

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia

**Conservação de filetes de sardinha, *Sardina pilchardus*,
sujeitos a estabilização com gás solúvel (SGS),
embalados em ar, vácuo e atmosfera modificada**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre

Carla Maria Pereira Pestana

Orientador: Doutor Rogério Mendes (IPIMAR/INIAP)

Co-orientador: Professora Doutora M.^a do Rosário Bronze (FFUL)

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Lisboa
2007

RESUMO

A sardinha (*Sardina pilchardus*) é uma espécie que, pela sua abundância, assume grande importância no sector Português da pesca, representando aproximadamente 50% das capturas totais anuais. No entanto, em certos períodos do ano, tendo em conta o seu baixo conteúdo em gordura, uma fracção significativa da sardinha capturada não é usada como um produto fresco para consumo humano. A fim de contribuir para um melhor aproveitamento e valorização desta espécie tem sido estudada, nos últimos anos, a preparação de diversos produtos como por exemplo filetes, produtos fumados, polpas e surimi.

Este trabalho teve como objectivo investigar o efeito de um pré-tratamento de estabilização com gás solúvel - SGS (100% de CO₂ a 2 bar, durante 15 e 30 minutos) na qualidade e no período de vida útil de filetes de sardinha embalados em três tipos de embalagem: ar (AR), vácuo (EV) e atmosfera modificada (EAM - 35%CO₂: 5%O₂: 60%N₂).

Durante o período de armazenagem das amostras a 2±1°C, foram feitas análises regularmente e as alterações na qualidade dos filetes foram avaliadas por diferentes métodos: análises químicas (teor dos nucleótidos, índice do ácido tiobarbitúrico - TBA, índice de peróxidos - IP e teor de azoto básico volátil total - ABVT, análises microbiológicas (contagem de viáveis totais - CVT e contagem de anaeróbios viáveis totais - CAVT) e foi efectuada a avaliação sensorial por um painel de provadores com experiência em análise de pescado.

Durante o período de armazenagem, os filetes de sardinha dos três tipos de embalagem, mantiveram os valores de ABVT entre 16 e 19 mg/100g, no entanto, os índices que medem o grau de oxidação lipídica, TBA e IP, aumentaram para todas as condições de armazenagem. Os resultados microbiológicos, relativamente às contagens de viáveis totais, mostraram que os filetes sem o tratamento SGS atingiram um valor igual a 7 log ufc/g, quando embalados em AR, 6 log cfu/g quando embalados em EV e 4 log ufc/g, quando embalados em EAM. Os filetes com tratamento SGS embalados em AR, EV e EAM registaram valores de CVT entre 3 e 4 log ufc/g, durante os 12 dias de armazenagem. Considerando os critérios sensoriais, o tempo de vida útil dos filetes de sardinha pré-tratados com SGS foi de 5 dias quando embalados em AR e EAM, e de 8 dias quando embalados em EV.

Palavras chave: Filetes de sardinha, estabilização com gás solúvel, embalagem em atmosfera modificada, embalagem a vácuo, qualidade do pescado

ABSTRACT

Sardine (*Sardina pilchardus*) is a species that for its abundance assumes a great importance in the Portuguese fishing sector, representing about 50% of the annual total captures. However, in some periods of the year, due to its low fat content, a significant fraction of the captured sardine is not used for human consumption as a fresh product. In order to contribute for a better use and upgrading of this species the preparation of several products like fillets, mince and surimi has been assayed in recent years.

The aim of this study was to investigate the effect of a pre-treatment with soluble gas stabilisation – SGS (100% CO₂ at 2 bar, during 15 and 30 min) on the quality and shelf life of sardine fillets packed in three different packaging conditions: air (AP), vacuum (VP) and modified atmosphere (MAP - 35%CO₂:5%O₂:60%N₂).

During the storage at 2±1°C, samples were regularly taken from all batches and the quality changes evaluated by different methods, including chemical analysis (nucleotide degradation products, thiobarbituric acid reactive substances - TBARS, peroxide value - PV and total volatile basic nitrogen - TVB-N), microbiological analysis (total viable counts and anaerobic viable counts) and sensory evaluation was performed by a panel of experienced judges.

During the storage period, the TVB-N content remained almost constant, between 16 and 19 mg/100g muscle, for all samples. The formation of TBARS and the PV increased with time, for all storage conditions. Results from bacteria counts showed that, fillets without SGS treatment, achieved a value of 7 log cfu/g, when packed in AP, 6 log cfu/g, when packed in VP and 4 log cfu/g, when packed in MAP. Fillets with SGS treatment packed in AP, VP and MAP, showed values between 3 and 4 log cfu/g, during the storage period. Considering sensory criteria, the shelf life of SGS pre-treated sardine fillets was found to be 5 days in MAP and AP, and 8 days in VP.

Keywords: Sardine fillets, Soluble gas stabilisation, Modified atmosphere packaging, Vacuum packaging, Fish quality.

AGRADECIMENTOS

A todos os que me ajudaram, nesta etapa da minha vida, quero deixar aqui expresso o meu reconhecimento e gratidão, em especial:

Ao Dr. Rogério Mendes, pela disponibilidade para a orientação deste trabalho, por todos os conselhos, de extrema valia e pelo apoio prestado ao longo da sua realização.

À Prof.^a Doutora M.^a do Rosário Bronze, por ter aceite ser co-orientador deste trabalho e pela simpatia e apoio que sempre demonstrou.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e ao Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, por terem possibilitado a realização deste trabalho.

À Dr.^a Amparo Gonçalves, agradeço toda a ajuda prestada e os úteis conselhos durante a realização do trabalho.

À equipa de trabalho que me ajudou no processamento das sardinhas, nomeadamente, o Dr. António Marques, a Dr.^a Marisa Santos, a Eng.^a Susana Castro, a Dr.^a Bárbara Gonçalves, a Eng.^a Raquel Parreira, a Dr.^a M.^a João Cruz, a Sr.^a Filipa Monteiro e a Dr.^a Mariana Palma. A todos eles, o meu muito obrigado, pelo companheirismo e disponibilidade.

Ao pessoal do DITVPP que constituiu o painel sensorial, o meu agradecimento especial pela sua participação nos ensaios, contribuindo para a realização de uma parte indispensável deste trabalho.

À Dr.^a Bárbara Gonçalves, pela colaboração dada durante a realização da análise aos nucleótidos.

À empresa Praxair Portugal Gases, S.A., pela oferta dos gases utilizados.

À minha família, pelo auxílio prestado durante todo o mestrado, pela amizade e carinho, especialmente aos meus filhos Rodrigo e Catarina, aos meus pais, irmão e sogros.

Ao meu marido, um agradecimento muito especial, por ter demonstrado sempre muita compreensão e carinho nos momentos mais difíceis e pelo seu apoio incondicional, sem o qual não teria sido possível a realização deste mestrado.

A todos aqueles, que apenas com a sua amizade e carinho, permitiram que eu nunca perdesse o ânimo e desse o meu melhor para o trabalho fica aqui o meu agradecimento.

ÍNDICE	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE	iv
Lista de Quadros	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de abreviaturas e símbolos	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	1
1.1.1. A actividade da pesca, o processamento e o consumo de sardinha em Portugal	3
1.1.2. Alterações qualitativas da sardinha	4
1.1.2.1. Alterações sensoriais	5
1.1.2.2. Alterações químicas	8
1.1.2.3. Alterações microbiológicas	13
1.2. Processos de conservação do pescado	15
1.2.1. Atmosfera modificada	16
1.2.1.1. O CO ₂ e a conservação dos alimentos	18
1.2.1.2. Estabilização com gás solúvel – SGS	21
2. OBJECTIVO	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Material	24
3.1.1. Matéria-prima	24
3.1.2. Processamento da sardinha	24
3.1.3. Material de embalagem	25
3.2. Metodologia	26
3.2.1. Composição gasosa da embalagem	26
3.2.2. Análises microbiológicas	27
3.2.2.1. Preparação do diluente e dos meios de cultura	27
3.2.2.2. Preparação da amostra	27
3.2.2.3. Contagem de microrganismos viáveis totais	27
3.2.2.4. Contagem de microrganismos anaeróbios viáveis totais	28
3.2.3. Análise sensorial	28
3.2.4. Análises químicas e medição do pH	28
3.2.4.1. Composição química	29
3.2.4.2. Medição do pH	31
3.2.4.3. Compostos azotados voláteis totais (ABVT)	31
3.2.4.4. Teor de nucleótidos	32
3.2.4.5. Índice de peróxido	34
3.2.4.6. Índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)	35
3.2.5. Tratamento estatístico	37

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Caracterização da matéria-prima	38
4.2. Composição gasosa das atmosferas das embalagens	39
4.3. Análise sensorial	42
4.4. Análises microbiológicas	45
4.4.1. Contagem de microorganismos viáveis totais	47
4.4.2. Contagem de microorganismos anaeróbios viáveis totais	47
4.5. Medição do pH	49
4.6. Análises químicas	50
4.6.1. Teor de azoto básico volátil total - ABVT	50
4.6.2. Valor do índice K	51
4.6.3. Valor do índice de peróxidos (IP)	54
4.6.4. Valor do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)	56
4.7. Discussão global	60
5. CONCLUSÕES	65
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	

Lista de Quadros

	Pág.
Quadro 1. Valores nutricionais para a sardinha.	2
Quadro 2. Causas da deterioração do pescado.	5
Quadro 3. Resumo do processo de obtenção dos filetes para armazenagem a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$.	26
Quadro 4. Composição química (%) dos filetes de sardinha utilizados nos ensaios com embalagens AR, EV e EAM.	38
Quadro 5. Evolução da quantidade de O_2 (%) no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em AR.	39
Quadro 6. Evolução da quantidade de CO_2 (%) no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em AR.	39
Quadro 7. Evolução da quantidade de O_2 (%) no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em EAM.	40
Quadro 8. Evolução da quantidade de CO_2 (%) no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em EAM.	40
Quadro 9. Evolução dos resultados obtidos na avaliação sensorial (pontos de demérito) dos filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.	42
Quadro 10. Valores de pH dos filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM.	49
Quadro 11. Teor de ABVT (mgN/100g amostra) dos filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM.	50
Quadro 12. Evolução dos parâmetros químicos, sensoriais e microbiológicos dos filetes embalados em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.	60

Lista de Figuras

	Pág.
Fig. 1. Aspecto de sardinhas frescas.	6
Fig. 2. Aspecto de sardinhas com sinais de deterioração.	6
Fig. 3. Esquema geral do mecanismo de oxidação lípidica.	11
Fig. 4. Mecanismo de acção para os antioxidantes primários.	11
Fig. 5. Aparelho de extracção da gordura.	29
Fig. 6. Reacções que ocorrem na determinação do índice peróxidos: decomposição do iodeto de potássio pelos peróxidos e titulação do iodo com tiosulfato de sódio.	34
Fig. 7. Reacção entre o TBA e o malonaldeído com formação de um complexo cor-de-rosa.	35
Fig. 8. Evolução da contagem de microorganismos viáveis totais dos filetes sujeitos a 0, 15 e 30 min de pré-tratamento SGS e embalados em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.	45
Fig. 9. Evolução na contagem de microorganismos totais anaeróbios, dos filetes em EV e EAM, durante o período de armazenagem.	48
Fig. 10. Evolução do índice K dos filetes em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.	52
Fig. 11. Evolução do índice de peróxidos dos filetes em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.	54
Fig. 12. Evolução do índice de TBA dos filetes em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.	57

Lista de abreviaturas e símbolos

ABVT	Azoto Básico Volátil Total
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
AP	Air Package
AR	Embalagem em Ar
ATP	Adenosina Trifosfato
a_w	Actividade da água
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CAVT	Contagem de Anaeróbios Viáveis Totais
CVT	Contagem de Viáveis Totais
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DITVPP	Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca
EAM	Embalagem em Atmosfera Modificada
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
EV	Embalagem em Vácuo
FA	Formaldeído
FFUL	Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Hx	Hipoxantina
IFST	Institute of Food Science and Technology
IMP	Inosina Monofosfato
INIAP	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pescas
Ino	Inosina
IP	Índice de Peróxido
IPIMAR	Instituto de Investigação das Pescas e do Mar
MAP	Modified Atmosphere Package
PCA	Plate Count Agar
PV	Peroxide Value
SGS	Estabilização com Gás Solúvel ("Soluble Gas Stabilization")
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TCA	Ácido Tricloroacético
TMA	Trimetilamina
TVB-N	Total Volatile Basic Nitrogen
ufc	Unidades Formadoras de Colónias
VP	Vacuum Package

1. INTRODUÇÃO

1.1. A sardinha (*Sardina pilchardus*)

Em muitas regiões do mundo, o pescado faz parte desde há muito tempo da dieta alimentar e representa, nalguns países, a principal fonte de proteínas de origem animal. Actualmente, um número cada vez maior de pessoas dá a sua preferência ao pescado como uma alternativa saudável à carne (Huss, 1997).

As espécies de peixes pelágicos gordos pequenos, constituem produtos alimentares de grande importância económica em muitos países europeus. Embora sejam reconhecidos como alimentos saudáveis, o seu período de vida curto, durante o armazenamento em refrigeração, limita fortemente a sua comercialização. Uma espécie abundante em países da Europa Ocidental e em Marrocos é a sardinha do Atlântico (*Sardina pilchardus*), uma espécie de peixe que pertence à família *Clupeidae*, que exibe uma importância comercial crescente e um aumento da procura por parte do consumidor (Losada, 2006).

A composição química da parte edível dos produtos da pesca varia consideravelmente de espécie para espécie e, mesmo entre indivíduos da mesma espécie, registam-se diferenças que decorrem do grau de maturação sexual, idade, sexo, meio ambiente, época do ano e disponibilidade de alimento. Num mesmo exemplar são também encontradas variações não só entre a zona anterior e posterior, mas também entre a parte dorsal e ventral (Bandarra *et al.*, 2004). Mas as causas básicas da mudança na composição são geralmente a variação na quantidade e na qualidade do alimento que o peixe ingere e a quantidade de movimento que faz. Quando há um excesso de peixes, pode não haver suficiente alimento para todos, o consumo alimentar será mais baixo e a composição mudará de acordo com a quantidade de alimento que ingerem (Murray e Burt, 2001). Por outro lado, os peixes geralmente param de se alimentar antes da desova e aproveitam para este processo as suas reservas de gordura e de proteína. Portanto, na sardinha, os níveis de gordura mais baixos durante a desova são um resultado da mobilização da gordura associado à gametogénese (Hardy e Keay, 1972). Tendo em consideração todas as espécies, o teor em gordura nos peixes pode variar mais extensamente do que o teor em humidade, em proteína e em cinza.

Os principais constituintes dos produtos da pesca são a água (50 a 85%), as proteínas (12 a 24%) e os lípidos (0,1 a 22,0%), estes representam cerca de 98% do total da fracção edível. Os restantes 2,0% são constituídos por sais minerais (0,8 a 2,0%), glúcidos (0,1 a 3,0%) e vitaminas.

Murray e Burt (2001) registaram na *Sardina pilchardus* variações de humidade entre 60 e 80%, de gordura entre 2,0 e 18,0% e de proteína entre 17,0 e 20,0%. A sardinha é um

bom exemplo de uma espécie cujo teor em gordura está sujeito a variações sazonais apreciáveis, com um mínimo de 1,2% em Março-Abril e um máximo de 18,4% em Setembro-Outubro (Bandarra *et al.*, 2001).

O pescado é um alimento saudável uma vez que contém proteínas de elevada qualidade, com todos os aminoácidos essenciais, é uma importante fonte de cálcio, iodo e selénio e é bastante rico em ácidos gordos polinsaturados. As espécies pelágicas, em geral as de pequenas dimensões, como a sardinha, são geralmente ricas em ácidos gordos omega-3, nomeadamente ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3) e ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω 3) (Quadro 1). Estes ácidos gordos não são essenciais à dieta, contudo, evidências científicas indicam que poderão influenciar beneficemente na redução das doenças coronárias (Nunes, 1990). No entanto, estes ácidos gordos, são altamente susceptíveis à oxidação devido ao elevado número de ligações duplas reactivas. A sardinha é ainda uma fonte de vitaminas A e E com benefícios para a saúde. Uma das funções mais conhecidas da vitamina A é garantir a boa saúde dos olhos e ajudar a fortalecer o sistema imunológico, para melhor combater possíveis infecções. Os seus benefícios também se estendem na melhoria do sistema respiratório e na reparação de lesões na pele. A vitamina E, é muito conhecida por auxiliar na protecção cardiovascular e retardar o envelhecimento, prevenindo a oxidação e a formação de radicais livres.

Quadro 1. Valores nutricionais para a sardinha. (Fonte: Bandarra *et al.*, 2004)

	Dados Nutricionais (/100 g)		
	Cru	Grelhado	Conserva
Valor energético (kcal/kJ)	187,1/783,0	197,7/827,2	210,7/881,7
Parte edível (%)	56,8	-	-
Gordura total (g)	10,9	8,9	12,0
Saturada (g)	2,75	2,40	3,00
ω -3 (g)	3,75	3,25	0,50
ω -6 (g)	0,32	0,25	2,31
Colesterol (mg)	28,0	37,9	n.a.
Proteína (g)	17,9	24,1	24,0
Vitamina A (mg)	12	9,0	9,0
Vitamina E (mg)	0,025	0,7	1,5
Potássio (mg)	404	496	369
Fósforo (mg)	296	307	637

Tanto o industrial, como o nutricionista, o cozinheiro e o consumidor têm um interesse directo na composição dos peixes. O industrial, necessita saber qual a natureza do material cru para que possa aplicar correctamente as técnicas de processamento. O nutricionista, quer saber qual a contribuição dos peixes para a dieta e saúde e o

cozinheiro deve saber por exemplo se um peixe é normalmente magro ou gordo para decidir sobre a confecção culinária. O consumidor está interessado não apenas no sabor do peixe, o que é uma questão de gosto, mas também no aspecto nutricional. A análise dos constituintes do peixe, por vezes é necessária, para determinar especificações ou para saber se este está de acordo com os regulamentos (Murray and Burt, 2001).

1.1.1. A actividade da pesca, o processamento e o consumo de sardinha em Portugal

A procura de produtos da pesca tem aumentado nos últimos anos sendo de destacar, os produtos da pesca frescos minimamente processados com um tempo de prateleira razoável e que necessitam de um tempo de preparação mínimo.

Portugal é um dos líderes de consumo de peixe na Europa, sendo consumidos 50 a 60kg de pescado por pessoa por ano. Os produtos da pesca processados representam aproximadamente 40% do total de peixe consumido (FAO, 2004).

A sardinha, devido à sua abundância, assume grande importância no sector pesqueiro nacional, com descargas anuais de cerca de 50% do total das capturas na costa portuguesa e ocupando um lugar de relevo no que se refere ao consumo de peixe pelos portugueses. Porém, em algumas alturas do ano, uma fracção significativa da sardinha capturada não é aproveitada, devido a dificuldades de escoamento do produto no mercado. Nesta matéria, o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, avança que existem alguns mecanismos, no âmbito da Política Comum de Pescas que ajudam a garantir um rendimento mínimo aos produtores, nomeadamente, apoios à retirada de sardinha, com vista à posterior transformação em farinha e/ou congelação para venda, em períodos posteriores, com uma garantia de preço na ordem dos 50% do preço médio de venda em lota (Bexiga, 2005).

A sardinha tem sido tradicionalmente utilizada na indústria das conservas ou consumida em fresco. Actualmente, os consumidores mostram, no entanto, um baixo interesse pela sardinha enlatada e procuram cada vez mais peixe fresco (Nunes, 1990). O consumo de sardinha fresca é sazonal e tem maior expressão entre Junho e Outubro, correspondendo aos meses em que esta apresenta um maior teor em gordura.

A fim de contribuir para um melhor aproveitamento e valorização desta espécie tem sido investigada, nos últimos anos, a preparação de diversos produtos, nomeadamente confecção de filetes e de produtos fumados e ainda a preparação de polpas e de surimi (Campos *et al.*, 1990).

1.1.2. Alterações qualitativas da sardinha

A sardinha, sendo um produto da pesca, difere dos outros tipos de produtos alimentares por diversas razões, nomeadamente devido ao facto da maior parte do pescado ser retirado de uma população "selvagem" e os pescadores serem como caçadores sem influência no manuseio das suas presas antes da sua captura. Assim, não é possível imitar a situação dos animais de abate, em que apenas são seleccionados os exemplares adequados para a captura, mantendo e alimentando os restantes até apresentarem boas características para serem abatidos. Por outro lado, o industrial do pescado está limitado às matérias primas disponíveis, no que respeita ao tamanho, condição e espécies de peixe descarregadas pelos pescadores. Outra razão para a diferença entre o pescado e os animais de temperatura constante está relacionada com o facto destes últimos apresentarem nas superfícies interior e exterior (tracto gastrointestinal, pele) ambientes ecológicos específicos com uma flora microbiológica também muito específica. A flora microbiológica nos intestinos dos animais de temperatura variável é bastante diferente, sendo de natureza psicrófila e até certo ponto, admite-se que seja um reflexo da contaminação geral do ambiente aquático (Huss, 1997). Este facto, pode contribuir para que a deterioração microbiológica ocorra mais rapidamente, quando um produto da pesca é conservado a temperaturas de refrigeração.

