxama foi de $837,06\pm 1,19$ mg/100g, no entanto, tendo em conta a quebra de peso registrada durante o fabrico da muxama, este valor refletiu um teor na matéria-prima fresca superior ($502,2\pm 0,714$ mg/100g) ao observado por Ikeda (1980) no atum albacora (*Thunnus albacares*) (234 mg/100g).

Para a creatina apenas o tempo de maturação contribuiu significativamente ($F=104,2$, $p<0,0001$), tendo-se verificado uma diminuição ao longo do tempo de maturação apresentando o produto após o processamento (T0) valores médios de $978,57\pm 60,48$ mg/100g, com 1 mês de maturação (T1) os valores médios foram de $918,89\pm 66,96$ mg/100g e após três meses de maturação (T3) o valor médio foi de $829,8\pm 66,02$ mg/100g. A concentração média de creatina obtida nas amostras analisadas foi de $909,08\pm 38,42$ mg/100g.

A carnosina presente nas amostras encontrava-se numa concentração inferior ao limite de quantificação do método de análise utilizado.

Tabela 23 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor dos dipéptidos nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Composto	Fator	F	p	Nível de significância
Anserina	Tipo de Salga	62,187	<0,0001	***
	Adição de Nitrito	7,6736	0,017	*
	Tempo	7,9503	0,0063	**
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	139,15	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	405,55	<0,0001	***
	Adição de Nitrito*Tempo	23,274	0,0004	***
	Salga*Nitrito*Tempo	159,62	<0,0001	***
Creatina	Tipo de Salga	0,905	0,36	n.s
	Adição de Nitrito	2,396	0,148	n.s
	Tempo	104,2	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	92,07	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	162,8	<0,0001	***
	Adição de Nitrito*Tempo	1,182	0,298	n.s
	Salga*Nitrito*Tempo	91,42	<0,0001	***

4.6.8 α -Tocoferol

Na Figura 43 encontram-se representados os valores obtidos para o teor de α -tocoferol presente nas diferentes amostras ao longo do tempo.

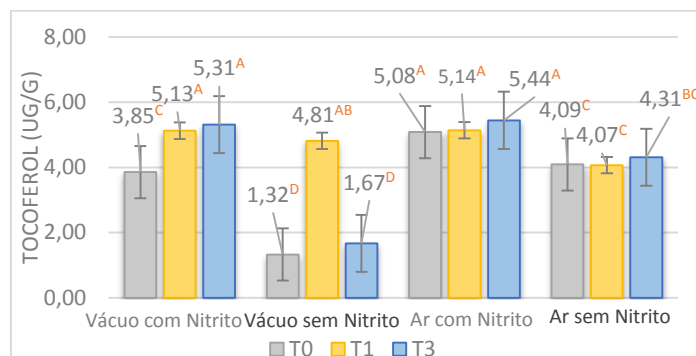


Figura 43 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de α -tocoferol. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Pela análise de variância efetuada aos teores de α -tocoferol (Tabela 24) foi possível constatar-se uma influência significativa do tipo de salga ($F=244,48$, $p<0,0001$), em que os teores médios de α -tocoferol foram superiores nas amostras cuja salga foi realizada a vácuo ($3,68\pm 0,72$ $\mu\text{g/g}$) do que nas amostras cuja salga foi efetuada ao ar ($4,69\pm 0,25$ $\mu\text{g/g}$).

A adição de nitrito também se revelou um fator significativo na determinação dos teores de α -tocoferol ($F=628,33$, $p<0,0001$), havendo uma maior concentração deste nas amostras que contêm nitrito ($4,99\pm 0,23$ $\mu\text{g/g}$) do que nas amostras sem nitrito cujo valor médio é $3,38\pm 0,61$ $\mu\text{g/g}$.

Outro fator que também revelou influência nos teores de α -tocoferol foi o fator tempo ($F=116,0$, $p<0,0001$) havendo um aumento deste com o tempo de maturação, apresentando o produto no T0 valores médios de $3,59\pm 0,92$ $\mu\text{g/g}$, no T1 valores médios de $4,79\pm 0,29$ $\mu\text{g/g}$ e no T3 o valor médio foi de $4,18\pm 1,01$ $\mu\text{g/g}$.

Neste ensaio, a concentração média de α -tocoferol obtida foi de $4,19\pm 0,39$ $\mu\text{g/g}$, e de gordura foi de $2,48\pm 0,39\%$, tendo por isso um rácio de tocoferol:gordura de $50,79$ g/kg . Tal como verificado no ensaio 1, também neste ensaio os valores obtidos foram inferiores aos encontrados por Syväoja & Salminen (1985), em que a concentração média de α -tocoferol nos peixes magros foi de 1100 mg/kg de gordura e 160 mg/kg de gordura nos peixes gordos.

Tabela 24 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de α -tocoferol nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Tipo de Salga	244,4788	<0,0001	***
Adição de Nitrito	628,3311	<0,0001	***
Tempo	116,0008	<0,0001	***
Tipo de Salga*Adição de Nitrito	121,2054	<0,0001	***
Tipo de Salga*Tempo	58,6593	<0,0001	***
Adição de Nitrito*Tempo	73,3212	<0,0001	***
Salga*Nitrito*Tempo	56,7681	<0,0001	***

4.6.9 β -Caroteno

Na Figura 44 encontram-se representados os valores obtidos para o teor de β -caroteno presente nas diferentes amostras ao longo do tempo.

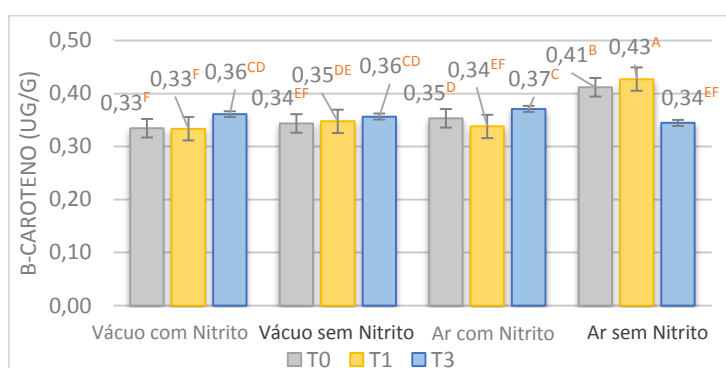


Figura 44 - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de β -caroteno. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Pela análise de variância realizada aos teores de β -caroteno (Tabela 25) pode-se verificar uma influência significativa do tipo de salga ($F=363$, $p<0,0001$) revelando uma maior concentração média de β -caroteno nas amostras cujo processo de salga foi realizado ao ar ($0,37\pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$) do que nas amostras salgadas sob vácuo, apresentando estas teores médios de $0,35\pm 0,00$ $\mu\text{g/g}$.

Outro fator que também mostrou uma influência altamente significativa nos teores de β -caroteno foi a adição de nitrito ($F=243$, $p<0,0001$), tendo-se verificado uma maior concentração deste nas amostras sem nitrito ($0,37\pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$) do que nas amostras com nitrito ($0,35\pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$).