A degradação do pescado é causada principalmente por bactérias ou oxidação dos lípidos em peixes gordos e mudanças autolíticas, como resultado da actividade de enzimas endógenas, têm um papel menor na deterioração. As bactérias decompõem vários constituintes do pescado, principalmente compostos de azoto não proteicos, causando o desenvolvimento de maus odores e maus sabores (Ababouch, 1996).

A natureza e a rapidez da deterioração, de acordo com Beirão *et al.* (2002), dependem de vários factores, como:

- Espécie – peixes gordos deterioram mais rapidamente, devido à oxidação dos lípidos;
- Condições do produto na captura - exaustão do peixe pela captura, falta de oxigénio e manuseamento excessivo são factores que aceleram a deterioração, provavelmente pelo consumo completo do glicogénio e consequente menor redução do pH;
- Natureza e extensão da contaminação bacteriana – logo após a captura, contaminantes podem ser introduzidos, provenientes por exemplo da manipulação, do gelo, etc.;
- Temperatura – a redução da temperatura o mais rápido possível até próximo de 0° C, é fundamental a fim de reduzir a actividade microbiológica e enzimática.

As causas dos vários tipos de deterioração do pescado estão resumidas no Quadro 2.

Quadro 2. Causas da deterioração do pescado (Fonte: Huss, 1997).

Sinais de deterioração	Causas da deterioração			
	Microbiológicas	Químicas (Oxidação)	Autolíticas	Físicas
Cheiros e sabores desagradáveis	+	+	+	-
Formação de muco	+	-	-	-
Coloração	+	+	+	+
Alterações de textura	+	-	+	+

1.1.2.1. Alterações sensoriais

A avaliação da frescura é uma parte importante da inspecção do pescado e da avaliação da sua qualidade. A frescura é uma propriedade complexa, difícil de definir objectivamente, no entanto, pode ser percebida pelos sentidos e classificada através da avaliação sensorial. Os procedimentos não-sensoriais permitem apenas avaliações secundárias e indirectas do nível de frescura.

A perda de frescura dos produtos da pesca é o resultado de reacções químicas e bioquímicas que ocorrem em cadeia, do metabolismo microbológico nos tecidos do peixe e de mudanças nas propriedades físicas, correspondendo ao desenvolvimento da deterioração.

Os métodos sensoriais, através da percepção dos sentidos humanos, como o olfacto, visão e gosto, permitem avaliar o aspecto, textura, aroma e sabor das amostras de pescado. Consistem em testes efectuados por um painel de provadores, onde se utilizam fichas de prova para caracterizar o produto a ser avaliado e cuja análise dos resultados dão uma boa percepção da frescura, do aspecto geral do produto e do grau de deterioração.

Na avaliação sensorial, a degustação de amostras ao longo do tempo permite seguir o aparecimento progressivo dos produtos de degradação dos lípidos, causadores de cheiros e sabores desagradáveis. É considerada a mais fidedigna de todas as determinações, pois mede aquilo que o consumidor se apercebe, traduzindo a sua aceitação relativamente ao produto (Silva *et al.*, 1998). Este tipo de análise é extremamente sensível, pois permite detectar olfactivamente compostos de deterioração em quantidades da ordem dos $\mu\text{g.kg}^{-1}$, enquanto que outros métodos analíticos possuem em geral um limite de detecção mil vezes superior (Presa-Owens *et al.*, 1995). No entanto, esta análise não pode constituir por si só um método de controlo. Difícil de pôr em prática e de custos elevados, a análise sensorial apresenta muitos inconvenientes. Reconhecer e quantificar

sabores e odores desagradáveis necessita de uma longa aprendizagem, uma vez que a sensação percebida não é única e modifica-se à medida que a oxidação progride. Se por um lado os diferentes constituintes de um produto influenciam a percepção (a natureza dos cheiros desagradáveis pode sofrer alterações pela interação de outros constituintes da matriz), por outro lado a sensibilidade difere de indivíduo para indivíduo (Hamilton *et al.*, 1983). A preferência pessoal subjacente a esta forma de avaliação, aliada às dificuldades quer de determinação do momento exacto em que um produto sofre oxidação, quer de comparação de resultados, justificam a existência de um conjunto de testes objectivos, baseados na determinação de propriedades físicas e químicas (Hamilton *et al.*, 1983). Porém, na opinião de alguns autores, a análise sensorial é insubstituível para saber se um teste utilizado (químico ou físico) é representativo de alterações nas propriedades organolépticas (Berset e Cuvelier, 1996).

No que se refere às alterações sensoriais do pescado, o estado designado por “deteriorado” não está claramente definido em termos objectivos. Podem-se indicar os seguintes sinais evidentes de deterioração:

- coloração anormal
- formação de muco
- detecção de cheiros e sabores desagradáveis
- alterações na textura.

Aspecto



Fig. 1. Aspecto de sardinhas frescas.

Relativamente ao aspecto, as sardinhas frescas (Fig. 1) são caracterizadas por uma cor de pele clara e iridescente, muco transparente e aquoso, olhos convexos com pupila preta e córnea convexa. À medida que aumenta a contaminação microbiana, a pigmentação perde progressivamente o seu brilho, até se tornar baça e o muco perde a sua transparência tornando-se, enevoadado, leitoso e

finalmente amarelado (Ababouch, 1996).

Em termos sensoriais o tempo de vida da sardinha é curto, e o seu limite é particularmente evidenciado pelo aparecimento de manchas sanguíneas no opérculo, após dois a três dias de armazenagem em gelo (Fig. 2).



Fig. 2. Aspecto de sardinhas com sinais de deterioração.

Durante a manipulação e armazenamento do pescado, um número de mudanças químicas, bioquímicas e microbiológicas ocorrem, levando à perda de cor (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000). Depois da captura, a sardinha é normalmente mantida em gelo antes de descarregar. O armazenamento prolongado desta espécie em gelo causa a oxidação e desnaturação dos pigmentos, principalmente mioglobina, levando à descoloração da carne (Chaijan, 2005).

Libertação de muco

A formação de muco é um aspecto importante na determinação da qualidade do pescado. É nas glândulas situadas no interior da pele, que ocorre a libertação de muco, como uma reacção peculiar do organismo agonizante ao meio ambiente adverso. Em alguns peixes, esta libertação é abundante e o muco exala um odor bastante ofensivo. Na sardinha, a produção de muco é ligeira e o seu amarelecimento é um sinal de deterioração.

Cheiro

A alteração do cheiro é outro dos sinais indicadores de perda de qualidade. Os estados iniciais de frescura da sardinha, armazenada em gelo, são caracterizados por um cheiro a maresia agradável proveniente das brânquias e por um cheiro ligeiro a “verde” da pele. O cheiro a peixe na pele e a perda gradual do cheiro a maresia nas brânquias indicam uma menor qualidade sensorial (Triqui e Bouchriti, 2003). Nas fases finais do período de vida do pescado ocorre a produção de vários compostos voláteis, dependendo da espécie e do tipo de degradação. Aparecem então cheiros desagradáveis, como o cheiro forte a peixe, a amónia e a alguns compostos sulfídricos resultantes de degradação microbiológica, ou desenvolve-se um cheiro a ranço desagradável, resultante da oxidação dos lípidos. O desenvolvimento do odor a ranço, pode ser a maior causa da perda de qualidade das sardinhas e outros peixes gordos, devendo ser tomada em consideração na previsão do período de vida útil destas espécies (Ababouch *et al.*, 1996).

De acordo com Prost *et al.* (2004), durante o período de armazenamento, a identificação dos compostos voláteis da sardinha crua, que conferem os odores fortes, efectuada através de métodos analíticos (cromatografia gasosa associada a olfactometria e espectrofotometria de massa), pode ser relacionado com a avaliação sensorial. Um estudo realizado por estes autores mostrou existir uma diminuição na percepção de cheiro marinho e um aumento na percepção do cheiro a ranço durante o armazenamento de sardinha. A diminuição do cheiro marinho podia ser atribuído à diminuição em dimetilsulfito durante o armazenamento, enquanto a percepção aumentada do cheiro a ranço podia ser atribuído ao aumento em heptanal e (Z)-3-hexeno-1-ol no período inicial de armazenamento (dia 4) e em 2,3-pentanodiona, hexanal, (Z)-4-heptanal, (E)-2-

heptanal, metional e de 2 nonanol no último período de armazenamento (dia 9). Não foram determinados os limiares de detecção, para os compostos referidos, mas os resultados obtidos permitiram depreender que os compostos (Z)-3-hexeno-1-ol e 2-nonanol são os mais facilmente detectados a baixas concentrações.

Textura

Após a morte, ou seja, no estado *post-mortem*, o músculo do peixe é mole e flexível. Após algum tempo o tecido muscular contrai. Quando fica duro e o corpo inteiro fica inflexível, considera-se que o peixe atingiu o estado de *rigor mortis*. Este estado inicia-se cerca de 5 horas após a morte e termina cerca de 30 horas depois, quando armazenado a 0°C. A sardinha no estado fresco, após o *rigor mortis*, apresenta uma textura firme e elástica ao toque que se vai tornando com o tempo mais branda e menos elástica.

1.1.2.2. Alterações químicas

Quando o peixe é retirado da água cessa a circulação sanguínea e conseqüentemente o fornecimento de oxigénio, ou seja, morre por asfixia. A causa da morte é devida à excessiva acumulação de ácido láctico e outros produtos metabólicos não oxidados existentes no sangue e músculos, que paralisam o sistema nervoso. O peixe pode ainda morrer durante as operações de pesca e, neste caso, a acumulação de metabolitos tóxicos deve-se ao elevado esforço para se libertar das redes. A maior fonte de energia anaeróbia no músculo, provém da degradação do glicogénio. A glicólise não gera apenas ATP, mas também produz ácido láctico como um produto final (Watabe *et al.*, 1991). A acumulação de ácido láctico no músculo, resulta numa redução do pH do músculo de valores próximos de 7,4 para valores próximos de 6 ou por vezes mais baixos (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006).

Quando o peixe morre, ocorrem uma série de alterações físicas, químicas e biológicas que conduzem ao estado de deterioração. As principais etapas dessas alterações podem ser classificadas como: hiperemia e/ou libertação de muco, *rigor mortis*, autólise e decomposição bacteriana. Estas fases não se seguem umas às outras em ordem estrita; os inícios, fins e durações das mesmas variam e geralmente sobrepõem-se dependendo das condições de manuseamento e armazenagem.

Rigidez cadavérica (*rigor mortis*)

A rigidez cadavérica significa o endurecimento do corpo como resultado de uma complexa alteração bioquímica do músculo. A rapidez da instalação e duração do *rigor mortis* depende de factores como: espécie, condições em que o pescado foi içado para o

barco, maneira como é morto, temperatura e condições de armazenagem (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006).

Quando os peixes são mortos, o fosfato de creatina é degradado antes da destruição do ATP. O conteúdo em ATP começa a diminuir quando os níveis de fosfato de creatina alcançam a mesma concentração do ATP. A degradação do ATP correlaciona-se bem com a progressão da rigidez cadavérica. O músculo contém duas proteínas filamentosas a actina e a miosina, que na presença de cálcio formam o complexo actomiosina, originando a contracção do músculo. O ATP fornece a energia para que através de uma bomba de cálcio este seja removido do complexo, quebrando a ligação entre a actina e a miosina e o músculo volte a ficar descontraído. Quando não existe ATP suficiente para a bomba funcionar, ou seja, a concentração de ATP é aproximadamente 1 $\mu\text{mol/g}$, são formadas ligações permanentes entre a actina e a miosina (Watabe *et al.*, 1991). O complexo actomiosina torna-se inquebrável e o músculo permanece num estado contínuo de rigidez, conhecido por *rigor mortis* (Beirão *et al.*, 2002).

Alterações autolíticas

O processo de autólise inicia-se, quando o músculo ainda se encontra rígido, devido a enzimas endógenas, como por exemplo as catepsinas, pois as condições para a acção destas enzimas foram criadas pelo abaixamento do pH do tecido, devido à acumulação nos músculos de ácido láctico, proveniente da glicólise. No processo de autólise ocorre a quebra de proteínas e lípidos devido à acção das enzimas proteolíticas e lipídicas nos tecidos, uma vez que os tecidos dos produtos marinhos consistem, basicamente, em compostos proteicos. A autólise, é inicialmente acompanhada por alterações estruturais das proteínas, ocorrendo a desintegração de partículas grandes de proteínas em macromoléculas, que por sua vez se degradam até à formação de peptonas e aminoácidos. Ao mesmo tempo, a hidrólise dos lípidos produz ácidos gordos livres e glicerol. Os produtos em que ocorreu a hidrólise das proteínas e lípidos ainda podem ser utilizados para consumo humano, visto que ainda não são considerados deteriorados. A autólise só produz alterações estruturais significativas na carne dos produtos marinhos, quando a sua consistência é amolecida. A hidrólise das proteínas vai criar um ambiente favorável para o crescimento dos microorganismos, permitindo a deterioração (Beirão *et al.*, 2002).

As alterações autolíticas são responsáveis pela perda inicial da qualidade do peixe fresco, mas contribuem muito pouco para a deterioração do peixe e de outros produtos da pesca, quando armazenados sob refrigeração. No entanto, devido à acção das enzimas digestivas nalguns peixes não eviscerados, o rápido desenvolvimento de cheiros desagradáveis e o aparecimento de manchas constituem excepções. A cerca de 0°C, a

autólise de proteínas tem uma velocidade sensivelmente diminuída, passando então a autólise dos lípidos a desempenhar um papel mais importante. À temperatura de congelação (-18°C), a acção enzimática sobre os lípidos em peixes gordos, como a sardinha, contribui para limitar o seu tempo de armazenagem (Huss, 1997).

Oxidação dos lípidos

Os processos de deterioração química mais importantes são as alterações que ocorrem na fracção lipídica do peixe. Os processos de oxidação, nomeadamente a autooxidação, envolvem apenas o oxigénio e os lípidos insaturados.

Em geral, os peixes pelágicos, como a sardinha, têm um elevado teor em lípidos, constituídos, principalmente, por triglicéridos com ácidos gordos de cadeia comprida, que ao serem também, muito insaturados, facilmente são atacados pelo oxigénio do ar. Os fosfolípidos são igualmente muito insaturados, o que tem importantes consequências nos processos de deterioração sobretudo nas condições de armazenagem em aerobiose (Huss, 1997). A fracção polar dos lípidos é altamente insaturada e a fosfatidilcolina parece ser importante na degradação dos lípidos dos peixes (Takahashi *et al.*, 1985). Os lípidos da pele da sardinha são mais susceptíveis à oxidação do que aqueles obtidos a partir do músculo. Esta susceptibilidade é também característica de outras espécies de peixes gordos (Vicetti *et al.*, 2005).

A oxidação da gordura, é responsável pelo aparecimento de cheiro e sabor a ranço, o que pode limitar o tempo de armazenamento de tais espécies, mais rapidamente do que as alterações das proteínas.

A autooxidação dos ácidos gordos polinsaturados ocorre em três etapas (Fig. 3):

- **Iniciação** – ocorre a formação dos radicais livres do ácido gordo devido à saída de um hidrogénio do carbono alílico na molécula do ácido gordo, em condições favorecidas por luz e calor.
- **Propagação** – os radicais livres, susceptíveis ao ataque do oxigénio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos gordos presentes. Estes, não conferem qualquer sabor, mas podem levar ao aparecimento de colorações castanhas ou amarelas no tecido do peixe. Não é por isso surpreendente que o largamente utilizado “índice de peróxidos” não se correlacione bem com as propriedades sensoriais olfactivas e gustativas, nesta fase inicial de oxidação lipídica. Os radicais livres formados actuam como propagadores da reacção, resultando num processo autocatalítico.

• **Terminação** – dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis). Esta oxidação secundária, conduz à formação de ácidos carboxílicos, alcanos, aldeídos, álcoois e cetonas, que originam diversos cheiros desagradáveis e, nalguns casos, uma coloração amarelada. Estes compostos têm um cheiro e sabor forte a ranço. Um produto da degradação secundária, o malonaldeído, pode ser determinado por reacção com o ácido tiobarbitúrico.

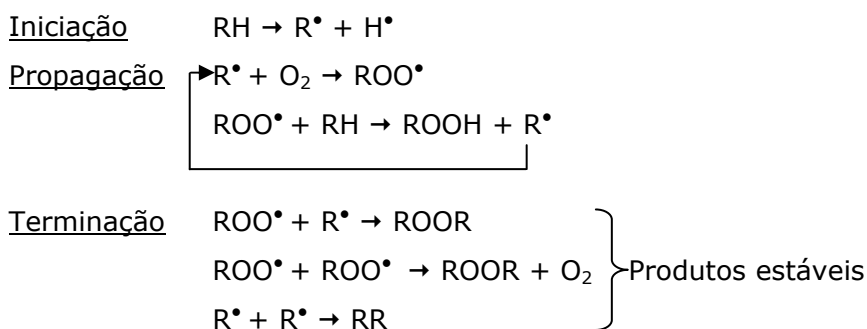


Fig. 3. Esquema geral do mecanismo de oxidação lípídica (Fonte: Ramalho e Jorge, 2005). Onde: RH – ácido gordo insaturado, R^\bullet – radical livre, ROO^\bullet – radical peróxido, ROOH – hidroperóxido

Os factores que aceleram o fenómeno de autooxidação são: temperatura elevada, luz (UV e branca), radiações ionizantes (α, β, γ, X), peróxidos (gorduras oxidadas), enzimas lipolíticas, catalizadores orgânicos férricos (Hb) e catalizadores metálicos (Cu e Fe). Os factores que atrasam a autooxidação são: refrigeração, embalagens opacas ou coradas e antioxidantes (Castilho, 2003). Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinérgicos, removedores de oxigénio, biológicos, agentes quelatantes e antioxidantes mistos.

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos (ex.: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) que são sintéticos e tocoferóis que são naturais), que

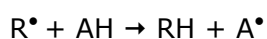
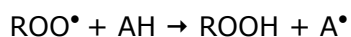


Fig. 4. Mecanismo de acção para os antioxidantes primários (Fonte: Ramalho e Jorge, 2005).

Onde: ROO^\bullet e R^\bullet – radicais livres, AH – antioxidante com um átomo de hidrogénio activo e A^\bullet – radical inerte.

promovem a remoção ou inactivação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reacção, através da doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas e interrompendo a reacção em cadeia (Fig. 4). O átomo de hidrogénio activo do antioxidante é abstraído pelos radicais

livres R^\bullet e ROO^\bullet com maior facilidade que os hidrogénio das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inactivas para a reacção em cadeia e um radical inerte (A^\bullet) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reacções oxidativas.

Os removedores de oxigénio (ex.: ácido ascórbico) são compostos que actuam capturando o oxigénio presente no meio, através de reacções químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para actuarem como propagadores da autoxidação. Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Estas substâncias podem remover oxigénio ou compostos altamente reactivos de um sistema alimentar.

Os agentes quelatantes/sequestrantes complexam iões metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de electrões não compartilhado na sua estrutura molecular promove a acção de complexação. Os mais comuns são o ácido cítrico e os seus sais, fosfatos e os sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA).

Os perigos alimentares da ingestão de lípidos de pescado oxidados são decorrentes dos peróxidos e reacções que possam ocorrer no organismo humano. Estudos demonstraram que todas as células são expostas ao ataque de radicais livres. Estes compostos podem danificar os componentes celulares tais como os lípidos da membrana, proteínas e DNA. A peroxidação dos tecidos lipídicos pode provocar o rompimento de membranas, alterar as funções das plaquetas, modificar a função dos macrófagos, alterar o ácido araquidónico, causar polimerização das proteínas e promover atero-trombogénese através da peroxidação do LDL (lipoproteínas de baixa densidade), além de poder provocar mutações no DNA (Kinsella *et al.*, 1993; Eder, 1999). Os radicais livres têm ainda a capacidade de destruir as vitaminas A e E.