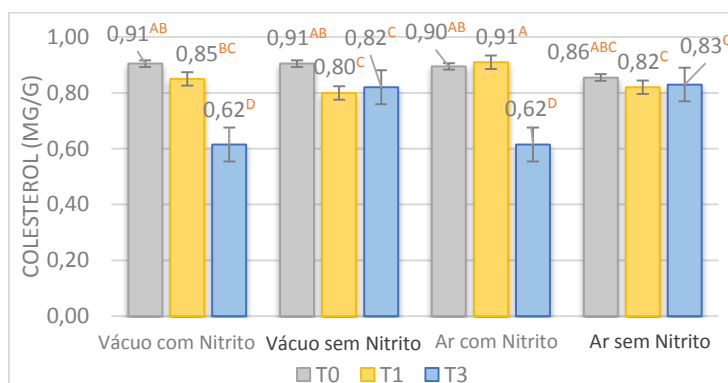
Neste ensaio as amostras revelaram uma concentração média de β -caroteno de $0,36\pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$. No entanto, tal como referido no ensaio 1, as concentrações deste antioxidante nos peixes variam consoante a dieta, o tamanho e o sexo do peixe (Hatlen *et al.*, 1995).

Tabela 25 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respectivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de β -caroteno nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Tipo de Salga	363	<0,0001	***
Adição de Nitrito	243	<0,0001	***
Tempo	2,3333	0,1393	n.s
Tipo de Salga*Adição de Nitrito	127	<0,0001	***
Tipo de Salga*Tempo	189	<0,0001	***
Adição de Nitrito*Tempo	96,3333	<0,0001	***
Salga*Nitrito*Tempo	104,3333	<0,0001	***

4.6.10 Colesterol

Na Figura 45 encontram-se representados os valores obtidos para o teor de colesterol presente nas diferentes amostras ao longo do tempo.

**Figura 45** - Influência do tipo de salga (vácuo vs. ar) e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de colesterol. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Pela análise de variância efetuada aos teores de colesterol (Tabela 26) é possível verificar-se uma influência significativa da adição de nitrito ($F=46,08$, $p<0,0001$), apresentando as amostras com nitrito um valor médio inferior ($0,79\pm 0,06$ mg/g) ao das amostras sem nitrito ($0,84\pm 0,02$ mg/g).

Outro fator que também exerceu influência nos teores de colesterol foi o tempo ($F=297,92$, $p<0,0001$), verificando-se uma diminuição nos teores com o aumento do tempo de maturação, de modo que no produto pós processamento (T0) os valores médios foram de $0,89\pm 0,01$ mg/g, após um mês de maturação (T1) os valores médios foram de $0,85\pm 0,03$ mg/g e no T3 o valor médio foi de $0,72\pm 0,07$ mg/g.

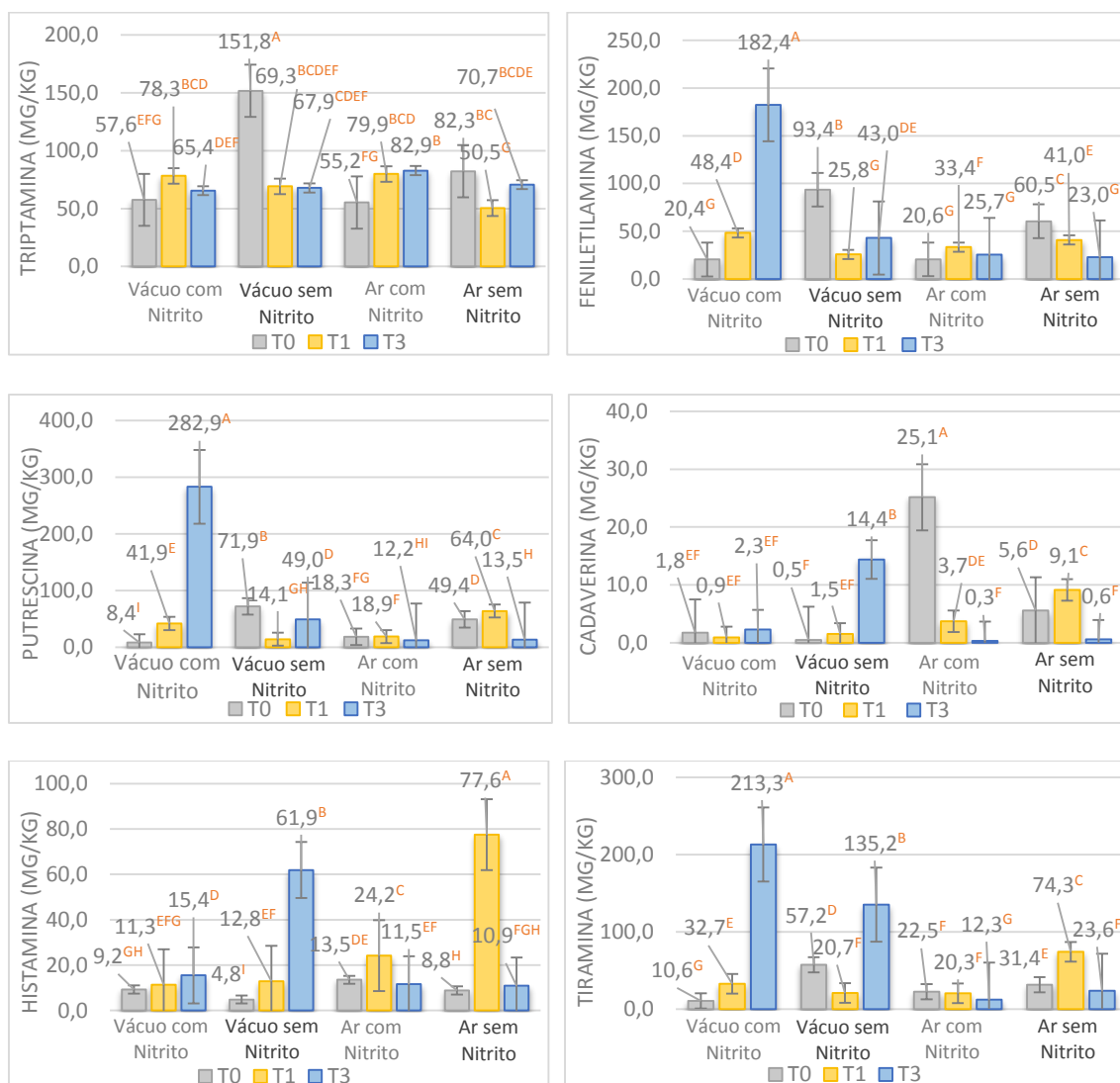
Neste ensaio foram obtidas concentrações médias de colesterol de $0,81\pm 0,03$ mg/g.