Catabolismo dos nucleótidos

Após a captura dos peixes, os níveis de adenosina trifosfato (ATP) diminuem e a maioria dos nucleótidos de adenosina (ADP e AMP) são degradados a inosina monofosfato (IMP) em cerca de um a três dias. Enquanto a degradação continua, é produzida a inosina (Ino) e depois a hipoxantina (Hx). A Hx tem um sabor amargo enquanto que a IMP é um componente desejável no sabor dos peixes frescos (Özogul *et al.*, 2000). Embora a degradação do ATP varie entre as espécies, os seus produtos de degradação são utilizados para determinar o grau de frescura numa variedade de peixes sob a forma de índice K. O valor de K proposto por Saito *et al.* (1959), inclui produtos de degradação intermediários: $\% K = [(Hx + Ino) / (ATP + ADP + AMP + Hx + Ino)] \times 100$

Muitos compostos químicos foram sugeridos como índices de deterioração relativamente à qualidade dos peixes durante o armazenamento. Estes incluem a trimetilamina, a dimetilamina, a hipoxantina, a inosina monofosfato e o índice K. Entre estes parâmetros, as concentrações de ATP e os seus produtos de degradação são considerados os indicadores de maior confiança e os mais úteis (Karube *et al.*, 1984).

1.1.2.3. Alterações microbiológicas

Entre os alimentos com elevado teor em proteína, os produtos marinhos são considerados os mais perecíveis, nos quais as mudanças no "flavour", odor, textura e cor reflectem o nível de frescura *versus* decomposição.

Dos factores que mais influenciam a velocidade de decomposição microbiológica do pescado podem-se destacar:

- (1) o número inicial de bactérias;
- (2) as condições de armazenagem (temperatura, humidade e atmosfera gasosa);
- (3) o tipo de pescado (certos produtos marinhos contêm altos níveis de osmorreguladores na forma de azoto não proteico, por exemplo, aminoácidos, óxido de trimetilamina ou ureia, que estão prontamente disponíveis para as bactérias;
- (4) a temperatura da água aquando da captura do pescado (diversos peixes e crustáceos são capturados em águas frias, portanto o crescimento microbiano não é efectivamente inibido pela refrigeração, como acontece no crescimento microbiano normal em animais de temperatura constante);
- (5) o local e o método de processamento (a bordo do navio *versus* instalação industrial).

A segurança de produtos marinhos, relativamente à contaminação bacteriana, está normalmente relacionada com o potencial de causar toxinfecção alimentar, o qual normalmente é o resultado de descuido no manuseamento durante ou após a sua preparação. A contaminação começa, sem dúvida, no barco e especialmente com materiais associados ao convés, como tábuas, gelo, rede e trabalhadores a bordo, sendo que o mercado e as linhas de processamento bem como todos os equipamentos, inclusive caixas higienizadas inadequadamente, facas e também a água de processamento podem aumentar a contaminação (Beirão *et al.*, 2002).

A principal causa da deterioração é de origem bacteriana e na gama de temperaturas de refrigeração o padrão de proliferação dos organismos psicrotróficos de deterioração pode ser descrito, rigorosamente, pela relação da raiz quadrada conforme referido por Bremner *et al.* (1987). Assim, quando é usada a temperatura de 0°C como referência, a razão entre a proliferação bacteriana (r) a uma determinada temperatura t e a 0°C é dada pela expressão: $\sqrt{r} = 1 + 0.1 \times t$, em que t é a temperatura em °C. Isto significa que, se a temperatura de armazenagem for 10°C, o desenvolvimento das bactérias de deterioração é 4 vezes mais rápido do que a 0°C ($\sqrt{r}=1+0.1 \times 10, r=4$) e o tempo de conservação é reduzido de igual modo. O efeito da temperatura de armazenagem na qualidade do peixe congelado é também pronunciado e a velocidade de deterioração é consideravelmente reduzida a temperaturas abaixo de -20°C (Huss, 1997).

O músculo íntegro, de um peixe vivo ou morto recentemente, é usualmente estéril. Após a morte, os peixes perdem a protecção natural à acção das enzimas e à invasão das bactérias, presentes na superfície do corpo, nas guelras e no tracto intestinal, que se deslocam para o interior dos músculos através das brânquias, pele externa e epitélio da cavidade abdominal (Sá, 2004). As enzimas proteolíticas, libertadas pelos lisossomas, começam ainda no início do *rigor mortis* a atacar as proteínas estruturais, amolecendo a carne. A autólise destes produtos é provocada principalmente pela acção das enzimas do suco digestivo, da pele e dos tecidos, que começam a agir quase que simultaneamente com as bactérias. Logo após a morte, os sucos digestivos de natureza ácida perfuram a parede intestinal e vão actuar nos músculos, causando a decomposição dos tecidos e facilitando assim a acção dos microorganismos. O desenvolvimento bacteriano é, sem dúvida, um dos principais factores que levam à deterioração. Devido ao manuseamento, contacto com o gelo, equipamentos e outros, pode ocorrer a modificação e/ou aumento da microflora. A grande maioria destes microorganismos apresenta actividade proteolítica e lipolítica, contribuindo para a desintegração dos tecidos e originando uma série de reacções bioquímicas indesejáveis, provocando consequentemente, a total decomposição do pescado (Beirão *et al.*, 2002).

A flora inicial do peixe é muito diversa, embora as bactérias psicrófilas Gram-negativas sejam, muitas vezes, dominantes. Durante a armazenagem desenvolve-se uma flora característica, mas apenas parte dela contribui para a deterioração. Os organismos específicos de deterioração produzem metabolitos responsáveis pelo desenvolvimento dos cheiros e sabores desagradáveis associados à deterioração (Huss, 1997).

A *Shewanella putrefaciens* é uma bactéria típica da deterioração de muitas espécies de peixes de águas temperadas, conservadas em refrigerado. Em condições aeróbias produz trimetilamina (TMA), sulfureto de hidrogénio (H₂S) e outros sulfuretos voláteis, responsáveis pelos cheiros e sabores a peixe e pelos que lembram couve estragada. Metabolitos semelhantes são produzidos por bactérias *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae* durante a deterioração a temperaturas altas. Durante a armazenagem em atmosferas modificadas (contendo CO₂), uma espécie psicrófila, a *Photobacterium*, produz grandes quantidades de TMA e, é uma das principais bactérias responsáveis pela deterioração. As bactérias do tipo *Pseudomonas* também actuam a temperaturas de refrigeração, e ao produzirem vários sulfuretos voláteis (por exemplo, metilmercaptano CH₃SH) e sulfureto de dimetilo ((CH₃)₂S), cetonas, ésteres e aldeídos, provocam a deterioração do pescado que é descrita como sendo frutada, a sulfidrilado e enjoativa. A putrefacção ou deterioração ocorre muito rapidamente se a carga de microorganismos degradativos exceder, aproximadamente, 10⁷ ufc/g (Huss, 1997).

O *Clostridium botulinum* tipo E, isolado quase que exclusivamente de ambientes marinhos, actua em condições de anaerobiose estrita, sendo de especial interesse porque é mais psicrotrófico do que os outros tipos dentro da espécie, é capaz de produzir toxina durante a refrigeração e não é proteolítico. O uso recente de embalagens com atmosfera controlada ou modificada, durante a qual os níveis de oxigénio são diminuídos ou outros gases são aumentados para reduzir os microorganismos de deterioração normal e aumentar a vida de prateleira do produto, têm causado preocupação quanto à presença do *C. Botulinum* (Beirão *et al.*, 2002).

A prevalência de *C. botulinum* tipo E nos peixes crus varia de 10 a 40%, dependendo da espécie de peixe. Estudos revelaram que ao nível do comércio de produtos da pesca, 5% dos embalados a vácuo e 3% dos embalados em ar eram positivos para os esporos tipo E. Os dados indicaram claramente que as actuais práticas de processamento do pescado são insuficientes na eliminação dos esporos de *C. botulinum* dos peixes crus. Um conjunto de casos recentes na Europa do norte demonstrou o risco aumentado do botulismo associado aos produtos da pesca (Hyytiä *et al.*, 1999).

1.2. Processos de conservação do pescado

Em virtude das características intrínsecas da sardinha, que a tornam uma espécie bastante frágil, os comerciantes enfrentam grandes dificuldades na gestão dos stocks de sardinha fresca para venda e têm registado um elevado volume de perdas. Assim, os industriais do sector do processamento e comercialização do pescado procuram activamente métodos alternativos para a conservação do pescado que permitam uma adequada comercialização dos produtos da pesca frescos refrigerados. Aumentar o tempo de prateleira de um dia ou dois pode, no caso de um produto com um período de vida limitado, diminuir significativamente as dificuldades na gestão dos stocks e torná-lo mais rentável nos competitivos mercados grossistas.

Para retardar os processos de deterioração dos produtos da pesca conservados em fresco, utilizam-se vários métodos, baseados maioritariamente na aplicação de baixas temperaturas, às quais se podem ainda associar o controlo ou modificação da atmosfera. Assim, a conservação dos produtos da pesca pode ser feita numa câmara de refrigeração em que o produto alimentar pode ser embalado em atmosfera normal (AR), em atmosfera modificada (EAM) e em vácuo (EV), ou o produto não é embalado e a atmosfera da câmara de armazenagem poderá ser ou não controlada.

A deterioração química ou desenvolvimento do cheiro a ranço pode ser impedido por um rápido manuseamento do pescado a bordo e armazenagem dos produtos em condições de anóxia (embalagem em vácuo ou em atmosfera modificada). A utilização de antioxidantes pode ser também considerada. Um grande esforço para reduzir a contaminação geral, durante o manuseamento do pescado a bordo, não leva a nenhum atraso significativo na deterioração, porque, apenas uma fracção muito pequena desta contaminação geral, é provocada por bactérias específicas de deterioração. Em contrapartida, as medidas de higiene para controlar a contaminação do peixe e dos produtos da pesca, com bactérias específicas de deterioração, influencia grandemente a velocidade de deterioração e o tempo de conservação (Huss, 1997).

A obtenção de uma atmosfera controlada, no interior de uma câmara de refrigeração, consegue-se por alteração das concentrações em CO₂ e em O₂. Atmosferas enriquecidas em CO₂ e empobrecidas em O₂ diminuem as reacções enzimáticas e o crescimento microbiano, permitindo assim a manutenção das características físicas, químicas, organolépticas e microbiológicas e contribuindo para um aumento do período de conservação dos produtos da pesca frescos. Os níveis óptimos de CO₂ e O₂ na atmosfera variam de acordo com o produto em causa e deverão ser ajustados para cada caso.

1.2.1. Atmosfera modificada

A embalagem em atmosfera modificada (EAM) é uma forma de embalar que envolve a remoção do ar do interior da embalagem e a substituição com uma mistura específica de dióxido de carbono (CO₂), e azoto (N₂), e algumas vezes combinados com oxigénio (O₂) (Devlieghere *et al.*, 1998a, 1998b).

A EAM é vastamente utilizada como método de conservação dos alimentos, a qual em combinação com a refrigeração pode providenciar um aumento substancial do período de vida útil dos produtos da pesca (Goulas e Kontominas, 2007), que pode contudo ser atribuído, ao efeito bacteriostático do dióxido de carbono sobre os microorganismos existentes na fase aquosa dos alimentos (Devlieghere, 2000). Os produtores de alimentos estão cada vez mais a tentar utilizá-la, para ir de encontro às exigências dos consumidores por alimentos frescos refrigerados, com um maior tempo de vida útil (Sivertsvik, 2004). Numerosos estudos têm sido conduzidos sobre o efeito da EAM em produtos da pesca (Erkan *et al.*, 2006; Goulas e Kontominas, 2007; Hoz *et al.*, 2000; Özogul, *et al.*, 2004; Özogul, *et al.*, 2000; Ruiz-Capillas e Moral, 2001; Sivertsvik, *et al.*, 2002; Sivertsvik, *et al.*, 1999; Stammen *et al.*, 1990).

A utilização das técnicas EAM e EV trouxe grandes alterações no armazenamento, distribuição e comercialização de produtos frescos e processados, ao promover um aumento do tempo de prateleira e uma melhoria na qualidade organoléptica dos produtos da pesca (Özogul *et al.*, 2000). A aparência dos produtos da pesca embalados em EAM e EV é importante porque influencia a aceitabilidade dos consumidores relativamente ao produto. Esta, pode ser avaliada visualmente, incluindo o colapso da embalagem, a produção de exsudado e a descoloração do produto. As propriedades organolépticas do produto podem ser avaliadas pela cor, odor, sabor e textura (Özogul e Özogul, 2006).

O crescimento dos microorganismos, durante o período de conservação torna o alimento organolepticamente inaceitável para consumo, por causa das mudanças na cor, odor e textura. A inibição do crescimento destes microorganismos e o aumento da fase lag (fase de lactência) dos microorganismos aeróbios facultativos e anaeróbios, resulta num potencial aumento do período de vida útil de produtos embalados em atmosfera modificada, sendo este um dos principais benefícios desta tecnologia (Özogul *et al.*, 2000).

Embora a tecnologia da EAM tenha um potencial risco de segurança para os produtos da pesca relacionado com o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* tipo E, as preferências do consumidor para a conveniência na manipulação, exposição visual boa, embalagem atractiva e segura, a higiene e a extensão do período de vida aceitável de produtos da pesca justificam o interesse neste tipo de embalagem. Os interesses comerciais e regulatórios na tecnologia da embalagem não são aspectos novos, mas desenvolvimentos inovativos no sistema EAM e EV como materiais de embalagem, indicadores de segurança, maquinaria e tecnologia relacionada, podem fornecer uma melhoria adicional ao período de vida útil dos produtos da pesca, à qualidade organoléptica e à valorização do produto (Özogul e Özogul, 2006).

Na generalidade dos casos, ao utilizar-se embalagem com atmosfera modificada consegue-se um aumento da vida útil dos produtos de aproximadamente 50%, porém este é condicionado pela temperatura baixa de armazenamento, matérias primas de elevada qualidade, manuseamento, material de embalagem, mistura de gases e pela disponibilidade do dióxido de carbono (CO₂) expresso pela pressão parcial de CO₂ e pela relação entre volume de gás e volume de produto (g/p). A atmosfera modificada óptima para embalar filetes de bacalhau (*Gadus morhua*) no estado pré-rigor é 63 ml de O₂/100 ml e 37 ml de CO₂ /100 ml (Sivertsvik, 1999).

No interior da embalagem, a atmosfera gasosa muda continuamente durante o armazenamento por causa da respiração do produto embalado, de mudanças bioquímicas e da passagem lenta dos gases através dos materiais de embalagem (Parry, 1993).

A embalagem a vácuo pode ser considerada uma variante do sistema EAM, uma vez que o ar é removido do interior da embalagem e não é substituído. A EV é utilizada normalmente com uma embalagem de permeabilidade baixa ao oxigénio, sendo neste caso o ar evacuado e a selagem feita de imediato. Uma embalagem quando sujeita a vácuo, colapsa em torno do produto de modo a que no interior a pressão seja ligeiramente menor que a atmosférica. Durante o armazenamento, a atmosfera no interior da embalagem a vácuo é modificada indirectamente, uma vez que há uma alteração da sua composição gasosa. A pequena quantidade de oxigénio residual no interior da embalagem é consumida pela actividade metabólica das bactérias. Cria-se assim um microssistema anaeróbio/microaeróbio dentro da embalagem, que auxiliado pelo efeito inibitório do CO₂ libertado na respiração, retarda o crescimento de bactérias degradativas como as *Pseudomonas*. Como resultado, a vida de prateleira é mais longa do que no caso de um alimento exposto ao ar.

Os últimos desenvolvimentos nos sistemas de EAM estão associados com a expansão de filmes inteligentes, mais recentemente usados em embalagens "activas" ou "inteligentes" e com a aplicação do conceito de barreiras conjugadas. Uma embalagem é chamada activa quando desempenha um papel desejado que não seja exclusivamente o de uma barreira inerte às condições externas. Este sistema inclui diversos métodos como, alteração dos gases da atmosfera interior da embalagem (ex: absorventes de O₂, geradores de CO₂, estabilização com gás solúvel "SGS-soluble gas stabilization"), controlo da humidade (ex.: embalagem activa osmótica e filmes desidratantes), monitorização da qualidade (ex.: integradores de tempo-temperatura) agentes antimicrobianos e revestimentos edíveis, entre outros (Sivertsvik, 1999). Em conjunto com as tecnologias de processamento mínimo, a embalagem em atmosfera modificada, o SGS e a embalagem envolvendo filmes barreira, sequestradores de oxigénio, e emissores de CO₂, têm sido descritos como tendo uma potencial aplicação aos produtos da pesca (Sivertsvik, 2002).

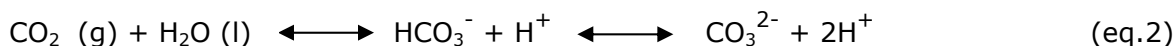
1.2.1.1. O CO₂ e a conservação dos alimentos

O dióxido de carbono é o gás mais importante utilizado na embalagem dos alimentos, em atmosfera modificada, devido ao seu efeito inibidor sobre muitos dos microorganismos que causam a deterioração do alimento (Sivertsvik *et al.*, 2002b).

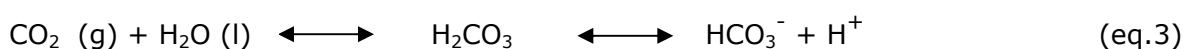
Para inibir o crescimento bacteriano é necessário que uma determinada quantidade de CO₂, dependendo dos géneros alimentícios, se dissolva no produto, sendo a inibição proporcional à concentração de CO₂ dissolvido no produto (Devlieghere *et al.*, 1998a,

1998b). Quando o CO₂ é introduzido na embalagem, dissolve-se na fase aquosa e na fracção lipídica do alimento. Isto resulta, após ser atingido o equilíbrio de uma certa concentração de CO₂, dissolvido na fase aquosa do produto.

A reacção subjacente ao processo de dissolução do CO₂ decorre de acordo com a eq. 2:



Tendo em conta que os valores de pH típicos dos produtos da pesca são geralmente inferiores a 8, a concentração de iões carbonato pode ser omitida (Sivertsvik *et al.*, 2002) (eq. 3):



O efeito do CO₂ sobre o crescimento bacteriano é complexo, até hoje, foram identificados quatro mecanismos de acção: (i) alteração da função da membrana celular, incluindo alterações na absorção de nutrientes; (ii) inibição directa de enzimas ou diminuição da taxa de reacções enzimáticas; (iii) penetração na membrana celular bacteriana, levando a alterações do pH intracelular e (iv) alterações directas nas propriedades físico-químicas das proteínas. Provavelmente o efeito bacteriostático deve-se a uma acção combinada de todos estes mecanismos (Sivertsvik *et al.*, 2002).

Em refrigeração e condições de armazenamento aeróbias, a degradação bacteriana de filetes de peixes é devida a organismos psicrotróficos Gram-negativos dominados por *Pseudomonas* spp. e *Shewanella* spp.. As *Pseudomonas* são inibidas eficazmente por atmosferas enriquecidas com 20% de CO₂ ou mais, no entanto, a *Shewanella* é mais resistente ao CO₂ e o crescimento deste microorganismo é inibido com concentrações mais elevadas de CO₂ (aproximadamente 40%). Consequentemente, atmosferas enriquecidas com CO₂ têm sido cada vez mais utilizadas, nos últimos anos, na comercialização de carnes vermelhas, de aves domésticas e de produtos da pesca (Hoz, *et al.*, 2000).

Após a abertura da embalagem, o CO₂ é lentamente libertado pelo produto e continua a exercer um efeito de preservação útil por um determinado período de tempo, referido como o efeito residual do CO₂ (Stammen *et al.*, 1990).

A capacidade de absorção de CO₂ pelos alimentos está dependente da relação entre volume de gás e volume de produto (g/p), pressão parcial de CO₂ a que o alimento é sujeito, temperatura, características biológicas do produto alimentar, como por exemplo, o pH e a relação entre os conteúdos água/gordura. Dependendo destes factores, a

quantidade de CO₂ absorvido varia entre 0 a 1.79 litros de CO₂/kg de alimento (Jakobsen e Bertelsen, 2006).

Para que a concentração de CO₂ dissolvido no produto seja suficiente para exercer um efeito bacteriostático, é necessário que a relação g/p seja 2/1 ou 3/1 (volume do gás duas a três vezes superior ao volume do alimento). Este g/p, bastante elevado, é também necessário para impedir o colapso da embalagem, devido à solubilidade do CO₂ em alimentos húmidos, uma vez que o CO₂ dissolvido ocupa muito menos volume comparado com o CO₂ gasoso (Sivertsvik *et al.*, 2002). Uma nova abordagem é sujeitar o produto alimentar ao CO₂, antes de embalar, conseguindo-se deste modo utilizar razões g/p menores, relativamente à EAM e obter o mesmo efeito bacteriostático (Sivertsvik *et al.*, 2004).

De acordo com a Lei de Henry (eq. 4), sujeitar um alimento a 100% de CO₂ durante apenas 3 horas resulta na mesma quantidade de CO₂ dissolvida no seu interior que um alimento sujeito a 50% de CO₂ durante 48 horas. O produto alimentar pode então ser embalado com um g/p muito baixo ou até sob vácuo obtendo-se o mesmo efeito que para a EAM tradicional mas com um tamanho consideravelmente menor da embalagem (Sivertsvik *et al.*, 2004).

Para temperaturas elevadas, a solubilidade do CO₂ é mais baixa, podendo ser a razão para um efeito menor da EAM (Devlieghere *et al.*, 1998). A solubilidade em água a 0°C e 1 atm é 3,38 g CO₂/kg H₂O, contudo a 20°C a solubilidade é reduzida para 1,73 g CO₂/kg H₂O. Assim sendo, a temperatura de armazenamento condiciona sempre a eficácia do gás, ou seja, a inibição do crescimento microbiano aumenta à medida que a temperatura decresce (Sivertsvik *et al.*, 2002).

A solubilidade do CO₂ aumenta com o aumento no pH e este efeito é mais visível em valores de pH elevados. Isto pode ser explicado pelas reacções de equilíbrio que ocorrem quando o CO₂ se dissolve no alimento (eqs. 2 e 3). No momento em que o CO₂ se dissolve, é hidratado com a formação de ácido carbónico. Este é seguidamente dissociado, para formar um ião bicarbonato e um ião de hidrogénio. Para pH baixo (concentrações de H⁺ elevadas) a reacção será empurrada no sentido do CO₂ e consequentemente quantidades mais baixas de CO₂ são dissolvidas na fase aquosa (Devlieghere *et al.*, 1998).

Quando o CO₂ se dissolve na fase lipídica de um alimento, parte do CO₂ na fase gasosa será consumido e deste modo, menos será deixado para dissolver na fase aquosa do alimento, o que resulta numa concentração de CO₂ mais baixa na fase aquosa dos alimentos gordos. Sabe-se que, geralmente as embalagens de produtos com um elevado

teor de gordura (por exemplo, peixe gordo) muito frequentemente colapsam, ao diminuir o volume de gás no interior da embalagem devido ao CO₂ dissolvido na fase lipídica (Devlieghere *et al.*, 1998).

1.2.1.2. Estabilização com gás solúvel – SGS

A técnica SGS consiste em dissolver o CO₂ no produto, utilizando uma câmara de pressão onde é colocado o alimento, a baixa temperatura (~0°C) e é feita a injeção de 100% de CO₂ durante alguns minutos a pressões elevadas (2 a 4 bar). O produto é seguidamente embalado e é feita a selagem, criando-se então uma atmosfera modificada no interior da embalagem, devido à libertação de algum CO₂, que se encontrava dissolvido no produto. Esta técnica difere da EAM, em que a mistura de gases, contendo CO₂, é introduzida na atmosfera da embalagem, na altura em que é feita a selagem.

A solubilidade do CO₂ na água foi investigada (Carroll *et al.*, 1991; Crovetto, 1991), mas o conhecimento da solubilidade do CO₂, da constante de Henry, da taxa de absorção e das constantes de difusão do CO₂ em alimentos, particularmente em filetes de peixe cru, não está bem investigada. O conhecimento destes factores, auxilia a determinação da mistura de gases e da relação g/p óptimas, para um determinado produto embalado em atmosfera modificada, ou quando se aplica um método alternativo de EAM, como é a estabilização com gás solúvel. A relação entre o nível de CO₂ na atmosfera e a quantidade de CO₂ dissolvido é dada pela lei de Henry (eq. 4), isto é, a solubilidade de um gás num líquido é directamente proporcional à sua pressão parcial:

$$P_{CO_2}^{t=\infty} = H_{CO_2, prod} \times C_{CO_2}^{t=\infty} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde $P_{CO_2}^{t=\infty}$ é a pressão parcial de CO₂ (Pa), $C_{CO_2}^{t=\infty}$ é a concentração de CO₂ dissolvida (ppm) quando é atingido o equilíbrio e $H_{CO_2, prod}$ é a constante de Henry (Pa.ppm⁻¹). Sivertsvik *et al.*, 2004, determinaram estes factores em filetes de salmão (*Salmo salar*), bacalhau (*Gadus morhua*), peixe lobo riscado (*Anarchichas lupus*) e tamboril (*Lophius piscatorius*) e para uma temperatura de 0°C obtiveram um valor médio da constante de Henry igual a 45,1±4,2 Pa.ppm⁻¹.

Sivertsvik (1999) sugeriu a utilização de uma pressão elevada para que ocorra uma dissolução rápida do CO₂ em salmões. Este autor, utilizou como matéria-prima filetes de salmão, aos quais aplicou o tratamento SGS antes da sua embalagem. Os filetes foram colocados num contentor de aço estanque ao gás, o qual foi preenchido com 100% de CO₂ durante 30 ou 60 minutos a pressões elevadas (~2,6 bar), de modo a permitir a dissolução do gás na carne do filete. Imediatamente após o tratamento SGS, os filetes

foram colocados em sacos plásticos e selados sob três condições de vácuo diferentes: vácuo total (99,5%), vácuo médio (60%) e sem vácuo (20%). As embalagens com os filetes foram então armazenadas a $1\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20 dias. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que a estabilização com gás solúvel pode ser utilizada isoladamente, para aumentar, em termos microbiológicos, o período de vida útil do salmão fresco e que a remoção do oxigênio (embalagem a vácuo) é mais importante que o nível de CO_2 relativamente ao cheiro e "flavour" do salmão. Portanto, o SGS combinado com o vácuo resultou num maior período de vida útil.

A conveniência da utilização da estabilização com gás solúvel (SGS) para dissolver o CO_2 em filetes sem pele de peito de galinha, antes de serem embalados em atmosfera modificada, foi investigado por Rotabakk *et al.*, (2006). Estes autores concluíram que o tratamento com SGS em combinação com a EAM, pode ser usado com sucesso em filetes do peito de galinha para melhorar as características microbiológicas (contagem de viáveis totais, contagem de enterobactérias, e contagem de *Pseudomonas* spp.) e sensoriais, e para além disso reduz o colapso da embalagem e aumenta possivelmente a % de CO_2 no interior da embalagem.

No futuro, deverá ser determinada a adaptação da tecnologia SGS aplicada a outros peixes e outros produtos que beneficiam da embalagem em EAM, em particular nos produtos limitados pela necessidade de uma relação elevada entre o volume de gás e o volume de produto. O princípio da dissolução do CO_2 poderá ser usado na distribuição e durante o processamento, possivelmente como uma parte de um processo de refrigeração. Para ambos, SGS e EAM, a combinação com outros factores de conservação devem ser investigados, destacando aqueles que influenciam o produto minimamente e que em simultâneo reduzem reacções de degradação e aumentam o período de vida útil e/ou a qualidade (Siverstvik, 2003).

2. OBJECTIVO

Os efeitos da atmosfera modificada nas embalagens de produtos da pesca foram revistos extensivamente (Reddy *et al.*, 1992; Sivertsvik, 1999; Hoz *et al.*, 2000; Ruiz-Capillas e Moral, 2001; Özogul *et al.*, 2000, 2004 e 2006; Erkan *et al.*, 2006; Goulas e Kontominas, 2007), mas não existe informação relativa ao armazenamento em refrigeração de filetes de sardinha. É vantajoso aumentar o período de vida útil da sardinha através do uso de métodos apropriados, como por exemplo, a refrigeração sob atmosfera controlada ou modificada e criar condições de armazenamento que aumentem a sua aceitabilidade a um custo baixo. Para além disso, nos meses em que a sardinha apresenta um teor de gordura mais baixo, a utilização de métodos de conservação adequados, possibilitariam que fosse comercializada sob a forma de um produto minimamente processado, ou seja, sob a forma de filetes, conservados em refrigeração com embalagem de atmosfera modificada ou vácuo.

Consequentemente, o objectivo principal deste estudo foi avaliar o efeito do pré-tratamento de estabilização com gás solúvel (SGS) na qualidade de filetes de sardinha embalados em ar, vácuo e atmosfera modificada, de modo a:

- Obter um produto minimamente processado, que permita a comercialização da sardinha, nos meses em que tradicionalmente o consumo é mais baixo.
- Proporcionar aos consumidores a possibilidade de consumir sardinha fresca, sob a forma de filetes, durante todo o ano.
- Aumentar o tempo de vida deste produto tendo em conta a segurança alimentar.
- Reduzir os desperdícios no consumo de sardinha.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Matéria-prima

A sardinha utilizada nos ensaios foi capturada na zona de Sesimbra, por uma embarcação de pesca comercial. O transporte até ao INIAP/IPIMAR, foi feito em camião isotérmico, pela empresa fornecedora da sardinha, em caixas de poliestireno devidamente providas de gelo. As datas de recepção de cada lote de sardinha (20kg) no INIAP/IPIMAR foram: 15 de Março de 2006 para a sardinha embalada em ar, 29 de Março para a sardinha embalada em vácuo e 17 de Maio para a sardinha embalada em atmosfera modificada. No dia da recepção, as sardinhas foram imediatamente processadas, isto é, filetadas, tratadas com SGS, embaladas e colocadas na câmara de refrigeração a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.1.2. Processamento da Sardinha

1ª etapa: Recepção das sardinhas em caixas de poliestireno com gelo



2ª etapa: As sardinhas foram lavadas com água corrente e as escamas retiradas



3ª etapa: Retiraram-se a cabeça, o rabo e as vísceras



4ª etapa: As sardinhas foram novamente lavadas em água corrente e retiraram-se os filetes com pele, o mais rente possível à coluna vertebral.



5ª etapa: Os filetes foram novamente lavados com água corrente e colocados a escorrer, entre 5 a 10 min, procedendo-se então à sua colocação nas bandejas. (Entre 15 a 20 filetes por embalagem)



6ª etapa: Os filetes foram sujeitos ao tratamento SGS. Após serem colocados nas bandejas, foram introduzidos na câmara de pressão, onde foram sujeitos a uma concentração de CO₂, no interior da câmara, próxima de 100%, a uma pressão de 2 bar, durante 15 e 30 min.



7ª etapa: Após o tratamento SGS, as bandejas com os filetes foram colocadas dentro de sacos de poliamida/polietileno, que foram selados numa máquina de embalar, em condições que levaram à obtenção de filetes embalados em ar, em vácuo (96% de vácuo - 40 mbar) e em atmosfera modificada.



8ª etapa: As embalagens foram colocadas numa câmara de refrigeração a 2±1°C durante um período de 12 dias.

3.1.3. Material de embalagem

Utilizaram-se embalagens LINfresh Plus® (OvarPack - Embalagens S.A., Ovar, Portugal). Estas são constituídas por duas folhas de poliestireno com absorvente no interior e perfuradas na superfície de contacto com o alimento, possibilitando uma melhoria na apresentação e conservação do produto, ao permitir que o exsudado do produto seja absorvido pelo filtro interior da bandeja, evitando assim a sua permanência na superfície da embalagem.

Os sacos de embalar, com uma espessura de 140 µm, eram compostos por uma fina camada de poliamida que funciona como uma barreira aos gases e duas camadas de polietileno. A taxa de transmissão dos gases, através dos sacos, é de 25,0 para o O₂, 61,0 para o CO₂ e 8,8 para o N₂ (cm³/m²/24h a 75% de HR (humidade relativa) e a 23°C) conforme indicação do fabricante (Vaessen-Schoemaker, Ovar, Portugal).

Utilizou-se uma máquina de selar embalagens da marca Multivac modelo A 300/52 (Multivac Sepp Haggemuller Kg, Wolfertschwenden, Alemanha), para embalar os filetes

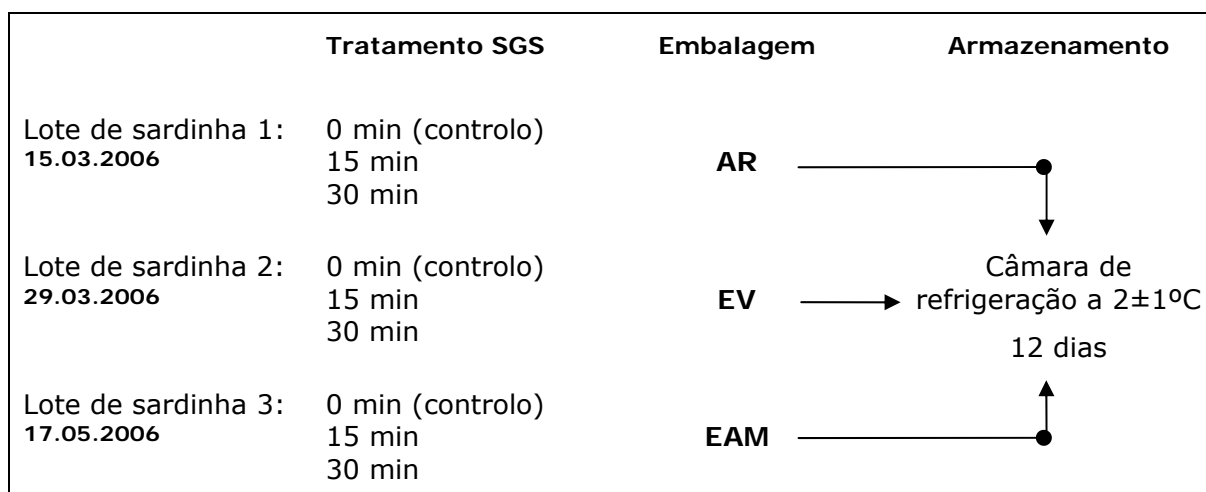
em ar, em vácuo e em atmosfera modificada. O nível de vácuo utilizado foi apenas de 96% para evitar o esmagamento dos filetes.

O gás (CO₂) utilizado no tratamento SGS e a mistura gasosa (5%O₂:35%CO₂:60%N₂) utilizada nas embalagens de atmosfera modificada, eram de uso alimentar e foram fornecidos pela empresa Praxair Portugal Gases, SA.

3.2. Metodologia

No Quadro 3. apresenta-se esquematicamente as diferentes fases que ocorreram desde a chegada das sardinhas, até à obtenção das embalagens de filetes na câmara de refrigeração.

Quadro 3. Resumo do processo de obtenção dos filetes para armazenagem a 2±1°C.



(AR – filetes embalados em ar, EV – filetes embalados em vácuo, EAM – filetes embalados em atmosfera modificada)

Durante o período de armazenagem, retiraram-se embalagens em duplicado das amostras controlo (0min), das amostras com tratamento SGS 15 min e das amostras com tratamento SGS 30 min. As amostragens foram feitas no dia da recepção da sardinha e durante o período de armazenamento ao 2º, 5º, 8º e 12º dia de armazenamento. O primeiro parâmetro a ser medido em cada dia de amostragem foi a composição gasosa da embalagem, seguidamente procedeu-se à análise microbiológica e finalmente à avaliação sensorial. Os filetes foram então congelados a -80°C até à data em que se efectuaram as análises químicas e a determinação do pH.

3.2.1. Composição gasosa da embalagem

Para a medição dos gases no interior das embalagens utilizou-se um analisador de gases Abissprint 10, com uma precisão de 0,1% para o O₂ e de 0,2% para o CO₂. Esta medição

foi efectuada nos dias de amostragem, utilizando-se duas embalagens de cada lote, imediatamente antes da abertura das mesmas. Foram feitas duas leituras em cada embalagem.

3.2.2. Análises microbiológicas

Efectuaram-se contagens de microorganismos viáveis totais e anaeróbios totais em Plate Count Agar por incorporação e incubação a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ de acordo com a Norma Portuguesa NP-3278 de 1986.

3.2.2.1. Preparação do diluente e dos meios de cultura

O diluente (solução de triptona sal) e o meio de cultura Plate Count Agar (PCA) da Merck foram preparados de acordo com as indicações do fabricante e foram esterilizados em autoclave a 121°C , durante 15 min. Após a preparação, o meio de cultura e o diluente foram armazenados em câmara frigorífica, a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, até à sua utilização.

3.2.2.2. Preparação da amostra

Em cada dia de amostragem retiraram-se três filetes de cada embalagem (duas embalagens por lote), dois das extremidades e um do centro da embalagem. Cortaram-se pedaços de cada filete, para sacos estéreis até perfazer 10 g e adicionou-se 90 ml de diluente, para preparação da suspensão mãe, de acordo com a Norma Portuguesa NP 3005. Homogeneizou-se num agitador "Stomacher" (Colwoth 400), durante 1 minuto. Prepararam-se diluições decimais para as seguintes determinações: contagem dos microorganismos viáveis totais (CVT) e contagem dos microorganismos anaeróbios viáveis totais (CAVT). As diluições e as inoculações foram realizadas numa câmara vertical de fluxo laminar Biohazard Braun. O número de microorganismos foi determinado por contagem directa das colónias e foi expresso em unidades formadoras de colónias por grama de polpa, na escala logarítmica log (ufc/g).

3.2.2.3. Contagem de microrganismos viáveis totais

Efectuou-se a contagem total de microrganismos segundo a metodologia descrita na NP 3278 (1986). Fundiu-se o meio de cultura (PCA) em banho de água fervente e colocou-se em banho-maria a 50°C , mantendo-se a esta temperatura até à altura de inocular. Realizou-se a sementeira por incorporação de 1 ml de inóculo de amostra em

aproximadamente 15 ml de PCA, agitou-se em seguida de forma a obter uma distribuição homogénea do inóculo. Deixou-se solidificar à temperatura ambiente e incubou-se durante 72 h a $30\pm 1^{\circ}$ C. As sementeiras foram feitas em duplicado.

3.2.2.4. Contagem de microrganismos anaeróbios viáveis totais

O procedimento foi igual ao descrito para a contagem dos microrganismos viáveis totais, excepto a incubação que foi feita em jarra de anaerobiose com um gerador de anaerobiose "Oxoid AnaeroGen™", cujo composto activo é o ácido ascórbico e um indicador de oxigénio.

3.2.3. Análise sensorial

Para a avaliação sensorial dos filetes de sardinha crus e cozidos utilizaram-se duas fichas de prova, uma adequada à apreciação de sardinha crua (Anexo I) e outra adequada à apreciação de sardinha cozida (Anexo II). A avaliação decorreu na sala de análise sensorial do INIAP/IPIMAR. O painel foi constituído por oito provadores com experiência em análise de pescado, 4 elementos do sexo feminino e 4 elementos do sexo masculino com idades compreendidas entre os 25 e os 55 anos.

Na análise em cru, os filetes de sardinha foram apresentados aos provadores dentro das respectivas embalagens de armazenamento. A cada provador foi apresentada uma embalagem de cada lote e foi pedido que avaliasse os seguintes atributos: aparência da pele, cheiro, firmeza e cor da carne. Na análise em cozido, os filetes foram embrulhados em papel de alumínio, colocados num tabuleiro e cozidos num forno a vapor, a 100° C, durante sete minutos. A cada provador foi apresentado um filete de cada lote e foi pedido que avaliasse os seguintes atributos: cheiro, firmeza, suculência e sabor. Na avaliação sensorial de cada atributo foram dadas pontuações de demérito entre 0 e 3, o que perfazia um resultado total igual a 0, para filetes de elevada qualidade e um resultado total igual a 12, para filetes completamente deteriorados. A partir de dados registados na bibliografia (Ababouch *et al.*, 1996; Goulas e Kontominas, 2006; Özogul *et al.*, 2003) considerou-se que o limite de aceitação correspondia a uma pontuação de demérito total igual a 7,0.

3.2.4. Análises químicas e medição de pH

Para a realização das análises químicas e medição do pH, os filetes de sardinha armazenados a -80° C foram colocados a descongelar de um dia para o outro no

frigorífico. No dia da análise, cerca de 8 filetes de cada embalagem foram triturados numa picadora Moulinex, constituindo-se uma polpa que seria utilizada nas várias determinações: composição química (apenas no dia 0), valor de pH, teor de azoto básico volátil total (ABVT), teor de nucleótidos, índice peróxidos (IP) e teor de malonaldeído (Índice TBA).

3.2.4.1. Composição química

Humidade

A percentagem de humidade foi determinada de acordo com a norma NP 2282 (1991). As caixas de Petri foram colocadas numa estufa a $100\pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, após o que foram colocadas a arrefecer durante 30 minutos num exsiccador. Após tarar a base de cada caixa de Petri, pesou-se 10 g de polpa e colocou-se na estufa a $100\pm 2^\circ\text{C}$ até ao dia seguinte, ou seja, até a amostra ter desidratado por completo. As caixas de Petri foram retiradas da estufa e arrefecidas durante pelo menos 30 minutos no exsiccador, após o que se procedeu à sua pesagem.