Tabela 26 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de colesterol nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Fator	F	p	Nível de significância
Tipo de Salga	0,72	0,4128	n.s
Adição de Nitrito	46,08	<0,0001	***
Tempo	297,92	<0,0001	***
Tipo de Salga*Adição de Nitrito	11,76	0,0015	**
Tipo de Salga*Tempo	214,08	<0,0001	***
Adição de Nitrito*Tempo	3,92	0,0711	n.s
Salga*Nitrito*Tempo	2	0,178	n.s

4.6.11 Aminas Biogénicas

Na Figura 46 encontram-se representados os valores obtidos para o teor das diferentes aminas biogénicas presentes nas diferentes amostras ao longo do tempo.



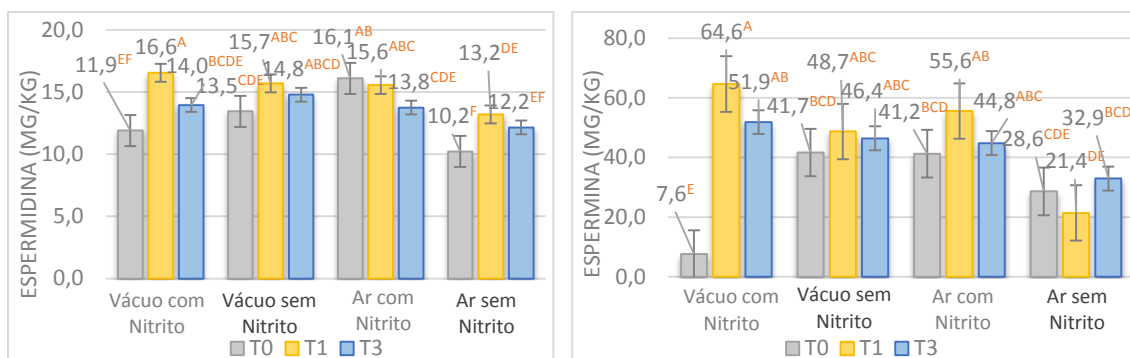


Figura 46 - Influência da salga a vácuo e ao ar e da adição de nitrito ao longo do tempo de maturação, no teor de aminas biogênicas. Valores das médias com letras iguais não são significativamente diferentes.

Pela análise de variância efetuada para cada uma das aminas biogênicas (Tabela 27) é possível verificar uma influência significativa do tipo de salga, havendo uma maior concentração de triptamina ($81,71 \pm 14,28$ mg/kg), feniletilamina ($68,91 \pm 25,02$ mg/kg), putrescina ($78,04 \pm 42,06$ mg/kg), tiramina ($78,26 \pm 32,60$ mg/kg), espermidina ($14,390,68$ mg/kg) e de espermina ($43,47 \pm 7,84$ mg/kg) nas amostras cuja salga foi efetuada a vácuo, por outro lado as amostras cuja salga foi realizada ao ar apresentaram concentrações mais elevadas de cadaverina ($7,42 \pm 3,79$ mg/kg) e de histamina ($24,39 \pm 10,86$ mg/kg).

Outro fator que também mostrou uma influência significativa nos teores de aminas biogênicas foi a adição de nitrito, excetuando para o teor de cadaverina na qual não exerceu uma influência significativa. As amostras com nitrito apresentaram teores mais elevados de feniletilamina ($55,14 \pm 25,81$ mg/kg), putrescina ($63,78 \pm 44,07$ mg/kg), espermidina ($14,64 \pm 0,72$ mg/kg) e de espermina ($44,28 \pm 8,07$ mg/kg) comparativamente às amostras sem nitrito. As amostras sem nitrito apresentaram concentrações mais elevadas de triptamina ($82,07 \pm 14,55$ mg/kg), histamina ($29,45 \pm 12,94$ mg/kg) e de tiramina ($57,06 \pm 13,84$ mg/kg).

O tempo também foi um fator cuja influência foi significativa nos teores de aminas biogênicas, havendo apenas uma diminuição na concentração ao longo do tempo de maturação da triptamina (T0: $86,74 \pm 22,54$ mg/kg para T3: $71,72 \pm 3,94$ mg/kg) e na cadaverina (T0: $8,26 \pm 5,73$ mg/kg para T3: $4,41 \pm 3,36$ mg/kg). Nas restantes aminas, verificou-se um aumento das concentrações médias com o tempo de maturação: feniletilamina (T0: $48,75 \pm 17,63$ mg/kg para T3: $68,53 \pm 38,21$ mg/kg), putrescina (T0: $37,00 \pm 14,54$ mg/kg para $89,41 \pm 65,05$ mg/kg) histamina (T0: $9,06 \pm 1,78$ mg/kg para T3: $24,93 \pm 12,36$ mg/kg), tiramina (T0: $30,43 \pm 9,90$ mg/kg para T3: $96,09 \pm 47,90$ mg/kg), espermidina (T0: $12,92 \pm 1,25$ mg/kg para T3: $13,66 \pm 0,55$ mg/kg) e a espermina (T0: $29,78 \pm 7,98$ mg/kg para T3: $43,99 \pm 3,99$ mg/kg).

Os teores de histamina encontrados neste ensaio não ultrapassaram o limite de 200 mg/kg imposto para os produtos da pesca submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura, fabricados a partir de espécies de peixe associados a um elevado teor de histidina, no regulamento (CE) Nº 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007. No entanto, pela análise dos índices de aminas biogênicas da Tabela 28 é possível verificar que algumas amostras não se encontram aptas para consumo humano, como é o caso das amostras cuja salga foi efectuada a vácuo com nitrito com três meses de maturação (T3); das amostras sob vácuo sem nitrito após o processo de secagem (T0) e com três meses de maturação (T3); e das amostras salgadas ao ar sem nitrito após o processo de salga (T0) e com 1 mês de maturação (T1).

As diferenças existentes nas concentrações no mesmo tipo de condição imposta, tal como no ensaio 1 podem dever-se ao facto de se ter utilizado atuns diferentes para o mesmo ensaio.

Tabela 27 - Significância dos efeitos dos fatores principais e das respetivas interações consideradas no modelo de análise de variância para o teor de aminas biogênicas nas diferentes amostras do Ensaio 2.

Composto	Fator	F	p	Nível de significância
Triptamina	Tipo de Salga	56,5397	<0,0001	***
	Adição de Nitrito	63,917	<0,0001	***
	Tempo	50,4788	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	77,0496	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	259,6781	<0,0001	***
	Adição de Nitrito*Tempo	124,7298	<0,0001	***
	Salga*Nitrito*Tempo	29,7711	<0,0001	***
Feniletilamina	Tipo de Salga	3228,703	<0,0001	***
	Adição de Nitrito	143,3518	<0,0001	***
	Tempo	892,1249	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	1956,047	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	3591,966	<0,0001	***
	Adição de Nitrito*Tempo	1319,387	<0,0001	***
	Salga*Nitrito*Tempo	1627,77	<0,0001	***
Putrescina	Tipo de Salga	10963,32	<0,0001	***
	Adição de Nitrito	1877,589	<0,0001	***
	Tempo	5909,548	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	12787,4	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	11292,2	<0,0001	***
	Adição de Nitrito*Tempo	9772,826	<0,0001	***
	Salga*Nitrito*Tempo	7011,651	<0,0001	***
Cadaverina	Tipo de Salga	146,6612	<0,0001	***
	Adição de Nitrito	1,663	0,2215	n.s
	Tempo	76,4868	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	409,4709	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	256,3105	<0,0001	***