A percentagem de humidade foi depois determinada através da seguinte fórmula:

$$H(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Sendo:

H - percentagem (%) de humidade

P_i - a massa inicial da amostra (g)

P_f - a massa final da amostra (g)

Teor de matéria gorda livre

A determinação do teor de matéria gorda livre foi realizada de acordo com a norma portuguesa NP 1972, 1992, com algumas modificações, de acordo com procedimentos internos do laboratório. As análises foram feitas em duplicado.

Pesaram-se 10g de amostra e adicionou-se uma quantidade igual de sulfato de sódio anidro à toma para análise, homogeneizando-se a mistura com o auxílio de um pilão. Transferiu-se a mistura para um cartucho de extracção arrastando todos os vestígios da toma com um papel de filtro que se introduz no cartucho. O cartucho é colocado dentro de um aparelho tipo Soxhleht (2, na fig. 5), onde se coloca um balão (1, na fig. 5), com 80 ml de éter, previamente seco em estufa a $100\pm 2^\circ\text{C}$, durante 1 hora,

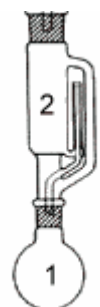


Fig. 5. Aparelho de extracção da gordura

arrefecido em exsiccador e tarado. A extracção durou 7 horas após a 1ª descarga do solvente, no aparelho de extracção aquecido permanentemente por placa térmica. Após a extracção, eliminou-se o solvente por evaporação em placa de aquecimento a temperatura baixa. O balão que continha o extracto (1, na fig. 5) foi a secar numa estufa a $100 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 1 hora e após 30 min de arrefecimento no exsiccador foi pesado. Repetiram-se as operações de aquecimento, arrefecimento e pesagem até que os resultados das duas pesagens sucessivas não diferiram em mais de 0,1% da massa da toma do ensaio.

O teor de matéria gorda livre, expresso em gramas por 100 g de amostra, calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de matéria gorda livre (g/100g)} = (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m}$$

Sendo:

m – massa da toma para análise (g)

m_1 – massa do balão de extracção (g)

m_2 – massa do balão de extracção com o extracto após secagem (g)

Teor de Proteína Bruta

A determinação da proteína bruta realizou-se de acordo com o descrito no AOAC (1998).

Pesou-se 0,5 g de amostra para um papel de filtro, dobrou-se o papel de filtro com a amostra dentro, de forma a evitar a perda de amostra e introduziu-se de imediato num tubo de Kjeldahl. Introduziu-se uma pastilha de catalizador (3,5 mg de selénio e 3,5 mg de sulfato de potássio) no tubo e adicionou-se 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Colocou-se o tubo no digestor (Digestion System 20 1015 Digester Tecator) a cerca de 400°C , até se obter uma solução cor de laranja suave. Deixou-se arrefecer o tubo. Destilou-se o azoto presente na amostra (que foi previamente convertido em amónio) no aparelho de destilação/titulação Kjeldahl, AutoAnalyzer 1035, por arrastamento de vapor e recolha numa solução de ácido bórico 1%, contendo uma mistura de verde de bromocresol e vermelho de metilo. O amoníaco recolhido foi titulado com ácido clorídrico a 0,1 N, por fotocélulas do próprio aparelho. O controlo do aparelho é realizado através de um ensaio com uma solução de sulfato de amónio 1%.

O aparelho Tecator 1035, apresenta o resultado pretendido, ou seja o teor de proteína bruta da amostra em g por 100g e é feita a média aritmética dos duplicados.

Cinza

A determinação do teor em cinza realizou-se de acordo com a NP 2032 (1988), com algumas modificações, de acordo com procedimentos internos do laboratório. As análises foram feitas em duplicado.

Pesaram-se cerca de 5g de polpa de peixe para cadinhos de porcelana, previamente tarados e levaram-se a secar na estufa a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite. No dia seguinte, colocaram-se os cadinhos numa mufla a 100°C . A temperatura da mufla foi aumentada gradualmente até atingir os 550°C , ficando durante a noite a esta temperatura para carbonização das amostras. No dia seguinte, após arrefecimento no exsiccador os cadinhos foram pesados e colocaram-se novamente na mufla a 550°C . Repetiram-se as operações de aquecimento, arrefecimento e pesagem até que os resultados de duas pesagens sucessivas não diferiram em mais de 0,1% da massa da toma do ensaio.

O teor de cinza, expresso em gramas por 100 g de amostra, calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de cinza (g/100g)} = (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m}$$

Sendo:

m – massa da toma para análise (g)

m_1 – massa do cadinho (g)

m_2 – massa do cadinho com a cinza (g)

3.2.4.2. Medição do pH

Utilizando um medidor de pH WTW pH 539, equipado com um eléctrodo Sentix 21 adequado à análise de sólidos. O valor de pH foi medido directamente na polpa de sardinha, a 25°C e em triplicado para cada amostra.

3.2.4.3. Compostos azotados voláteis totais (ABVT)

O teor de ABVT foi doseado pelo método de microdifusão de Conway modificado, descrito por Cobb *et al.* (1973).

Extracção

Pesaram-se 25 g de polpa de sardinha e homogeneizaram-se com 50ml de TCA a 10%, durante 1 minuto, num homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (Kinematica AG), e filtrou-se por papel de filtro Whatman n.º 1. O filtrado foi armazenado a -30°C até à determinação analítica.

Determinação

Para a coroa externa das células de Conway mediu-se 1 ml de água destilada e 1 ml de extracto. Para a coroa central das células de Conway, mediu-se 1 ml de uma solução de ácido bórico a 1%, contendo como indicadores 0,033% de verde de bromocresol e 0,066% de vermelho de metilo. As células foram semi-cobertas com uma placa de vidro de modo a permitir a adição, na coroa externa de 1 ml de uma solução saturada de carbonato de potássio e rapidamente fecharam-se as células com a placa vidro. As células foram então incubadas numa estufa a 40°C, durante 90 minutos. Deixou-se arrefecer e o azoto fixado pelo ácido bórico foi titulado com ácido clorídrico 0,02N, até ao aparecimento de uma cor rosa. Paralelamente, efectuou-se um ensaio em branco com água e um ensaio padrão, com sulfato de amónio a 0,1%, para a determinação do coeficiente de difusão.

Resultado

Utilizou-se a seguinte fórmula para o cálculo do ABVT

$$ABVT_{(mg/100g)} = \frac{21 \times (V_2 - V_0)}{(V_1 - V_0) \times V_3 \times m} \times [V_{TCA} + (m \times H/100)]$$

Sendo:

V_0 - Volume de HCl gasto na titulação do ensaio em branco (ml)

V_1 - Volume HCl gasto na titulação do ensaio de controlo de difusão (ml)

V_2 - Volume de HCl gasto na titulação do ensaio com o extracto da amostra (ml)

V_3 - Volume de amostra utilizado na determinação (ml)

V_{TCA} - Volume de TCA usado para a preparação do extracto (ml)

m - massa da amostra utilizada na preparação do extracto (g)

H - humidade da amostra (%)

3.2.4.4. Teor de nucleótidos

O método utilizado para a determinação do teor de nucleótidos foi a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) de fase reversa tal como descrito por Ryder (1985).

Extracção

Homogeneizou-se num homogeneizador Polytron PT-MR 3000 (kinematica AG), a 0°C, durante um minuto, 5 g de amostra com 25 ml de ácido perclórico 0,6 M. O homogeneizado foi centrifugado a 3000 g, durante 10 minutos, a 0°C, numa centrífuga Sigma modelo 3K30. Retirou-se 10 ml de sobrenadante para um copo e neutralizou-se a pH 6,5-6,8 com uma solução KOH 1M utilizando-se um medidor de pH WTW pH 539. Para

precipitar o perclorato de potássio, formado durante a neutralização, deixou-se repousar o extracto, a 0°C durante 30 minutos. Eliminou-se o precipitado de perclorato de potássio por filtração com cadinhos filtrantes n.º 3 e diluiu-se o filtrado, já sem o perclorato de potássio, com água ultra-pura, até perfazer 20 ml. Os 20 ml de filtrado obtido foram filtrados para um vial, utilizando uma membrana filtrante 0,25 µm de porosidade. Os viais com os extractos foram guardados a -80°C até à determinação analítica.

Análise por HPLC

O aparelho utilizado foi um cromatografo líquido Agilent 1100 Series, com detector DAD (Diode-Array-Detector), bomba quaternária, amostrador automático termostaticado a 10±1°C e injector automático, equipado com uma coluna VDS optilab LiChrosorb RP-18 (10 µm, 200 x 4,6 mm)

As condições de trabalho foram as seguintes:

Fluxo do eluente - 1,6 ml/min; Volume de injeção - 20 µl; Eluição isocrática com detecção a comprimento de onda $\lambda = 254$ nm; Temperatura = 30±0.8°C; Fase móvel - Tampão fosfato 0,1M a pH 6,9 (Pesou-se 10,45g de hidrogenofosfato de potássio e 5,45 g de dihidrogenofosfato de potássio para balão volumétrico de 1000 ml e completou-se o volume com água ultra-pura).

Resultado

Para a identificação e quantificação dos compostos utilizou-se o método do padrão externo, área do pico *versus* concentração. Prepararam-se padrões mistos constituídos por soluções aquosas de ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato), IMP (inosina monofosfato), Ino (Inosina) e Hx (hipoxantina) com as seguintes concentrações: 0,04; 0,08; 0,2 e 0,4 e 0,6 µmol/ml.

A identificação e quantificação dos nucleótidos nos extractos realizaram-se por comparação com os cromatogramas dos padrões a as rectas de calibração, através do mesmo software analítico. Os valores das amostras, analisadas em duplicado, foram expressos em µmol/g de polpa.

Com base nos valores obtidos, calculou-se o índice K, de acordo com Saito *et al.* (1959), utilizando a seguinte fórmula:

$$K (\%) = \frac{Hx + Ino}{Hx + Ino + ATP + ADP + AMP + IMP} \times 100$$

Sendo:

Hx - Hipoxantina

Ino - Inosina

ATP - Adenosina Trifosfato

ADP - Adenosina Difosfato

AMP - Adenosina Monofosfato

IMP - Inosina Monofosfato

3.2.4.5. Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado utilizando a Norma Portuguesa NP 904 (IPQ, 1988) após extracção da gordura segundo o método descrito por Bligh and Dyer (1959).

Este é um método iodométrico, ou seja, é medido o iodo produzido a partir da decomposição do iodeto de potássio pelos peróxidos (Fig 6) (Silva *et al.*, 1999).

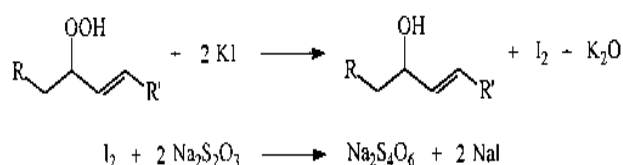


Fig. 6. Reacções que ocorrem na determinação do índice peróxidos: decomposição do iodeto de potássio pelos peróxidos e titulação do iodo com tiosulfato de sódio.

Extracção

Pesaram-se 30 g de amostra e adicionaram-se 90 ml de uma solução metanol/clorofórmio (2:1) fria e agitou-se durante 7 minutos no homogeneizador Polytron. Seguidamente adicionou-se 15 ml de uma solução de cloreto de sódio saturada fria e homogeneizou-se 7 minutos no Polytron, adicionou-se 30 ml de clorofórmio frio e agitou-se 5 minutos no Polytron, finalmente adicionou-se 30 ml de água fria e homogeneizou-se 5 minutos no Polytron. A amostra foi colocada num banho de ultrasons durante 10 min e foi filtrada sob vácuo, para um Kitasato, utilizando um funil de Büchner e papel de filtro n.º 1. O filtrado foi transferido para uma âmpola de decantação e após o processo de decantação, a fase orgânica (inferior) foi recolhida e filtrada com papel de filtro n.º 1 com sulfato de sódio anidro, para um balão de fundo de pêra. O clorofórmio foi evaporado num evaporador rotativo com banho termostaticado a 40°C. O óleo foi recolhido juntando 1 ml de clorofórmio contendo 50 ppm de BHT, para evitar a oxidação durante o armazenamento a -80°C até se proceder à sua análise.

Determinação

Após a descongelação do óleo extraído, o clorofórmio com BHT, foi evaporado utilizando-se uma corrente de azoto. Num frasco Erlenmeyer de 200 ml, pesou-se 0,5 g de óleo, juntou-se 10 ml de clorofórmio, 15 ml de ácido acético glacial (99% a 100%) e 1 ml de solução saturada de iodeto de potássio, rolhou-se o frasco e após ligeira agitação aguardou-se 5 min ao abrigo da luz. Adicionou-se logo de seguida 75 ml de água destilada e titula-se com uma solução 0,01 N de tiosulfato de sódio, servindo de indicador o cozimento de amido a 1% (m/v). Da mesma forma, mas sem a presença de óleo executou-se um ensaio em branco.

Resultado

O índice de peróxido foi calculado a partir da seguinte expressão:

$$\text{Índice de peróxido (meq O}_2 \text{ activo/kg óleo)} = \frac{N \times (V_1 - V_2) \times 1000}{m}$$

Sendo:

N – Normalidade do óleo

m – massa da toma de óleo (g)

V₁ – volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do ensaio com óleo (ml)

V₂ – volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do ensaio em branco (ml)

3.2.4.6. Índice do ácido tiobarbitúrico (TBA)

O índice do TBA foi determinado pelo método espectrofotométrico, de acordo com o procedimento descrito na NP 3356 (1990).

O teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) trata-se de um teste baseado na reacção do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA). Neste ensaio uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor rosa, o qual absorve a 532-535 nm (Fig. 7). Como padrão para a análise quantitativa é usado normalmente o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), o qual liberta MA e etanol, após hidrólise ácida (Silva *et al.*, 1999).

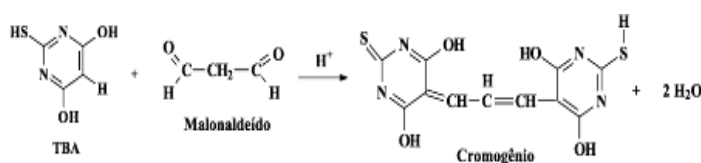


Fig. 7. Reacção entre o TBA e o malonaldeído com formação de um complexo cor-de-rosa.

Extracção

Pesaram-se 15g de polpa de sardinha e homogeneizaram-se, no homogeneizador Polytron durante 2 min, com 50 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 7,5% (m/v), contendo 0,1% de galato de propilo e 0,1% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Filtrou-se por papel de filtro Whatman n.º 1.

Determinação

Mediu-se para um tubo de ensaio 0,5 ml de extracto filtrado, perpez-se o volume a 5 ml com a solução de TCA a 7,5% e adicionou-se 5 ml de solução de TBA (0,02 M), rolharam-se os tubos e colocaram-se em banho de água fervente durante aproximadamente 40 min. Retiraram-se os tubos e após arrefecerem foram agitados para retirar o gás. Registou-se a absorvância num espectrofotómetro Unicam UV/Vis Spectrometer a um comprimento de onda de 530 nm contra ensaio em branco. O ensaio em branco foi conduzido paralelamente à determinação, substituindo o filtrado da amostra por solução TCA (7,5%).

Aferição

O traçado da curva padrão fez-se a partir de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ml da solução padrão 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) de concentração 10^{-8} mol.ml⁻¹, que corresponde respectivamente a 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 µmol de malonaldeído, perfazendo-se o volume a 5 ml com a solução TCA (7,5%) e seguindo a técnica anteriormente descrita.

Resultado

A quantidade de malonaldeído (MDA), expressa em miligrama por kg de músculo, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{TBA(mg/Kg)} = \frac{72 \times C}{m \times V} \times (V_{\text{TCA}} + m \times H / 100)$$

Sendo:

C - concentração de malonaldeído (µmol), obtido a partir da curva de calibração

V - volume da toma (ml)

H - humidade (%)

m - massa da toma de ensaio (g)

V_{TCA} - volume de TCA (7,5%), utilizado na extracção (ml)

3.2.5. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi realizado no software Statistica, vers. 6.0, Stat Soft, Inc. Para a análise estatística dos dados obtidos nos ensaios, utilizou-se o Modelo Linear Geral, Factorial ANOVA. Os resultados foram considerados significativamente diferentes para um nível $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da matéria-prima

Os resultados relativos à caracterização da sardinha de cada lote, em termos de composição química, encontram-se no Quadro 4.

Quadro 4. Composição química (%) dos filetes de sardinha utilizados nos ensaios com embalagens AR, EV e EAM.

	humidade ^a	gordura ^a	proteína ^a	cinza ^a
AR	77,2	2,8	18,4	1,6
EV	68,1	13,6	17,1	1,6
EAM	72,6	5,0	19,9	1,4

^a Os valores representam a média de duas determinações a partir de uma amostra homogeneizada de filetes com pele de 8 sardinhas de cada lote.

A sardinha utilizada neste trabalho apresentou uma composição química bastante variável, no que se refere principalmente aos teores de gordura e humidade. Sendo de realçar, pelo valor consideravelmente mais elevado em gordura, o lote utilizado para embalar a vácuo onde se registou 13,6% de gordura.

A composição química aproximada dos filetes de sardinha utilizados neste trabalho, apresenta valores normais para esta espécie e apesar das diferenças observadas entre os filetes utilizados nos três ensaios, os valores estão de acordo com Murray e Burt (2001), que registaram na *Sardina pilchardus* variações de humidade entre 60 e 80%, na gordura entre 2,0 e 18,0% e na proteína entre 17,0 e 20,0%. Nas publicações avulsas do IPIMAR, n.º 11 de 2004, são referidos como valores da composição química da sardinha: 1,3% de cinza, 70,7% de humidade, 10,9% de gordura e 17,9% de proteína.

Como se pode constatar, a partir da observação dos dados deste trabalho e de dados publicados, esta espécie apresenta uma variação muito grande na composição química, em particular no teor em gordura. De acordo com Bandarra *et al.*, 2001 a sardinha constitui um bom exemplo de uma espécie cujo teor em gordura está sujeito a variações sazonais apreciáveis (com um mínimo de 1,2% em Março-Abril e um máximo de 18,4% em Setembro-Outubro). As causas básicas, para que existam diferenças na composição química do pescado, são geralmente a variação na quantidade e na qualidade do alimento que o peixe ingere e a quantidade de movimento que faz. Quando há um excesso de peixes, pode não haver suficiente alimento para todos, o consumo alimentar será mais baixo e a composição mudará de acordo com a quantidade de alimento que ingerem (Murray e Burt, 2001). Uma vez que as sardinhas foram obtidas em datas diferentes, provavelmente as sardinhas utilizadas na embalagem EV, tiveram um tipo de

alimentação diferente, tanto em quantidade como em qualidade, relativamente às sardinhas utilizadas nas embalagens AR e EAM, o que poderá explicar as diferenças na composição química, nomeadamente o teor em gordura.

4.2. Composição gasosa das atmosferas das embalagens

A composição gasosa das embalagens de filetes de sardinha com ar, encontra-se representada nos Quadros 5 e 6.

Quadro 5. Evolução da quantidade de O₂ (%)^a no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em AR.

dias	controlo	SGS	
		15 min	30 min
2	13,3±0,2	10,8±0,4	11,1±0,4
5	9,6±0,3	7,8±0,2	8,1±0,0
8	6,1±0,9	4,8±3,4	5,0±0,4
12	3,8±0,9	3,9±0,4	3,9±0,4

^a média de 4 determinações (n= 2 embalagens x 2 análises) ± desv. pad.

Quadro 6. Evolução da quantidade de CO₂ (%)^a no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em AR.

dias	controlo	SGS	
		15 min	30 min
2	2,4±0,1	22,4±0,9	22,3±1,4
5	2,6±0,2	22,6±0,6	23,3±0,2
8	3,0±0,5	23,1±1,4	24,0±0,5
12	3,6±0,2	22,6±0,9	23,6±0,6

Ao longo do período de armazenagem dos filetes de sardinha em embalagem com ar, a composição da atmosfera evidenciou algumas alterações no que se refere ao O₂ (Quadro 5). A quantidade de O₂ no interior da embalagem, apresentou um decréscimo significativo ($p < 0,05$), tanto nas amostras controlo (0 min), como nas amostras com tratamento SGS (15 min e 30 min). Ao fim de 2 dias de armazenagem as embalagens das amostras controlo apresentavam 13,3% de O₂ no seu interior, enquanto as amostras com tratamento SGS, registavam uma quantidade em O₂ cerca de 11%, significativamente inferior ($p < 0,05$). No final da armazenagem, todas as amostras apresentavam um valor semelhante de O₂ (3,8-3,9%).