	Adição de Nitrito*Tempo	176,8238	<0,0001	***
	Salga*Nitrito*Tempo	117,558	<0,0001	***
Histamina	Tipo de Salga	507,854	<0,0001	***
	Adição de Nitrito	4443,7	<0,0001	***
	Tempo	3370,05	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	6983,65	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	1911,08	<0,0001	***
	Adição de Nitrito*Tempo	10,6949	0,0067	**
	Salga*Nitrito*Tempo	3888,67	<0,0001	***
Tiramina	Tipo de Salga	3772,87	<0,0001	***
	Adição de Nitrito	43,59	<0,0001	***
	Tempo	2912,67	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	5043,63	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Tempo	625,665	<0,0001	***
	Adição de Nitrito*Tempo	641,166	<0,0001	***
	Salga*Nitrito*Tempo	636,717	<0,0001	***
Espermidina	Tipo de Salga	14,1334	0,0027	**
	Adição de Nitrito	33,8008	<0,0001	***
	Tempo	33,3836	<0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	8,4462	0,0051	**
	Tipo de Salga*Tempo	4,9211	0,0275	*
	Adição de Nitrito*Tempo	63,014	<0,0001	***
	Salga*Nitrito*Tempo	14,8705	0,0006	***
Espermina	Tipo de Salga	6,7191	0,0236	*
	Adição de Nitrito	10,7879	0,0065	**
	Tempo	21,6502	0,0001	***
	Tipo de Salga*Adição de Nitrito	13,2031	0,0009	***
	Tipo de Salga*Tempo	19,587	0,0002	***
	Adição de Nitrito*Tempo	25,8611	0,0003	***
	Salga*Nitrito*Tempo	6,5331	0,012	*

Tabela 28 - Índice de aminas biogênicas para cada amostra do ensaio 2.

Amostra		IAB	Qualidade
Vácuo com Nitrito	T0	0,95	Próprio
	T1	0,7	Próprio
	T3	4,5	Impróprio
Vácuo sem Nitrito	T0	1,4	Impróprio
	T1	0,4	Próprio
	T3	2,0	Impróprio
Ar com Nitrito	T0	0,8	Próprio
	T1	0,7	Próprio
	T3	0,4	Próprio
Ar sem Nitrito	T0	1,6	Impróprio
	T1	4,2	Impróprio
	T3	0,5	Próprio

5 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo o estudo da influência de diferentes antioxidantes, do tipo de salga (a vácuo vs. ao ar) e da adição de nitrito nos compostos bioativos naturais com capacidade antioxidante, na susceptibilidade à oxidação lipídica e na formação de aminas biogénicas de muxama ao longo do tempo de maturação.

Em ambos os ensaios realizados verificou-se uma variação significativa no teor de gordura nas várias amostras de atum utilizadas, mostrando que existe uma grande heterogeneidade na distribuição da gordura não só entre músculos mas também dentro da própria musculatura.

No estudo da influência dos diferentes antioxidantes ao longo do tempo de maturação (Ensaio 1) um dos fatores que mais influência teve nos teores dos compostos analisados foi o antioxidante. A amostra com eritorbato foi a que desenvolveu uma menor oxidação lipídica, relativamente às amostras com alecrim e com sálvia. Para esta ocorrência pode também ter contribuído o facto de estas amostras apresentarem uma maior composição em antioxidantes endógenos, como é o caso da anserina, coenzimas Q9 e Q10 (ubiquinona) e α -tocoferol.

No estudo da influência do tipo de salga e da adição de nitrito (Ensaio 2) verificou-se uma menor oxidação lipídica nas amostras cuja salga foi efetuada sob vácuo e nas amostras adicionadas de nitrito. A remoção do oxigénio na embalagem a vácuo e a ação do nitrito em retardar a progressão da oxidação lipídica podem explicar este facto. Estas amostras revelaram também um maior teor de compostos bioativos com poder antioxidante naturalmente presentes no músculo, como é o caso do α -tocoferol, do β -caroteno e da coenzima Q10.

Relativamente à formação de aminas biogénicas, os teores médios de histamina presente em algumas amostras ultrapassaram o limite máximo de 200 mg/kg imposto pelo regulamento (CE) Nº 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, não sendo a maioria das amostras aptas para consumo humano.

Pode assim concluir-se que a utilização do processo de salga sob vácuo, a adição de nitrito e a adição de eritorbato como agente antioxidante conduziu a uma menor oxidação lipídica da muxama. Por outro lado, os antioxidantes endógenos que se encontram em maior quantidade no atum são a anserina, a coenzima Q10 (ubiquinona) e o α -tocoferol.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackman R.G. (1988). Concerns for Utilization of Marine Lipids and Oils. *Food Technology*. 42(5): 151-155.

Ackman, R.G. e Cormier, M.G. (1967). α -Tocopherol in some Atlantic fish and shellfish with particular reference to live-holding without food. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 24 (2): 357-373.

Albert, C. M., Campos, H., Stampfer, M. J., Ridker, P. M., Manson, J. E. e Willett, W.C. (2002). Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *New England Journal of Medicine*, 346 (15) 1113-1118.

Ayala, A., Muñoz M., e Argüelles. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Ball, G. (2006). *Vitamins in foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. Taylor & Francis Group. New York

Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6 341–346.

Bernardo, Fernando M. A. e Martins H. Marina L. (1997a). Principais espécies de peixe comestíveis. In: *O Pescado na Alimentação Portuguesa, 2ª Edição*, Instituto Nacional de Formação Turística, Lisboa, pp. 45-119.

Bernardo, Fernando M. A. e Martins H. Marina L. (1997b). A Tradição do Consumo do Pescado em Portugal. In: *O Pescado na Alimentação Portuguesa, 2ª Edição*, Instituto Nacional de Formação Turística, Lisboa, pp. 7-18.

Belitz, H.D., Grosch, W. e Schieberle, P. (2004). *Food chemistry 4ª Edição*. Springer p9.

Bondy, S. C., Guo-Ross, S. X. e Truong, A.T. (1998). Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by beta-amyloid. *Brain Res* 799: 91-96.

Bramley, P., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. Manios, Y., Roxborough H., Schuch, W., Sheehy, P. e Wagner, K. (2000). *Vitamin E*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (2000) 913-938.

Branch, J. D. (2003). Effect of creatine supplementation on body composition and performance: a meta-analysis. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 13(2): 198-226.

Breda, J. (2003). *Fundamentos de Alimentação, Nutrição e Dietética*. Coimbra Mar da Palavra – Edições Lda. 2003. p. 21-25.

Brink, B. ten, Damink, C., Joosten H.M.L.J. e Huis in't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84.

Carmo I. (2004). Capítulo 5: Alimentos Funcionais. In: *Alimentação Saudável Alimentação Segura*. Lisboa: Edições Dom Quixote, 2004. p. 409-411.

Carocho, M. e Ferreira, C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15–25

Chan, H.W.S. (1987). The mechanism of autoxidation. Ch.1 in *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Chapter 1. Academic Press, N.Y. 1-17.

Chapman, M. (1980). Animal lipoproteins: chemistry, structure and comparative aspects. *Journal of Lipid Research*, 21, 789-853.

Chen H. M., Muramoto K., Yamauchi F. e Nokihara K. (1996). Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*; 44: 2619–23.

Chen H. M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K. e Nokihara K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 46: 49–53.

Claro, F. S. G. (2009). Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de aminas biogénicas em enchidos. Tese de mestrado em Engenharia Química. Bragança: Escola Superior de Tecnologia e de Gestão. Bragança.

Claus, J.R. e Marriott, N.G. (1995). Influence of vitamin E on improving meat colour and lipid stability. *Meat Focus Inter.* 4(Part 3):109-112.

Crane, F.L. e Navas, P. (1997). The diversity of coenzyme Q function. *Mol. Aspects Med.* 18, s1–s6.

Dadáková, E., Krizek, M. e Pelikanova, T. (2009). Determination of Biogenic Amines in Foods Using Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, Vol. 116, No. 1 pp. 365-370.

Dodarganes, C. e Marquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, p. 151-163.

Dutra, M. P. (2009). Qualidade de Mortadelas formuladas com diferentes níveis de nitrito e doses de radiação. Universidade Federal de Lavras.

- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E. e Hirvi, T. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 76, 575–577
- Enser, M. (1987). What is lipid oxidation? *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, p.151-153.
- Ferreira, F.A.G. (1983). *Nutrição Humana*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 1983. 69-78.
- Finne, G. (1992). Non-protein nitrogen compounds in fish and shellfish. In: *Advances in Seafood Biochemistry. Composition and Quality*, G.J. Flick and R.E. Martin (Eds.), Technomic Publishing, Lancaster, Pennsylvania, pp 393-401.
- Flick, G. J. e Granata L. A. (2005). Biogenic Amines in Foods In: W. M. Dabrowski and Z. E. Sikorski, Eds., *Toxins in Food (Chemical and Functional Properties of Food Components)*, CRC Press, Boca Raton, pp.121-154.
- Folch, J., Lees, M. e Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 427–509.
- Food and Drug Administration. (1998). Scombrototoxin (histamine) formation. In: *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide 2*. pp. 73-90 Food and Drug Administration, Washington D.C.
- Gorris, L.G.M. (1994). Food preservation by combined processes. *Food linked agro-industrial research*.
- Halász, A., Baráth, L., Simon-Sarkadi e Holzapfel, W. (1994). Biogenic Amines and Their Production by Microorganisms in Food *Trends in: Food Science and Technology*, Vol. 5, No. 2 pp. 42-49
- Halliwell, B., (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J.M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 125–126.
- Hardy, R. (1980). Fish lipids. Part 2. In: *Advances in Fish Science and Technology*, J.J. Connell (Ed.), Fishing News Book Ltd. Farnham, Surrey, England, pp 103-111.
- Hatlen, B., Aao, G.H., Jørgensen, E.H., Storebakken, T. e Goswami, U.C. (1995). Pigmentation of 1-, 2-, and 3-year-old Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) fed on different dietary astaxanthin concentrations. *Aquaculture* 238: 303-312.

- Hattori M., Yamaji-Tsukamoto K. A., Kumagai H., Feng Y. e Takahashi K. (1998). Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *J Agric Food Chem*;46: 2167–70.
- Higueras V, Raya A, Rodrigo JM, Serra MA, Romá J e Romero FJ. (1994). Interferon decreases serum lipid peroxidation products of hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med*. 16:131-133.
- Hipkiss, A. R. (2009). Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Advances in Food and Nutrition Research*. 57: 87-154.
- Hipkiss, A. R., J. Michaelis e P. Syrris. (1995). Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide l-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett* 371: 81-85.
- Hur, S., Park, G. e Joo, S. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COP's) in animal products. *Food Control*. 18, 939-947.
- Ijomah, P., Clifford, M.N., Walker, R., Wright, J., Hardy, R. e Murray, C.K. (1992). Further volunteer studies on scombrototoxicosis. In: Burt, J.R., Hardy, R., Whittle, K.J. (Eds.), *Pelagic Fish: The Resource and its Exploitation*, Fishing News Books, Oxford, pp. 194–199, Chapter 17.
- Ikeda, S. (1980). Other organic components and inorganic components. In: *Advances in Fish Science and Technology*, J.J. Connell (Ed.), Fishing News Books Ltd., Farnham, Surrey, pp 111-124.
- INE (2012). Estatísticas da Pesca 2011.
- INE (2013). Estatísticas da Pesca 2012.
- INE (2014). Estatísticas da Pesca 2013.
- INE (2015a). Estatísticas da Pesca 2014.
- INE (2015b). Estatísticas Agrícolas 2014.
- Jareño E. J., Bosch-Morell F., Fernández-Delgado R., Donat J. e Romero F.J. (1998). Serum Malondialdehyde in HIV Seropositive Children. *Free Radic Biol Med*. 24:503-506.
- Kagan, V.E., Nohl, H. e Quinn, P.J. (1996). Coenzyme Q: Its role in scavenging and generation of radicals in membranes. In: *Handbook of Antioxidants*, E. Cadenas and L. Packer (Eds.), Marcel Dekker, New York, pp 157-201.
- Kamei, M., Fujita, T., Kanabe, T., Sasaki, K., Oshiba, K., Otani, S., Matsui-Yuasa, I. e Morisawa, S. (1986). Distribution and content of ubiquinone in foods. *Internat. J. Vit. Nutr. Res*. 56: 57-63.

- Katikou, P, Hughes, S.I. e Robb, D.H.F. (2001). Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Aquaculture*, 202, 89–99.
- Kim, J. D. e Lall, S.P. (2000). Amino acid composition of wholebody tissue of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), yellowtail flounder (*Pleuronectes ferruginea*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 187. 367-373.
- Kinter, M. (1995). Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *Journal of Chromatography*, 671, 223–236.
- Konosu, S. e Yamaguchi, K. (1982). The flavor components in fish and shellfish. In: *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products*, R.E. Martin, G.J. Flick, C.E. Hebard and D.R. Ward (Eds.), AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, pp 367-404.
- Lang, J. K., Gohil, K. e Packer, L. (1986). Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal. Biochem.* 157: 106-116.
- Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W e Demaree S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(1):47-52.
- López, M.C., Satué, M.T., González, M.L. e Agromont, A. (1995). α -Tocopherol content in trout oil. *Food Chemistry.* 53: 67-70.
- Losada M. e Alio J.L. (1997). Malondialdehyde serum concentration in type 1 diabetic with and without retinopathy *Documenta Ophthalmologica.* 93:223-229.
- Machilin, L.J. (1991). *Handbook of vitamins.* 2ª Ed. Marcel Dekker. New York, 1991. p. 99-144.
- Maijala, R. (1994). Formation of biogenic amines in dry sausages with special reference to raw materials, lactic acid bacteria, pH decrease, temperature and time. *In: Academic dissertation*, Helsinki.
- Matsuno, T. e Hirao, S. (1989). Marine carotenoids. In: *Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils.* Vol. I, R. G. Ackman (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 251-388.
- Meisel H e FitzGerald RJ. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des;* 9 :1289–95.
- Melton, S.L. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol.* 37(7):105-111.