No que se refere a alterações na quantidade de CO₂ (Quadro 6), ao longo do período de armazenagem, verifica-se que não há uma alteração significativa ($p > 0,05$), tanto nas embalagens controlo como nas embalagens com tratamento SGS. No entanto, a atmosfera das embalagens de filetes com tratamento SGS, registou um valor significativamente superior ($p < 0,05$) de CO₂, entre 22,3 e 24,0%, durante o período de armazenagem, relativamente à atmosfera da embalagem controlo, que apenas atingiu valores de CO₂ entre 2,4 e 3,6%. Este resultado era expectável pois o tratamento SGS, em que os filetes foram sujeitos a 100% de CO₂ a 2 bar, durante 15 e 30 minutos resulta

na absorção de uma determinada quantidade de CO₂ pelas amostras, que depois é libertado para a atmosfera da embalagem até ser estabelecido um equilíbrio.

Os diferentes tempos de tratamento SGS aplicados aos filetes de sardinha, nomeadamente 15 e 30 min, originaram um efeito semelhante no que se refere à quantidade de O₂ e CO₂ no interior das embalagens (Quadros 5 e 6).

A composição gasosa das embalagens de filetes de sardinha com atmosfera modificada, encontra-se representada nos Quadros 7 e 8.

Quadro 7. Evolução da quantidade de O₂ (%)^a no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em EAM.

dias	controlo	SGS	
		15 min	30 min
2	5,7±0,0	4,4±0,0	4,5±0,2
5	2,9±0,2	2,2±0,1	2,1±0,1
8	1,2±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1
12	0,1±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1

^a média de 4 determinações
(n= 2 embalagens x 2 análises) ± desv. pad.

Quadro 8. Evolução da quantidade de CO₂ (%)^a no interior da embalagem, durante o período de armazenagem em EAM.

dias	controlo	SGS	
		15 min	30 min
2	23,6±0,9	34,7±1,1	39,1±1,3
5	22,7±1,2	33,3±1,2	39,0±0,7
8	22,5±0,6	33,9±1,0	38,7±0,3
12	23,4±0,2	35,7±1,1	40,1±0,4

Ao longo do período de armazenagem, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na quantidade de O₂ no interior das embalagens EAM, das amostras controlo e com tratamento SGS (Quadro 7), à semelhança do sucedido nas amostras embaladas em AR. Este facto, deve-se provavelmente à utilização do O₂ da atmosfera da embalagem, pelos microorganismos existentes no peixe e ao consumo de oxigénio nos processos químicos e bioquímicos que ocorrem no filete, nomeadamente a oxidação. No entanto, de acordo com o expectável, os valores de O₂ e a sua gama de variação nas embalagens EAM (5,7% a 0,1%), são significativamente inferiores ($p < 0,05$) ao registado nas embalagens AR (13,3% a 3,8%).

Relativamente à quantidade de CO₂ no interior das embalagens EAM (Quadro 8), observa-se que as amostras controlo apresentaram valores entre 22,5% e 23,6%, sendo estes significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos valores apresentados nas embalagens das amostras com tratamento SGS (33,3 e 40,1%). Constatou-se novamente, que as quantidades de CO₂ no interior das embalagens controlo e com tratamento SGS, não apresentaram uma alteração significativa ($p > 0,05$), ao longo do período de armazenagem.

Outro facto que se pode observar, refere-se à quantidade de CO₂ no interior da embalagem das amostras controlo em EAM (Quadro 8) não ser significativamente diferente ($p > 0,05$) da quantidade de CO₂ atingida no interior das embalagens das amostras SGS 15 e 30 min em AR (Quadro 6), sendo registados para ambos os casos valores de CO₂ entre 22,3 a 24,0%. Este facto sugere que, relativamente à quantidade de CO₂ obtida no interior da embalagem, o efeito do tratamento SGS com 100% de CO₂ a 2 bar, durante 15 ou 30 minutos, é semelhante ao efeito produzido pela embalagem com atmosfera modificada com a composição 5%O₂:35%CO₂:60%N₂.

No que se refere ao efeito do tempo do tratamento SGS sobre a composição em CO₂ das embalagens de filetes (Quadro 8), verifica-se que a embalagem com SGS 30 min, apresentou uma concentração de CO₂ (38,7 a 40,1%), significativamente superior ($p < 0,05$) à concentração apresentada nas embalagem com SGS 15 min (33,3 a 35,7%).

As diferenças observadas, relativamente às concentrações de CO₂ no interior das embalagens das amostras com tratamento SGS em AR e EAM, quando comparadas com as respectivas amostras controlo, pode ser explicado pelo facto do tratamento SGS, em que as amostras são sujeitas a uma atmosfera com 100% de CO₂ a uma pressão de 2 bar, fazer com que se dissolva uma grande quantidade de CO₂ no interior do produto em pouco tempo. Sivertsvick *et al.* (2004), estudaram a solubilidade e a taxa de absorção de CO₂ em filetes de peixe cru e constataram que a solubilidade do CO₂ aumenta linearmente com o aumento de pressão parcial de CO₂. Estes autores observaram ainda que um filete de peixe exposto a 100% de CO₂ durante 4,6 horas atinge a mesma quantidade de CO₂ dissolvido no seu interior que um filete exposto a 50% de CO₂ durante 3 dias. Como a água é o maior componente do músculo do peixe obtiveram uma correlação entre a solubilização teórica prevista do CO₂ na água e na gordura e a solubilização obtida por medição no peixe. Estes autores observaram ainda que a solubilidade do CO₂ é bastante elevada nos ácidos gordos polinsaturados da gordura do salmão. O mesmo poderá acontecer com a sardinha que contém ácidos gordos polinsaturados semelhantes, em quantidade e qualidade, aos ácidos gordos polinsaturados do salmão.

O tratamento SGS em conjunto com a embalagem em atmosfera modificada resultou numa maior concentração de CO₂ no interior da embalagem na ordem dos 33,3 a 40,1%, relativamente à amostra controlo (Quadro 8). Este resultado está de acordo com o referido por Rotabakk *et al.*, (2006). Estes autores, concluíram que o tratamento com SGS em combinação com a EAM aumenta possivelmente a % de CO₂ no interior da embalagem, para além de reduzir o colapso da embalagem, que poderá acontecer devido à absorção de CO₂ pelo alimento.

4.3. Análise sensorial

A evolução dos resultados correspondentes à avaliação sensorial das amostras, é apresentada no Quadro 9 e mostra para os três tipos de embalagem, um aumento significativo ($p < 0,05$) nos pontos de demérito atribuídos aos filetes de sardinha, ao longo dos dias de armazenagem. Isto indica, como seria de esperar, um decréscimo na qualidade dos filetes em cru e em cozido durante o período de armazenagem.

Quadro 9. Evolução dos resultados obtidos na avaliação sensorial (pontos de demérito)^{a,b} dos filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.

Dias	Tratamento	Filete cru			Filete cozido		
		AR	EV	EAM	AR	EV	EAM
0	controlo	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,0	1,8 ± 1,0
	SGS 15 min	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,0	1,8 ± 1,0
	SGS 30 min	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,0	1,8 ± 1,0
2	controlo	2,4 ± 1,7	4,2 ± 1,3	4,2 ± 1,6	2,2 ± 1,5	3,1 ± 2,7	1,6 ± 1,8
	SGS 15 min	2,9 ± 2,0	3,6 ± 1,1	6,0 ± 1,6	1,6 ± 1,7	1,7 ± 2,0	3,4 ± 3,4
	SGS 30 min	2,7 ± 2,0	3,8 ± 0,8	5,8 ± 2,0	1,2 ± 1,6	1,4 ± 1,2	2,8 ± 1,6
5	controlo	5,0 ± 2,1	5,4 ± 1,0	6,0 ± 1,7	4,9 ± 2,1	5,2 ± 2,2	6,3 ± 2,1
	SGS 15 min	5,4 ± 1,2	6,6 ± 1,3	7,5 ± 1,2	4,0 ± 1,2	6,3 ± 1,3	7,3 ± 1,7
	SGS 30 min	5,1 ± 1,6	6,8 ± 2,1	6,3 ± 1,1	4,4 ± 2,4	6,3 ± 1,4	5,0 ± 2,2
8	controlo	8,1 ± 2,0	7,7 ± 1,3	10,3 ± 1,2	8,4 ± 1,8	8,3 ± 1,6	9,4 ± 2,6
	SGS 15 min	8,7 ± 1,9	6,7 ± 1,8	9,7 ± 2,3	9,3 ± 1,9	6,6 ± 1,7	9,0 ± 2,3
	SGS 30 min	8,7 ± 2,2	6,9 ± 1,9	9,5 ± 2,0	9,0 ± 2,2	6,6 ± 1,3	7,4 ± 3,1
12	controlo	9,4 ± 1,2	9,4 ± 1,0	10,6 ± 0,5			
	SGS 15 min	9,7 ± 1,4	9,2 ± 1,3	11,4 ± 0,5			
	SGS 30 min	9,4 ± 1,7	8,2 ± 0,5	11,6 ± 0,4			

^a Gama de pontuação 0 a 12 (0 boa qualidade e 12 má qualidade). Limite de aceitação 7,0.

^b Os valores representam a média de 8 análises ± desvio padrão.

Para cada dia de amostragem e considerando os métodos de embalagem individualmente, observou-se que as amostras controlo e as amostras com tratamento SGS, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), tanto para os filetes analisados em cru, como para os filetes analisados em cozido. Também não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois tempos de tratamento SGS.

Ao 2º dia de amostragem, os filetes embalados em EAM com tratamento SGS foram considerados, pelo painel sensorial, significativamente diferentes ($p < 0,05$), ou seja, com pior qualidade, que os filetes embalados em AR e EV.

Após 5 dias de armazenagem, os filetes crus para os três tipos de embalagem apresentaram valores de pontos de demérito entre 5,0 e 6,8, não existindo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre eles, com excepção das amostras embaladas em EAM com tratamento SGS 15 min, que registaram um valor de pontos de demérito (7,5) significativamente superior ($p < 0,05$) ao apresentado pelas amostras embaladas em ar, portanto apresentaram pior qualidade sensorial, acima do limite de aceitação (7,0).

Ao 8º dia de armazenagem, a avaliação sensorial em cru e cozido das amostras embaladas a vácuo, mostra que as amostras com tratamento SGS de 15 e 30 min não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si, registando-se respectivamente os valores de 6,7 e 6,9, quando avaliadas em cru, portanto, ainda dentro do limite de aceitação. Por outro lado, os filetes controlo embalados em EV e os filetes embalados em AR e EAM, tanto em cru como em cozido, apresentaram valores acima do limite de aceitação neste ponto de amostragem.

Erkan *et al.* (2006), estudaram o efeito da embalagem em atmosfera modificada (5%O₂:35%CO₂:60%N₂) na qualidade de sardinha armazenada em refrigeração, e observaram que tanto as amostras controlo como as amostras em EAM atingiram o limite de aceitação para o sabor e para o odor em cozido, ao fim de 5 dias. Por outro lado, Özogul *et al.* (2004), observaram que, em termos sensoriais o período de vida útil de sardinha inteira, armazenada a 4°C, era de 12 dias em EAM (60%CO₂:40%N₂), de 9 dias em EV e de 3 dias em AR.

Os resultados obtidos nos trabalhos anteriormente referidos, mostram que na presença de oxigénio as sardinhas têm, em termos sensoriais, um período de vida útil mais curto. Este facto está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, dado que os filetes de sardinha tiveram um período de vida útil de 5 dias quando embalados em AR e EAM (5%O₂:35%CO₂:60%N₂) e de 8 dias quando embalados em EV com tratamento SGS. O factor determinante da rejeição dos filetes foi a análise sensorial, mais

concretamente o cheiro, dado que as sardinhas possuem um elevado teor em ácidos gordos polinsaturados com grande susceptibilidade de autooxidação, o que leva ao aparecimento do cheiro e "flavour" a ranço, antes de serem atingidos os limites químicos e microbiológicos de rejeição. Apesar dos filetes em EV apresentarem um valor de gordura muito superior aos filetes em AR e EAM (quadro 4, da pág. 39), o facto da quantidade de oxigénio ser muito reduzida no vácuo, possibilitou uma menor oxidação da gordura e conseqüentemente menor desenvolvimento de cheiro a ranço. Tal facto é comprovado pelos dados obtidos na determinação dos índices químicos de oxidação - IP (Fig. 11) e TBA (Fig. 12) - que mostram uma menor oxidação dos filetes conservados em vácuo, relativamente aos filetes embalados em ar e em atmosfera modificada, ao longo do período de armazenagem.

Neste estudo, não foram identificados os compostos responsáveis pelos cheiros desagradáveis que se desenvolvem nos filetes de sardinha. No entanto, Triqui e Bouchriti (2003) fizeram um estudo comparativo entre as alterações sensoriais de *Sardina pilchardus* e os voláteis determinados instrumentalmente e observaram que o cheiro da sardinha ao 4º dia de armazenagem a 4°C começou a ser desagradável, embora os peixes ainda pudessem ser utilizados para consumo. Quando a sardinha alcançou este limite de vida útil (4 dias), o cheiro a ranço e a peixe dominavam o padrão de cheiro. Os resultados correspondentes às análises instrumentais indicaram um aumento na concentração de "metional, 1 octeno-3-ona", e outros derivados voláteis oxidativos.

4.4. Análises microbiológicas

4.4.1. Contagem de microorganismos viáveis totais

A evolução das contagens de microorganismos viáveis totais durante o período de armazenagem dos filetes embalados está representada na Fig. 8. No anexo III encontra-se o quadro com os valores e o respectivo desvio padrão.

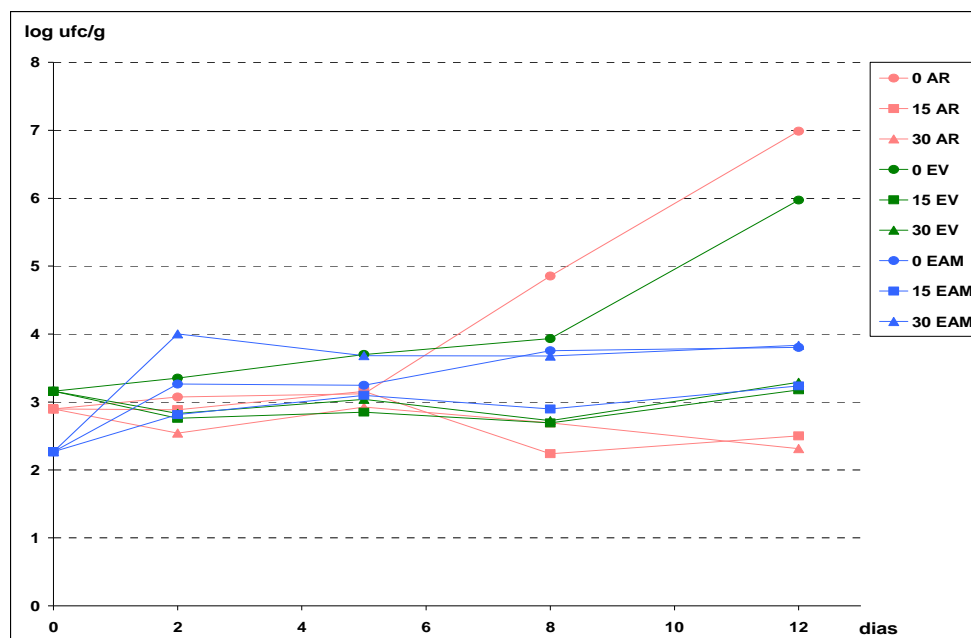


Fig. 8. Evolução da contagem de microorganismos viáveis totais dos filetes sujeitos a 0, 15 e 30 min de pré-tratamento SGS e embalados em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.

Relativamente à carga microbiológica das sardinhas utilizadas, o número inicial aproximado foi de 2,9 log ufc/g ($7,9 \times 10^2$ ufc/g) para os filetes em AR, 3,2 log ufc/g ($1,4 \times 10^3$ ufc/g) para os filetes em EV e 2,3 log ufc/g ($1,85 \times 10^2$ ufc/g) para os filetes em EAM. Estes valores estão em concordância com o obtido por Ababouch *et al.* (1996), em que foram registadas contagens iniciais de $3,4 \times 10^3$ e $1,2 \times 10^3$ ufc/g para sardinha inteira fresca. O número máximo admissível de microorganismos totais para produtos da pesca frescos indicados por IFST (1999) é de 10^7 ufc/g, assim pode considerar-se que as sardinhas dos três lotes apresentavam uma boa qualidade microbiológica inicial e mostra como a manipulação e o processamento foram correctamente efectuados.

No que respeita à evolução ao longo da armazenagem, os filetes embalados em EAM registaram um aumento significativo ($p < 0,05$) entre o início e o 2º dia de armazenagem, cerca de 1 ciclo log, para as amostras controlo e com tratamento SGS 15 min e cerca de 2 ciclos log para as amostras com tratamento SGS 30 min. No entanto, os valores apresentados entre 2,8 e 4,0 log ufc/g estavam bastante abaixo do limite 10^7 ufc/g (IFST, 1999).

A partir do 2º dia, as amostras embaladas em EAM não apresentaram uma evolução assinalável nas contagens microbiológicas, até ao 12º dia de armazenagem, registando-se neste último dia de amostragem, valores de contagens iguais a 3,8 log ufc/g para as amostras controlo e SGS 30 min e a 3,2 log ufc/g para a amostra SGS 15 min. Considerando o limite de microorganismos totais, anteriormente referido (10^7 ufc/g ou 7 log ufc/g), podemos afirmar que os filetes embalados em atmosfera modificada apresentaram uma boa qualidade microbiológica durante todo o ensaio.

Erkan *et al.* (2006), estudaram o efeito da embalagem em atmosfera modificada (5%O₂:35%CO₂:60%N₂) na qualidade de sardinha inteira armazenada em refrigeração, e observaram que durante o período do ensaio (9 dias), as amostras em EAM registaram valores nas contagens de microorganismos abaixo de 3,7 log ufc/g. Este resultado é bastante semelhante ao obtido no presente estudo, ou seja, a utilização de uma atmosfera modificada inibiu, como esperado, o crescimento microbiano.

Em relação às amostras embaladas em AR e EV, verificou-se que os valores das contagens de microorganismos totais, até ao 5º dia de armazenagem, não apresentaram alterações significativas.

Por outro lado, pode-se observar que os filetes controlo, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente aos filetes com tratamento SGS, tanto na embalagem AR, como na embalagem EV. As amostras controlo, embaladas em ar, aumentaram 2 ciclos log, entre o 5º e o 8º dia de armazenagem e voltaram a aumentar novamente 2 ciclos log, entre o 8º e o 12º dia. Portanto, ao fim de 8 e 12 dias de armazenagem, as amostras controlo apresentaram contagens microbiológicas significativamente superiores ($p < 0,05$) às registadas nas amostras com tratamento SGS 15 e 30 min. Na embalagem em vácuo, apenas ao fim de 8 dias de armazenagem começa a haver um aumento significativo dos microorganismos nas amostras controlo, observando-se um aumento de cerca de 2 ciclos log entre o 8º e o 12º dia de armazenagem. As amostras controlo, apresentaram portanto, no último dia de armazenagem, um valor significativamente superior ($p < 0,05$) em microorganismos, relativamente às amostras tratadas com SGS, durante 15 e 30 min.

Como se pode observar, pelas curvas de variação das contagens de microorganismos totais, a eficácia do efeito bacteriostático do CO₂, é muito idêntico nos filetes que tiveram tratamento SGS de 15 e 30 min, ou seja, durante o período de armazenagem não houve qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) nas contagens dos microorganismos totais entre os dois tempos de tratamento SGS nas amostras embaladas em AR, EV e EAM. Tal facto, reflecte o que foi observado relativamente à composição gasosa em CO₂ no interior

das embalagens AR e EAM dos filetes que receberam tratamento SGS (Quadros 8 e 10), em que foram registados valores de CO₂ entre 22,3 e 24,0% nas embalagens em AR e entre 33,3 e 40,1% nas embalagens em EAM. Ou seja, as quantidades de CO₂ obtidas com o tratamento SGS no interior das embalagens AR e EAM, foram suficientes para evitar o crescimento microbiano.

Estes resultados estão de acordo com o expectável para produtos embalados em atmosferas contendo CO₂, em que a concentração de CO₂ dissolvido no produto, é responsável pela inibição do crescimento microbiano (Devlieghere e Debevere, 2000).

O limite de 10⁷ ufc/g (IFST 1999), foi atingido apenas nos filetes de sardinha sem tratamento embalados em AR, mas somente ao fim de 12 dias de armazenagem. Este resultado é semelhante ao registado por Camposa *et al.* (2005), que obtiveram contagens de microorganismos totais de aproximadamente 10⁶ ufc/g em sardinha inteira após 12 dias de armazenagem em gelo (0-1°C).

O aumento no número de microorganismos nas amostras controlo embaladas a vácuo, a partir do 8º dia de armazenagem, pode ser devido ao crescimento de bactérias anaeróbias facultativas como por exemplo as da família Enterobacteriaceae, ou mesmo devido ao crescimento de bactérias aeróbias, pois o vácuo aplicado às embalagens de filetes (96%) não foi completamente isento de oxigénio.

De facto, neste trabalho, não foram identificadas as espécies de bactérias possíveis de desenvolver nos filetes de sardinha. Gennari e Tomaselli (1998), estudaram as alterações da microflora da pele e guelras da *Sardina pilchardus* durante o armazenagem em gelo e isolaram 1500 estirpes. As famílias de bactérias mais comuns no peixe fresco foram as Pseudomonadaceae, Neisseriaceae, Flavobacterium/Cytophaga, Enterobacteriaceae, bactéria corineforme e Micrococcaceae. Durante a armazenagem (8 dias) as Pseudomonas (maioritariamente as estirpes não fluorescentes) aumentaram e tornaram-se a flora dominante, as bactérias da família Neisseriaceae (Moraxella, Psychrobacter e Acinetobacter) mostraram um aumento assinalável durante os primeiros 4 dias em gelo, enquanto que a percentagem dos outros grupos de bactérias decresceu visivelmente, no mesmo período.

4.4.2. Contagem de microorganismos anaeróbios viáveis totais

Na Fig. 9 está representada a evolução dos microorganismos anaeróbios. No anexo IV encontra-se o quadro com os valores e o respectivo desvio padrão. Como se pode observar os filetes embalados em EV e EAM tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$)

em microorganismos anaeróbios entre o início e o 2º dia de armazenagem, sendo o incremento de cerca de 2 ciclos log para as amostras embaladas em vácuo e de 2 a 3 ciclos log para as amostras embaladas em atmosfera modificada.

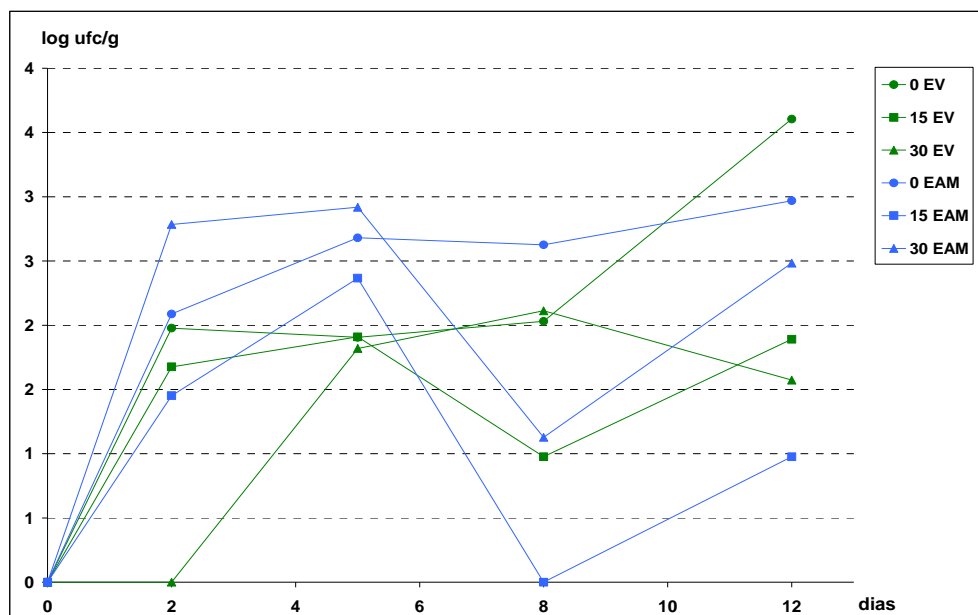


Fig. 9. Evolução na contagem de microorganismos totais anaeróbios, dos filetes em EV e EAM, durante o período de armazenagem.

Ao longo do período de armazenagem não houve qualquer crescimento assinalável em microorganismos nos filetes dos dois ensaios. No 12º dia de armazenagem apenas as amostras controlo, embaladas em EV e em EAM apresentavam um valor significativamente superior ($p < 0,05$) relativamente ao valor do dia 0.

Ao 8º dia de armazenagem observou-se uma diminuição nas contagens de algumas amostras (filetes em EAM 15 e 30 min e filetes em EV 15 min). Isto indica que as bactérias anaeróbias presentes nos filetes destas embalagens tiveram um crescimento mais reduzido, provavelmente porque a quantidade inicial presente nos filetes, também era muito reduzida.

Entre o 8º e o 12º dia de armazenagem, a amostra controlo embalada em vácuo apresenta um aumento de quase 2 ciclos log nas contagens de microorganismos anaeróbios, o que pode explicar o que acontece nas contagens de aeróbios totais nesta amostra no mesmo período, ou seja, poderão ser bactéria anaeróbias facultativas que contribuem, a partir do 8º dia de armazenagem, para o aumento das contagens de viáveis totais das amostras controlo embaladas em vácuo.

4.5. Medição do pH

Os valores do pH para os filetes de sardinha dos três ensaios no início, após 2 e 12 dias de armazenagem a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ estão representados no Quadro 10.

Quadro 10. Valores de pH dos filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM.

	controlo			SGS 15 min			SGS 30 min		
	Dia 0 ^a	Dia 2 ^b	Dia 12 ^b	Dia 0 ^a	Dia 2 ^b	Dia 12 ^b	Dia 0 ^a	Dia 2 ^b	Dia 12 ^b
AR	4,34±0,01	6,29±0,03	6,10±0,01	4,34±0,01	6,26±0,01	6,11±0,06	4,34±0,01	6,24±0,01	6,18±0,05
EV	4,31±0,02	6,19±0,03	6,29±0,04	4,31±0,02	6,27±0,02	6,35±0,01	4,31±0,02	6,15±0,03	6,35±0,04
EAM	6,18±0,02	6,11±0,02	6,25±0,02	6,18±0,02	6,10±0,01	6,22±0,02	6,18±0,02	6,15±0,05	6,18±0,01

^a Os valores representam a média de três determinações a partir de uma amostra homogeneizada de filetes com pele de 8 sardinhas de cada lote \pm desv. pad.

^b Os valores representam a média de 6 determinações (n = 2 embalagens x 3 análises) \pm desv. pad.

O valor médio inicial para as amostras embaladas em AR e em EV foi de 4,34 e 4,31, respectivamente e para as amostras embaladas em EAM foi de 6,18. O valor baixo de cerca de 4,3 pode ser explicado pelo facto das sardinhas utilizadas na obtenção dos filetes para embalar em ar e em vácuo estarem no estado de *rigor mortis* e nesta fase haver uma diminuição do valor do pH, devido à formação de ácido láctico a partir do glicogénio. A diminuição do pH depende, entre outros factores, das condições de pesca pois as reservas de glicogénio dependem da resistência que os peixes opõem à captura (Soares *et al.*, 1998). As sardinhas utilizadas na embalagem em EAM, já não apresentavam um estado de *rigor mortis*, razão pela qual o pH é mais elevado.

Ao 2º dia de armazenagem houve um aumento significativo do pH ($p < 0,05$) nos filetes de sardinha embalados em ar e em vácuo, para 6,29 e 6,19 respectivamente. A partir do 2º dia e até ao final do período de armazenagem, as variações de pH não foram significativas ($p > 0,05$) nos três ensaios e não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre tratamentos SGS ou entre amostras controlo e amostras com tratamento. Após 12 dias de armazenagem, os filetes apresentavam valores de pH entre 6,10 e 6,18 para os filetes embalados em AR, entre 6,29 e 6,35 para os filetes embalados em EV e entre 6,18 e 6,25 para os filetes embalados em EAM. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Erkan *et al.* (2006), que obtiveram valores de pH de 6,21 e 6,23 ao fim de 9 dias de armazenagem de sardinha inteira em AR e em EAM, respectivamente.

4.6. Análises químicas

4.6.1. Teor de azoto básico volátil total - ABVT

No Quadro 11 estão representados os valores de ABVT para os três ensaios, no início e após 12 dias de armazenagem. Em todos os pontos de amostragem foram feitos os extractos para a determinação do ABVT, no entanto tentou-se averiguar, de modo a poupar tempo e material se o ABVT tinha aumentado durante o ensaio e para isso fez-se a determinação no dia 0 e no último dia de amostragem. Como não foi observada uma diferença assinalável entre o início e o fim do ensaio, não foram feitas mais determinações.

Quadro 11. Teor de ABVT(mgN/100g amostra) dos filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM.

	controlo		SGS 15 min		SGS 30 min	
	Dia 0 ^a	Dia 12 ^b	Dia 0 ^a	Dia 12 ^b	Dia 0 ^a	Dia 12 ^b
AR	16,38±0,28	17,36±1,57	16,38±0,28	15,25±0,69	16,38±0,28	17,26±2,36
EV	17,97±0,83	18,45±0,69	17,97±0,83	18,10±0,53	17,97±0,83	19,57±1,17
EAM	18,14±0,42	17,77±1,70	18,14±0,42	19,07±0,71	18,14±0,42	19,25±0,68

^a Os valores representam a média de 3 determinações a partir de uma amostra homogeneizada de filetes com pele de 8 sardinhas de cada lote (n = 3 análises) ± desv. pad

^b Os valores representam a média de 4 determinações (n = 2 embalagens x 2 análises) ± desv. pad.

No dia 0 os filetes de sardinha em AR apresentavam um valor de ABVT de 16,38 mgN/100g e os filetes de sardinha em EV e EAM um valor ligeiramente mais elevado de 17,97 e 18,14 mgN/100g, respectivamente. Pereira *et al.* (2005), verificaram que os teores médios de ABVT de sardinha fresca brasileira (*Sardinella brasiliensis*) comercializada no mercado retalhista variaram de 11,47 a 22,19 mgN/100g, o que estava abaixo do limite estabelecido pela legislação vigente no Brasil, de 30 mgN/100g.

Após 12 dias de armazenagem, os filetes de sardinha dos três ensaios apresentaram valores de ABVT abaixo dos 20 mgN/100g, portanto, abaixo de 25 a 35 mgN/100g que são os valores-limite de azoto básico volátil total (ABVT) para determinadas categorias de produtos da pesca, fixados pela Decisão 95/149/CE da União Europeia. Considerando este índice de qualidade, os filetes de sardinha parecem apresentar no final do ensaio uma qualidade aceitável. No entanto, tendo em conta a análise sensorial, os filetes apenas apresentam qualidade organoléptica até ao 5º dia de armazenagem, quando embalados em AR e EAM e até 8º dia, quando embalados em EV. Dada a falta de

correlação com a análise sensorial, este índice de qualidade não parece adequado para a avaliação dos filetes de sardinha.

Estudos feitos por Aubourg *et al.* (1997), com sardinha (*Sardina pilchardus*), registaram valores máximos de 26,67 mgN/100g, quando refrigerada sob gelo por 9 dias. Ababouch *et al.* (1996) registaram nas mesmas condições, devido a floras bacterianas distintas, dois padrões diferentes de evolução do ABVT: (i) devido ao crescimento de *Shewanella putrefaciens* foi alcançado um valor de 45 mgN/100g em 200 horas (8 dias) e (ii) provavelmente devido a *Pseudomona sp* foi alcançado um valor de 30 mgN/100g em 400 horas (16 dias), evidenciando assim a influência microbiológica sobre a produção de bases voláteis.

Camposa *et al.* (2005), observaram que sardinha armazenada em gelo sob refrigeração a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$, alcançou após 12 dias de armazenagem contagens microbiológicas de 6 log ufc/g, no entanto neste dia o ABVT apresentava um valor relativamente baixo de cerca de 32 mgN/100 g, sem apresentar uma diferença significativa relativamente ao dia 0 (cerca de 20 mgN/100g). No entanto, a partir deste dia e até ao 22º dia de armazenamento, as contagens mantiveram-se perto do valor de 7 log ufc/g, o que poderá ter causado um aumento exponencial do ABVT, atingindo valores de cerca de 80 mgN/100g, no último dia de armazenagem.

Considerando os filetes embalados em AR sem tratamento SGS, o facto deste parâmetro não ter aumentado no presente estudo, pode ser explicado pelas condições de armazenagem, nomeadamente a baixa temperatura a que este decorreu, 2°C e pelo tempo de armazenagem de 12 dias. Estes dois factores, não favoreceram o crescimento dos microorganismos em quantidade e tempo suficientes, para haver produção de bases voláteis. No caso das amostras embaladas em AR, EV ou EAM, com tratamento SGS, ou amostras embaladas em EV ou EAM sem tratamento, não foi observado um aumento neste parâmetro, devido ao efeito bacteriostático do CO_2 e provavelmente, no caso das amostras embaladas em vácuo, devido à falta de uma quantidade suficiente de oxigénio para o crescimento da flora bacteriana aeróbia, responsável pela produção de bases voláteis.

4.6.2. Valor do índice K

Na análise dos filetes de sardinha, o indicador de frescura índice K, foi calculado a partir das concentrações dos nucleótidos, determinadas ao longo do período de armazenagem. Como se pode observar na Fig. 10, ao longo do período de armazenagem, o índice K

aumentou para todos os filetes de sardinha nos três ensaios, não havendo diferenças assinaláveis na evolução deste parâmetro.

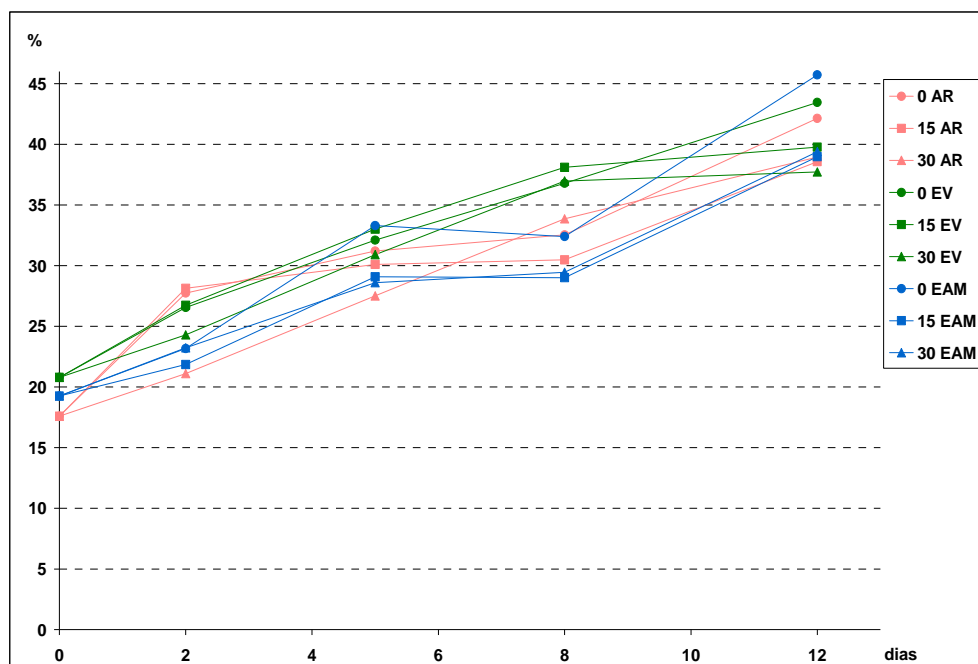


Fig. 10. Evolução do índice K dos filetes em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.

No início dos ensaios, os filetes apresentavam um valor de índice K de 17,6, 20,8 e 19,3% para os filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM respectivamente. Após 5 dias de armazenagem os valores iniciais aumentaram em média cerca de 50%, registando-se valores de índice K entre 28,6 e 33,3%. No último dia de armazenagem verificou-se que os valores do índice K duplicaram em média, relativamente ao dia 0, observando-se valores entre 37,7 e 47,7%.

Em cada dia de amostragem, não foram observadas diferenças assinaláveis, no que se refere a este parâmetro, entre os filetes com o mesmo tipo de embalagem, nem entre os filetes com diferentes tipos de embalagem.

O valor inicial de índice K no músculo de peixes imediatamente após a captura, não deverá exceder 10% (Sikorsky *et al.*, 1990). Por outro lado, o valor de índice K de 20% foi considerado como o limite óptimo de frescura e 60% o valor de rejeição (Ehira, 1976). Pacheco-Aguilar *et al.* (2000) estudaram as alterações do músculo de sardinha Monterey armazenada a 0°C e obtiveram resultados para o valor de índice K de 10,1; 21,7; 36,2; e 50,7% após 1, 5, 10, e 15 dias de armazenagem, respectivamente. Foram observados, para sardinha inteira armazenada em gelo, valores de índice K de 20% após 6 dias de armazenagem (Wakao e Palma-Estrada, 1983) e de 45% após 14 a 15 dias de armazenagem (Ehira e Uchiyama 1986).

Portanto, no presente trabalho, tendo em consideração o parâmetro de frescura índice K os filetes de sardinha apresentaram um grau de frescura aceitável durante o ensaio, pois o valor máximo registado de 47,7% (amostra controlo em EAM) é inferior ao valor de rejeição de 60% sugerido por Ehira (1976). No entanto, quando analisados em termos sensoriais, os filetes de sardinha embalados em AR e em EAM tiveram um período de vida útil de 5 dias, atingindo nesta altura um valor de índice K próximo de 30% e os filetes embalados em vácuo um período de vida útil de 8 dias, quando o índice K apresentava valores próximos de 40%. Estes valores encontram-se abaixo do valor de rejeição 60% sugerido por Ehira (1976). Portanto, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode ser sugerido o valor de índice k igual a 40% como o valor acima do qual os filetes de sardinha poderão ser rejeitados. Estes resultados, demonstram que a definição dos valores limites dos índices de frescura deve ser estudada e adequada a cada caso.

Hoz *et al.* (2000) observaram que o valor de K de filetes de salmão (*Salmo salar*) aumentou a uma taxa similar quando estes foram armazenados a 2°C em atmosferas enriquecidas com CO₂ [CO₂/ar (20/80, v/v), CO₂/ar (40/60, v/v)] ou em atmosferas apenas com ar. Estes autores verificaram que o índice K duplicou em 5 dias alcançando, nesse período um nível acima de 40%. Após 16 dias do armazenagem, os valores estavam acima de 80% em todos os grupos. De acordo com a análise sensorial, estes autores observaram que os filetes de salmão atingiram um período de vida útil de 16 dias quando embalados em atmosfera com CO₂/ar (40/60, v/v), altura em que o valor K era cerca de 80%.

A análise dos resultados, mostra que o enriquecimento da atmosfera com CO₂, não teve nenhum efeito na taxa da degradação dos nucleótidos, isto é, este fenómeno parece ser independente do crescimento microbiano e poderá ser relacionado com os processos *post-mortem* do músculo (Hoz *et al.*, 2000). Este facto é visível, ao serem analisados os dados microbiológicos referentes às contagens de microorganismos viáveis totais (Fig. 8) nas amostras embaladas em AR, em que os filetes com tratamento SGS, apresentaram valores de contagens sem alterações significativas durante o período de armazenagem, contrariamente aos filetes controlo, que ao 8^o e 12^o dia de armazenagem apresentaram um aumento nas contagens. No entanto, ambas as amostras, com tratamento SGS e controlo, apresentaram durante o período de conservação um aumento nos valores do índice k em proporções semelhantes.

4.6.3. Valor do índice de peróxidos (IP)

A evolução do índice de peróxidos nos filetes armazenados em embalagens com ar, vácuo e atmosfera modificada está representada na Fig. 11. No anexo V encontra-se o quadro com os valores e o respectivo desvio padrão.