- Mendes, R, Cardoso, C. e Pestana, C. (2009). Measurement of malondialdehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test *Food Chemistry*, 112, 1038-1045.
- Mietz, J.L. e Karmas, E. (1977). Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*. Vol. 42: 155-158.
- Moerck, K.E. e Ball, H.R. (1974). Lipid oxidation in mechanically deboned chicken meat. *Journal Food Science*. 39: 876-879.
- Molinero, F. S. (2003). Modificaciones tecnológicas para mejorar la seguridad y calidad del jamón curado. Tesis Doctoral. Universitat de Girona. Espanha.
- Mora, L., Sentandreu, M. A. e Toldrá, F. (2007). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science*, 79, 709-715.
- Mortensen, A. e Skibsted, L.H. (2000). Antioxidant activity of carotenoids in muscle foods. In: *Antioxidants in Muscle Foods*, E.A. Decker, C. Faustman and C.J. Lopez-Bote (Eds.), Wiley, John & Sons, New York, pp 61-83.
- Moure, A., Dominguez, H. e Parajo, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochem*;41:447–56.
- Muramoto, T., Nakanishi, N., Shibata, M. e Aikawa, K. (2003). Effect of dietary [beta]-carotene supplementation on beef color stability during display of two muscles from Japanese Black steers. *Meat Science* 63, 39-42.
- Nakamura, M. e Hayashi, T. (1994). One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions. *J. Biochem. (Tokyo)* 115, 1141–1147.
- Norma Portuguesa 1614-1 (2009). Determinação do teor de humidade. Parte 1: Método de referência.
- Norma Portuguesa 3441 (2008). Determinação do pH. Método de referência.
- Norma Portuguesa 3443 (1990). Determinação do teor de azoto dos ácidos aminados livres
- Norma Portuguesa 1845 (1982). Determinação do teor de cloretos. Método corrente.
- Ozogul, Y., e Ozogul, F. (2007). Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chemistry*. 100(4) 1634-1638.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin in biological systems. *American Journal Nutrition*. 53 (1991) 1050S-1055S.

Palozza, P. e Krinsky, N.I. (1992). β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 297: 184-187.

Pearson, D (1973). *Laboratory Techniques in Food Analysis*, Butterworth & co (publishers) Ltd, London, first edition.

Peng, S., Chen, C., Shi, Z. e Wang, L. (2013). Amino Acid and Fatty Acid Composition of the Muscle Tissue of Yellowfin Tuna (*Thunnus Albacares*) and Bigeye Tuna (*Thunnus Obesus*). *Journal of Food and Nutrition Research.* 1(4), pp 42-45.

Petillo, D., Hultin, H.O., Krzynowek, J. e Autio, W.R. (1998). Kinetics of antioxidant loss in mackerel light and dark muscle. *Journal of Agriculture Food Chemistry.* 46: 4128-4137.

Prates, J. A.M., Quaresma, M.A. G., Bessa, R. J. B., Fontes, C. M. G. e Alfaia, C. M. P. (2006). Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and β -carotene in Barrosã-PDO veal. *Food Chemistry*, 94, 469–477.

Qian, Z. J., Jung, W. K., e Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresour Technol*; 99: 1690–8.

Raemaekers, M. e Demeyer, D. (1996). Optimisation of endogenous and bacterial metabolism of the improvement of safety and quality of fermented meat products. Proceedings of a workshop at the 42nd International Congress of Meat Science and Technology edited by M. Raemaekers, D. Demeyer. Lillehammer, September 1:1-5 pp.

Rajapakse N., Mendis E., Jung W. K., Je J. Y. e Kim S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Int*;38:175–82

Regulamento (CE) N° 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007.

Santos M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology.* 29 213-231.

Santos, S. A., Martins, V. G., Salas-Mellado, M. e Prentice, C. (2011). Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1399–1406.

Schlattner, U. S. (2003). Inverse metabolic engineering with phosphagen kinase systems improves the cellular energy state. *Metabolic Engineering* 6: 220-228.

Shalaby, A. R., (1996). Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International*, Vol. 29, No. 7, 1996, pp. 675-690.

- Souchet, N. e Laplante, S. (2007). Seasonal variation of Co-enzyme Q10 content in pelagic fish tissues from Eastern Quebec. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 403-410.
- St. Angelo, A. J. (1996). Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 175–224.
- Sun, Y-E, Wang, W., Che, H. e Li, C. (2011). Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsion. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. 51, 453-466.
- Sun J., He H. e Xie B. J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem*; 52: 6646–52.
- Syvöja, E. L. e Salminen, K. (1985). Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: Fish and fish products. *JAOCS* 62: 1245-1248.
- Taylor, S.L. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* 17 (2), 91–128.
- Taylor, M.J., Richardson, T. e Jasensky, R.D. (1981). Antioxidant activity of amino acids bound to Trolox-C. *JAOCS* 58: 622-626.
- Thakur, M.L. e Srivastava, U.S. (1996). Vitamin – E metabolism and its application. *Nutrition Research*. 16 (1996) 1767-1809.
- Traber, M.G., Cohn, W. e Muller, D.P.R. (1992). Absorption, transport and delivery to tissues. *In: Vitamin E in health and disease*. Packer, L., Fuchs, J. (Eds), New York, Marcel Dekker, 1992. p. 35-53.
- Trombley, P. Q., Horning, M. S. e Blakemore, L. J. (2000). Interactions between carnosine and zinc and copper: Implications for neuromodulation and neuroprotection. *Biochemistry (Mosc)* 65: 807-816.
- Tuna species guide Disponível em <http://www.atuna.com/index.php/en/tuna-info/tuna-species-guide> acedido em 2 de Janeiro de 2016.
- Turunen, M., Olsson, J. e Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 171–199.
- Wang W. Y. e De Meija E. G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr Rev Food Sci Food Saf*;4: 63–78.
- Wu C. H., Chen H. M. e Shiau C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int*; 36: 949–57.

Wyss, M. e Schulze, A. (2002). Health implications of creatine: Can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* 112: 243-260.

Xie Z., Huang J., Xu X. e Jin Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem*;111:370–6.

Yang, A., Brewster, M.J., Lanari, M.C. e Tum, R.K., (2002). Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. *Meat Science*. 60, 35–40.

Yanishlieva, N.V., Aitzetmüller, K. e Raneva, V.G. (1998). β -Carotene and lipid oxidation. *Fett/Lipid* 100: 444-462.

Zhao, F., Zhuang, P., Song, C., Shi, Z. H. e Zhang, L. Z. (2010). Amino acid and fatty acid compositions and nutritional quality of muscle in the pomfret, *Pampus punctatissimus*. *Food Chemistry*. 118(2) 224-227.

Zuraini, A., Somchit, M. N., Solihah, M. H., Goh, Y. M., Arifah, A. K., Zakaria, M. S., Somchit, N., Rajion, M. A., Zakaria, Z. A. e Mat Jais, A. M. (2006). Fatty acid and amino acid composition of three local Malaysian *Channa spp.* *Fish. Food Chemistry*, 97(4) 674-678.

7 ANEXOS

7.1 Curvas padrão dos diferentes compostos analisados

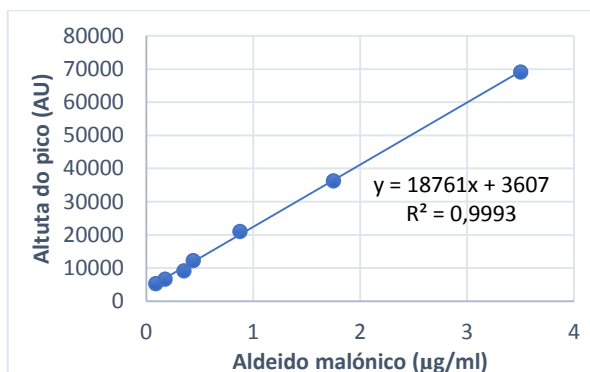


Figura 47 - Curva padrão do Aldeído Malónico

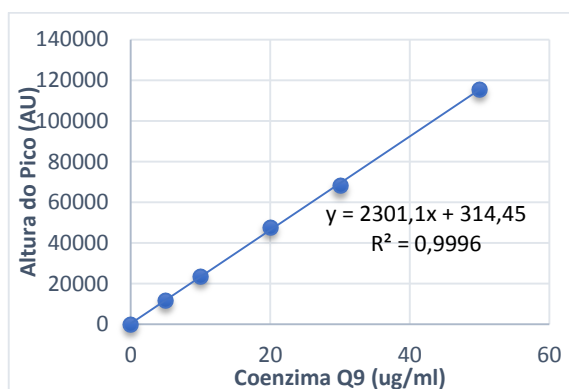


Figura 48 - Curva padrão da Coenzima Q9.

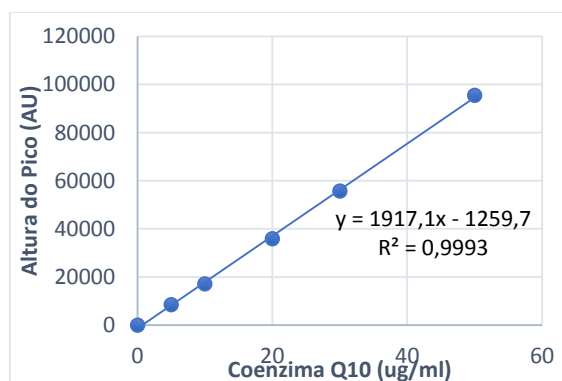


Figura 49 - Curva padrão da Coenzima Q10.

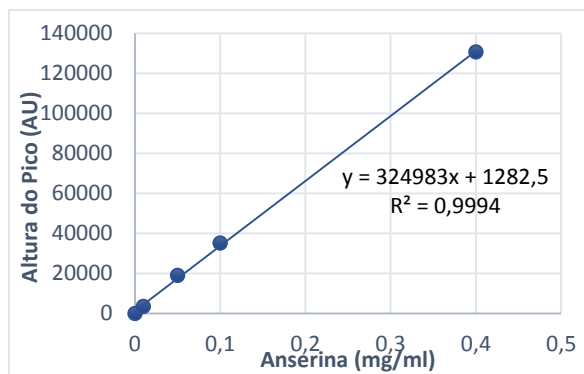


Figura 50 - Curva padrão da Anserina.

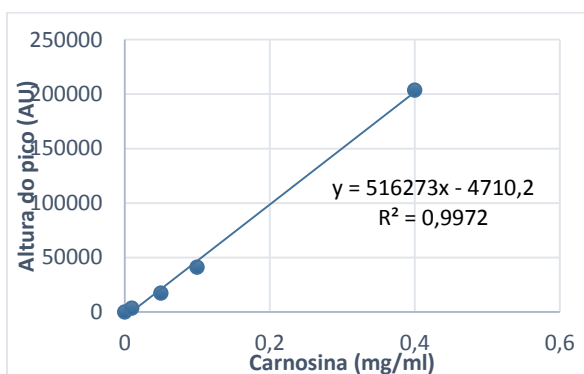


Figura 51 - Curva padrão da Carnosina.

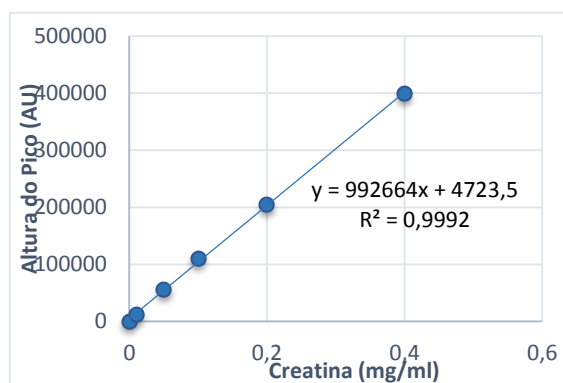


Figura 52 - Curva padrão da Creatina.

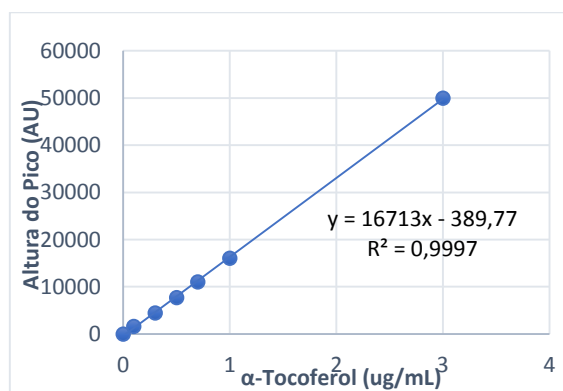


Figura 53 - Curva padrão do α -tocoferol.

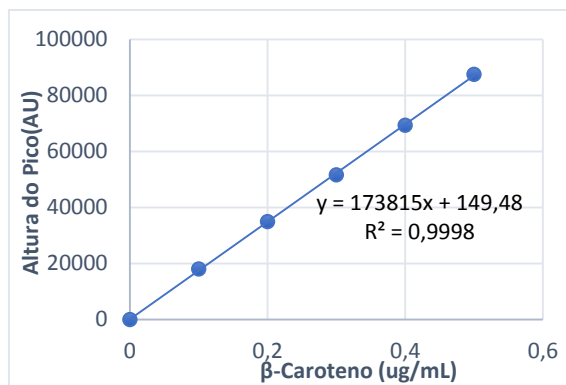


Figura 54 - Curva padrão do β-caroteno.

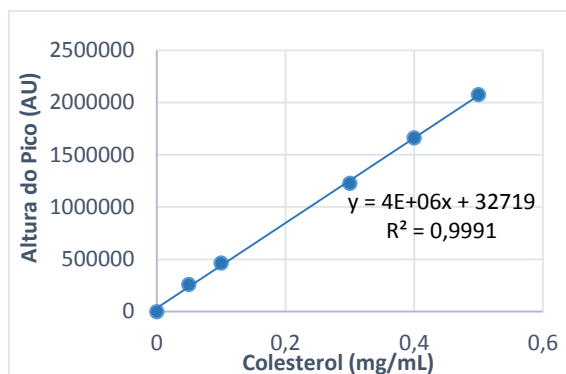


Figura 55 - Curva padrão do Colesterol.

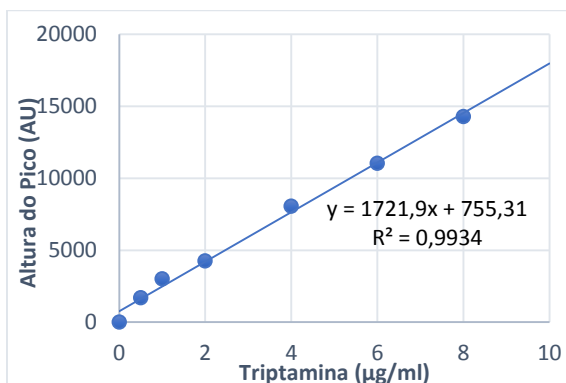


Figura 56 - Curva padrão da Triptamina.

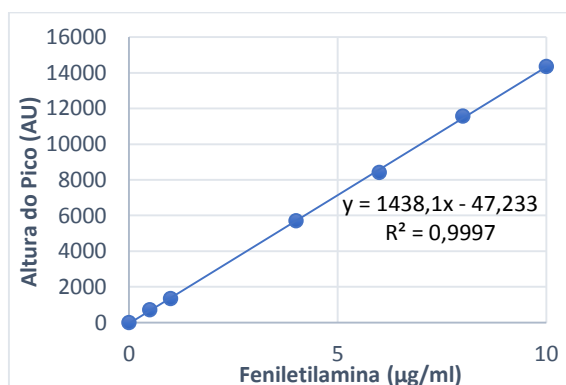


Figura 57 - Curva padrão da Feniletilamina.

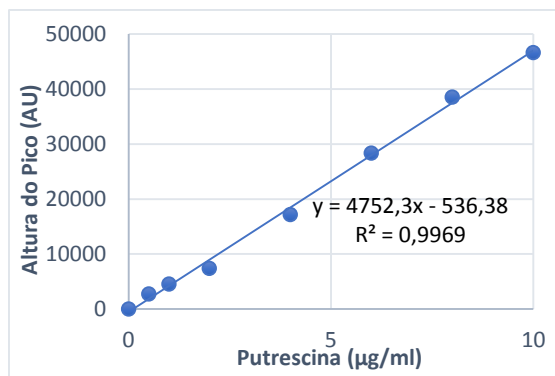


Figura 58 - Curva padrão da Putrescina.

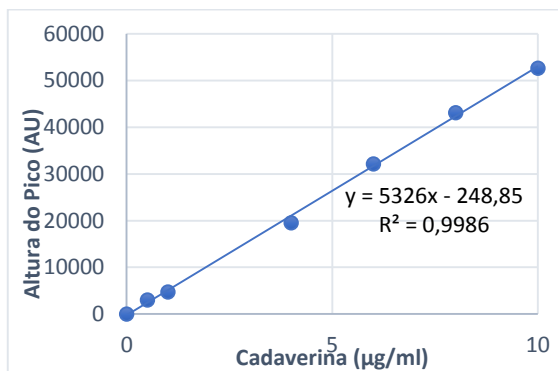


Figura 59 - Curva padrão da Cadaverina.

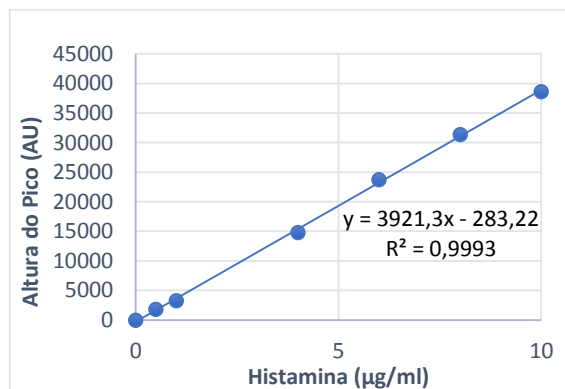


Figura 60 - Curva padrão da Histamina.

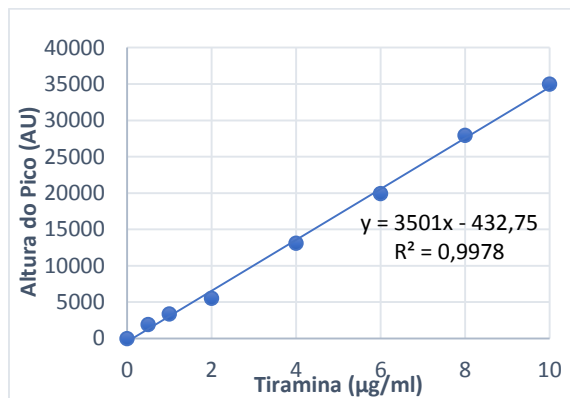


Figura 61 - Curva padrão da Tiramina.

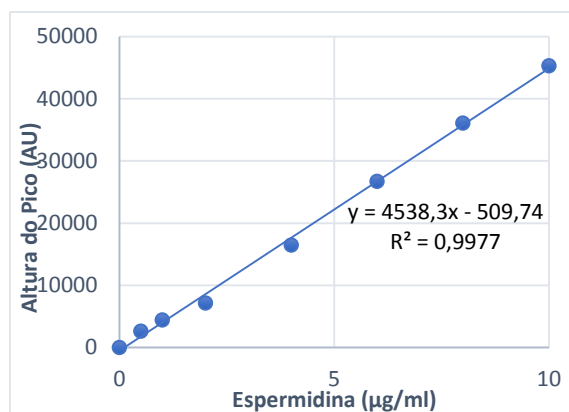


Figura 62 - Curva padrão da Espermidina.

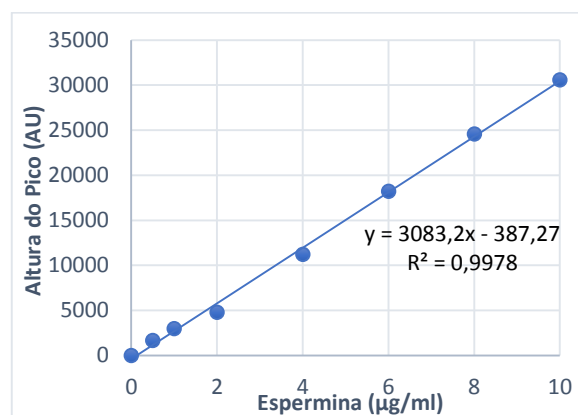


Figura 63 - Curva padrão da Espermina.