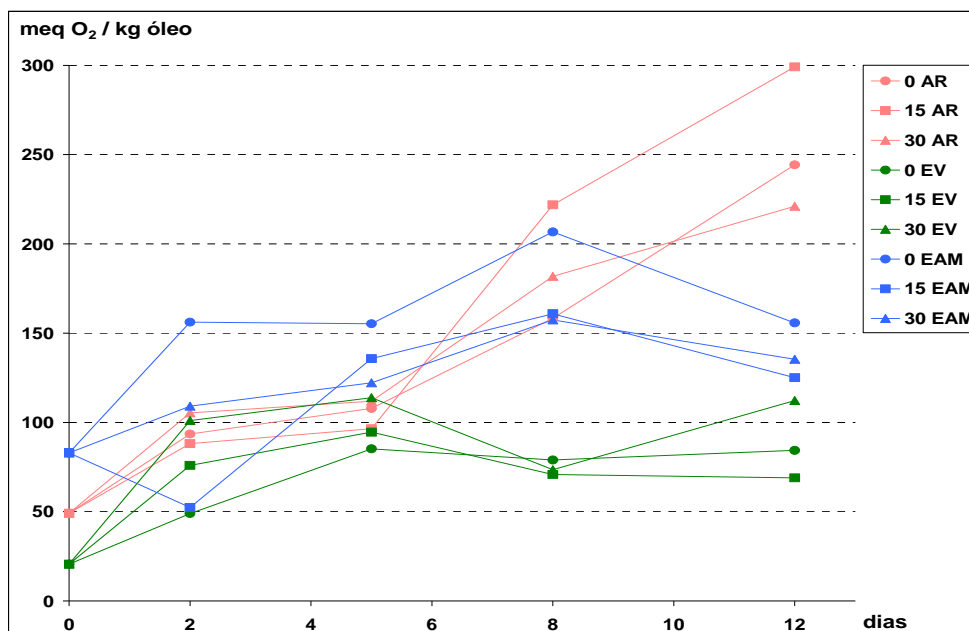


Fig. 11. Evolução do índice de peróxidos dos filetes em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.

No início do ensaio, os filetes de sardinha utilizados na embalagem em AR, EV e EAM, apresentavam respectivamente valores de IP iguais a 49, 21 e 83 meq O₂/Kg óleo.

Na literatura, para espécies de peixe pelágicos pequenos, são referidos valores de IP, iguais a 10 meq O₂/kg óleo, logo após a captura, para sardinha *Clupea pilchardus* (McCallum *et al.*, 1956), e 27,6 meq O₂/kg óleo para sardinha fresca, *Sardinops melanostica* (Cho *et al.*, 1989). Os valores iniciais observados neste trabalho, são ligeiramente superiores, principalmente nas amostras embaladas em AR e EAM. Esta maior oxidação, pode dever-se ao facto de durante o processamento dos filetes o tempo de exposição ao ar ter facultado alguma oxidação primária e também porque para esta análise foi utilizado o filete com pele, pois nesta estrutura existe uma maior quantidade de ácidos gordos polinsaturados susceptíveis de sofrer oxidação. A diferença observada entre as amostras, poderá ser devido a tempos diferentes (em horas) entre a captura e a chegada do peixe ao IPIMAR, ou seja, o lote de sardinhas utilizadas para a embalagem em EAM pode ter tido um tempo maior entre a captura e a chegada ao laboratório, o que fez com que estas apresentassem um estado de oxidação mais avançado, relativamente às sardinhas dos outros lotes. No entanto, esta diferença relativamente ao grau de

oxidação não se reflectiu nas análises microbiológicas e avaliação sensorial, ou seja, todas as amostras apresentavam boa qualidade microbiológica e sensorial ao início.

A análise estatística dos dados mostra que para cada método de embalagem não houve diferenças significativas ($p>0,05$), ao longo do período de armazenagem, entre as amostras controlo e as amostras com tratamento SGS.

Até ao 5º dia de armazenagem, as amostras dos três métodos de embalagem, não apresentaram, entre si, diferenças significativas ($p>0,05$) no valor do índice de peróxidos.

Após 5 dias de armazenagem registou-se um aumento no valor do IP para todas as amostras. Sendo que a percentagem de aumento, desde o início, foi maior nas amostras embaladas em EV (entre 200 a 400%) do que nas amostras embaladas em AR (entre 90 a 120%) e em EAM (entre 50 a 160%). No entanto, a partir desta data as amostras embaladas em EV e em EAM registaram um aumento inferior a 50% até ao final do ensaio, enquanto nas amostras embaladas em AR, a oxidação ocorreu em maior proporção até ao final do ensaio, registando-se um aumento do IP entre 80 a 160%.

Nas amostras embaladas em AR houve um aumento significativo ($p<0,05$) no valor do IP entre o 8º e o 12º dia de armazenagem. Este aumento, pode ser devido ao teor de O_2 , relativamente elevado no interior da embalagem (5%), favorecer a ocorrência de uma oxidação lipídica mais pronunciada e provavelmente também pode ter existido uma menor degradação dos hidroperóxidos em produtos secundários.

Chaijan *et al.* (2006), estudaram as alterações dos lípidos no músculo de sardinha (*Sardinella gibbosa*) durante o armazenagem em gelo e verificaram um aumento acentuado no valor do IP até ao 6º dia de conservação tendo atribuído este facto à rápida oxidação dos lípidos do músculo da sardinha, durante o armazenagem em gelo, provavelmente devido ao elevado teor de ácidos gordos insaturados e prooxidantes no músculo, existentes em especial no músculo escuro. Esta observação, também poderá ser uma explicação para o aumento acentuado valor do IP, registado durante o período de armazenagem dos filetes embalados em AR.

Os filetes embalados a vácuo tiveram um aumento significativo ($p<0,05$) no valor do IP após 5 dias de armazenagem, no entanto, até ao final do período de armazenagem, não foram registadas variações significativas ($p>0,05$) neste parâmetro, para as amostras controlo e com tratamento SGS.

Os filetes embalados em EAM registaram um decréscimo do valor IP no último dia de armazenagem, provavelmente devido ao teor de O₂ no interior da embalagem entre o 8º e o 12º dia de armazenagem ter sido inferior a 1%, havendo deste modo pouca quantidade de oxigénio para a oxidação dos lípidos, e conseqüentemente, uma diminuição da formação de hidroperóxidos. Por outro lado, pode ter ocorrido a degradação dos hidroperóxidos em produtos secundários de oxidação, comprovado pelo valor elevado do índice TBA nas amostras embaladas em EAM (fig. 12).

Os filetes embalados em EV, apresentaram após 8 e 12 dias de armazenagem, um valor de IP significativamente inferior ($p < 0,05$), relativamente ao valor de IP observado para os filetes embalados em AR e EAM, sendo os valores registados no 12º dia para os filetes embalados em AR entre 221 e 244 meq O₂/Kg óleo, para os filetes embalados em EV entre 69 e 112 meq O₂/Kg óleo e para os filetes embalados em EAM entre 125 e 156 meq O₂/Kg óleo.

A mioglobina e outros compostos heme em carnes vermelhas funcionam também como prooxidantes no tecido do músculo (Han, *et al.*, 1994; Love, 1983). Uma concentração elevada de ácidos gordos polinsaturados tornou a sardinha de Monterey susceptível à oxidação (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000). A oxidação dos lípidos é um processo complexo em que os ácidos gordos insaturados reagem com o oxigénio molecular, geralmente através de um mecanismo de radicais livres, para formar hidroperóxidos, os produtos primários da oxidação (Simic and Taylor, 1987). Para além da abundância de ácidos gordos insaturados, a proteína do grupo heme, assim como o ferro reactivo no músculo, podem contribuir para a oxidação acelerada da sardinha. Kisia (1996) relatou que a sardinha continha mais músculo escuro, e maiores quantidades de mitocôndrias, mioglobina, gordura, glicogénio e citocromos, do que as espécies de peixe de músculo branco. O músculo escuro da sardinha tem um maior conteúdo em pigmentos do que o músculo comum (Chaijan *et al.*, 2005). A libertação do ferro não-heme no músculo da sardinha, durante a armazenagem prolongada em gelo, pode realçar o processo da oxidação no músculo (Chaijan *et al.*, 2005). Os factos referidos por estes autores, apoiam o que foi observado, relativamente à oxidação dos filetes de sardinha utilizados neste trabalho.

4.6.4. Valor do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

O índice TBA é uma medida do teor em malonaldeído que é um dos produtos da degradação dos hidroperóxidos lipídicos, formados durante o processo de oxidação dos ácidos gordos polinsaturados. A oxidação dos lípidos, constitui um problema considerável em relação ao desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, no músculo de

peixes que contém tipicamente, uma percentagem elevada dos ácidos gordos polinsaturados (Guillen e Ruiz, 2004), como é o caso da sardinha.

Na Fig. 12 está representada a evolução dos valores do índice TBA para os filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem. No anexo VI encontra-se o quadro com os valores e o respectivo desvio padrão.

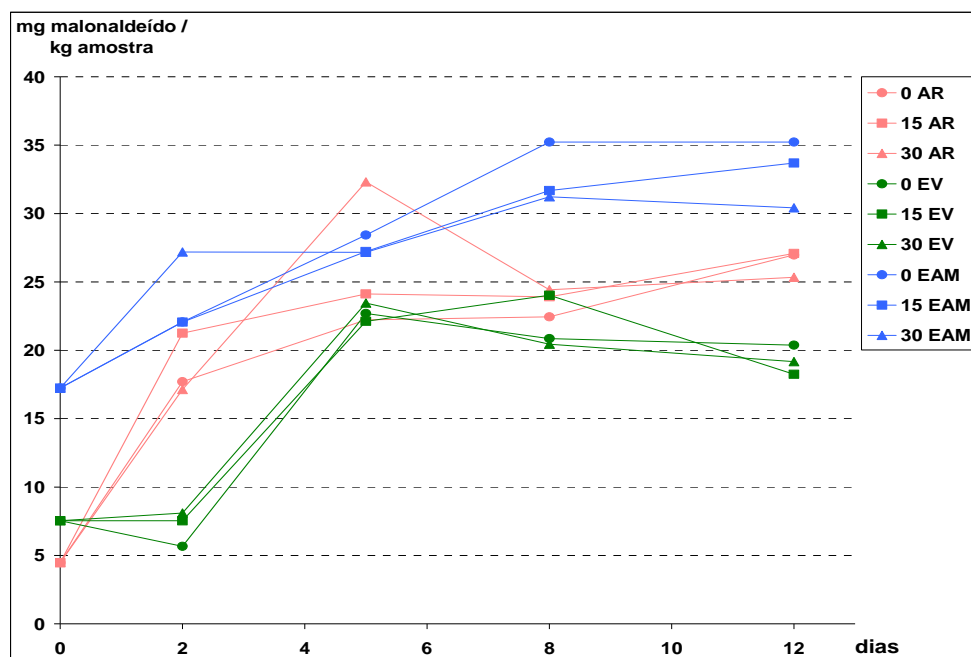


Fig. 12. Evolução do índice de TBA dos filetes em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.

No dia 0 os filetes de sardinha embalados em EAM apresentavam um valor do índice TBA (17,2 mg/kg), significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores do índice TBA apresentados pelos filetes embalados em ar (4,5 mg/kg) e em vácuo (7,5 mg/kg).

Os filetes de sardinha embalados em vácuo entre o início e o 2º dia de armazenagem não apresentaram um aumento significativo ($p > 0,05$) deste parâmetro. Pelo contrário, as amostras embaladas em AR e EAM tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) neste período e apresentaram um valor do índice TBA no 2º dia significativamente superior ($p < 0,05$) ao valor apresentado pelas amostras embaladas em EV. Ao 2º dia de armazenagem as amostras embaladas em AR e em EAM não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no valor do índice TBA, no entanto o aumento relativamente ao dia 0 foi mais acentuado para as amostras embaladas em AR, cerca de 300%, do que para as amostras embaladas em EAM, cerca de 30%.

Ao fim de 5 dias de armazenagem, os filetes embalados a vácuo, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no valor do índice TBA, alcançando apenas neste dia

valores de TBA semelhantes aos registados para os filetes em AR e EAM. Neste dia, não se observaram diferenças significativas nos valores do índice TBA entre os filetes de sardinha de cada ensaio ou entre os três ensaios. A partir do 5º dia de armazenagem e até ao final do ensaio, não foi observado um aumento significativo ($p > 0,05$) no valor do índice TBA para os filetes embalados em AR e EV.

No último dia de armazenagem, os filetes embalados em AR, EV e EAM apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si, no que se refere a este parâmetro, registando-se nos filetes embalados em EV o valor mais baixo (entre 18 e 20 mg malonaldeído/kg) e nos filetes embalados em EAM o valor mais elevado (entre 30 e 35 mg malonaldeído/kg). Apesar dos valores elevados registados para os filetes embalados em EAM, estes apresentaram um aumento no índice de TBA entre 50 a 70% durante o período de armazenagem, e portanto inferior ao apresentado pelos filetes embalados em AR (cerca de 400%) e em EV (entre 200 a 300%). A razão para o sucedido, pode ser o facto dos filetes embalados em EAM exibirem inicialmente, um valor do índice TBA bastante superior, relativamente aos valores do índice TBA dos filetes dos outros lotes.

Foi sugerido por Nunes *et al.* (1992), que o limite máximo do valor de índice TBA, como indicador de uma boa qualidade do peixe inteiro congelado, refrigerado ou armazenado em gelo, é de 5 mg malonaldeído/kg. No entanto, neste trabalho apenas quando os filetes apresentaram valores de índice TBA acima de 20 mg malonaldeído/kg é que foram caracterizados como tendo um cheiro ligeiramente desagradável a ranço. Este valor é bastante superior aos 5 mg malonaldeído/kg, o que pode ser explicado pelo facto do índice TBA ter sido determinado a partir de filetes com pele, em que a pele e o músculo escuro contém mais gordura, susceptível de ser oxidada, e pelo facto de um filete ter uma maior superfície exposta ao ar que um peixe inteiro.

Em relação às alterações no valor do índice TBA, não existe na literatura informação sobre o efeito do tratamento SGS em filetes de sardinha embalados em AR, EV ou EAM. Erkan *et al.* (2006), observaram um aumento dos valores iniciais do índice TBA (1 mg malonaldeído/kg) tanto em sardinhas inteiras embaladas em ar como em amostras embaladas em EAM (5%O₂:35%CO₂:60%N₂), atingindo ao fim de 5 dias de conservação 6,62 mg malonaldeído/kg e 7,42 mg de malonaldeído/kg respectivamente. Apesar dos valores registados no presente trabalho serem superiores, provavelmente devido às amostras serem filetes e não peixe inteiro, os resultados estão de acordo com o aumento do TBA observado no trabalho referenciado, ou seja, tanto as amostras embaladas em ar como as embaladas em EAM (5%O₂:35%CO₂:60%N₂), sofreram oxidação lipídica, indicado pelo aumento no valor do índice TBA. Tal como sucedeu em relação ao valor do

IP, este aumento pode ser explicado pelo teor elevado de O₂ (5%) na embalagem em EAM, que possibilitou a oxidação da gordura.

Goulas e Kontominas (2006), estudaram o efeito da embalagem em EAM (EAM1 - 70%CO₂:30%N₂ e EAM2 - 50%CO₂:30%O₂:20%N₂) e embalagem em vácuo (EV), no período de vida de filetes de cavala (*Scomber japonicus*) armazenados em refrigeração. Estes autores observaram que as amostras EV e EAM1 apresentaram valores significativos de Índice TBA, embora estas amostras não contivessem oxigênio. Esta observação sugere que a produção de malonaldeído não depende somente da quantidade de oxigênio na embalagem mas também de outros factores como: (i) o tipo de flora microbologica presente, (Capillas e Moral, 2001) (ii) a inactivação provável de enzimas antioxidativas, por exemplo glutathiona peroxidase, em consequência da produção de ácido carbónico no músculo dos peixes embalados com elevada concentração de CO₂ e (iii) o ácido carbónico formado poderá também induzir a desnaturação das proteínas do músculo, levando à libertação no tecido de Ferro-não heme, que sendo um potencial prooxidante poderá favorecer a autoxidação dos ácidos gordos polinsaturados (Masnyom *et al.*, 2002). Os valores do índice TBA determinados nas amostras de filetes de sardinha em EV e EAM, sugerem a ocorrência de alguns dos factores referidos por estes autores. Portanto, o enriquecimento da atmosfera da embalagem com CO₂, obtido pelo tratamento SGS ou pela embalagem com atmosfera modificada, reduz eficazmente a deterioração causada pelos microorganismos, mas não evita a deterioração química, principalmente a oxidação lipídica. Assim sendo, para que seja possível uma maior extensão do período de vida útil, considerando os aspectos microbiológicos, químicos e sensoriais, poderão ser aplicados alguns antioxidantes, em combinação com o tratamento SGS ou EAM.

4.7. Discussão global

As alterações registadas durante a armazenagem a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ dos filetes de sardinha embalados em AR, EV e EAM, encontram-se sob a forma de resumo no Quadro 12, para que seja possível fazer uma discussão conjunta.

Quadro 12. Evolução dos parâmetros químicos, sensoriais e microbiológicos dos filetes embalados em AR, EV e EAM, durante o período de armazenagem.

		AR			EV			EAM		
		controlo	SGS 15 min	SGS 30 min	controlo	SGS 15 min	SGS 30 min	controlo	SGS 15 min	SGS 30 min
Dia 0	Microbiologia - CVT (log ufc/g)	2,9	2,9	2,9	3,2	3,2	3,2	2,3	2,3	2,3
	Índice K	17,6	17,6	17,6	20,8	20,8	20,8	19,3	19,3	19,3
	Composição gasosa % (O ₂ /CO ₂)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TBA (mg malonaldeído/kg amostra)	4,5	4,5	4,5	7,5	7,5	7,5	17,2	17,2	17,2
	Sensorial cru (Pontos demérito)	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3
Dia 2	Microbiologia - CVT (log ufc/g)	3,1	2,9	2,5	3,4	2,8	2,8	3,3	2,8	4,0
	Índice K	27,7	28,1	21,1	26,5	26,7	24,3	23,2	21,8	23,2
	Composição gasosa % (O ₂ /CO ₂)	13/3	11/23	11/22	-	-	-	6/24	4/35	4/38
	TBA (mg malonaldeído/kg amostra)	17,7	21,3	17,1	5,7	7,5	8,1	22,1	22,1	27,2
	Sensorial cru (Pontos demérito)	2,4	2,9	2,7	4,2	3,6	3,8	4,2	6,0	5,8
Dia 5	Microbiologia - CVT (log ufc/g)	3,1	3,2	2,9	4,1	2,9	3,0	3,2	3,1	3,7
	Índice K	31,2	30,1	27,5	32,1	33,0	30,9	33,3	29,1	28,6
	Composição gasosa % (O ₂ /CO ₂)	10/3	8/23	8/23	-	-	-	3/22	2/32	2/39
	TBA (mg malonaldeído/kg amostra)	22,2	24,1	32,3	22,7	22,1	23,4	28,4	27,2	27,2
	Sensorial cru (Pontos demérito)	5,0	5,4	5,1	5,4	6,6	6,8	6,0	7,5	6,3
Dia 8	Microbiologia - CVT (log ufc/g)	4,9	2,2	2,7	3,9	2,7	2,7	3,8	2,9	3,7
	Índice K	32,5	30,5	33,9	36,8	38,1	37,0	32,4	29,0	29,4
	Composição gasosa % (O ₂ /CO ₂)	6/3	5/24	5/23	-	-	-	1/22	1/33	1/39
	TBA (mg malonaldeído/kg amostra)	22,4	23,9	24,4	20,9	24,0	20,4	35,2	31,7	31,2
	Sensorial cru (Pontos demérito)	8,1	8,7	8,7	7,7	6,7	6,9	10,3	9,7	9,5
Dia 12	Microbiologia - CVT (log ufc/g)	7,0	2,5	2,3	6,0	3,2	3,3	3,8	3,2	3,8
	Índice K	42,1	38,6	38,9	43,4	39,8	37,7	45,7	39,0	39,4
	Composição gasosa % (O ₂ /CO ₂)	4/4	4/23	3/22	-	-	-	0/23	0/35	0/40
	TBA (mg malonaldeído/kg amostra)	27,0	27,1	25,3	20,4	18,2	19,2	35,2	33,7	30,4
	Sensorial cru (Pontos demérito)	9,4	9,7	9,4	9,4	9,2	8,2	10,6	11,4	11,6

0 dias de armazenagem

No início, os filetes dos três ensaios apresentavam uma boa qualidade microbiológica, química e sensorial.

Os valores das contagens de viáveis totais (CVT) situavam-se abaixo do limite 10^7 ufc/g (7 log ufc/g), apresentando os filetes embalados em AR, EV e EAM valores CVT de 2,9 log ufc/g, 3,2 log ufc/g e 2,3 log ufc/g, respectivamente.

Relativamente à qualidade química os valores do índice K eram semelhantes para os filetes utilizados nos três tipos de embalagem, apesar dos filetes utilizados para embalagem em ar apresentarem um valor de índice K igual a 17,6%, ligeiramente inferior aos filetes utilizados na embalagem em EV e EAM, 20,8 e 19,3%. No entanto, pode-se dizer que as sardinhas utilizadas nos três métodos de embalagem apresentavam um bom grau de frescura. O parâmetro que mede o grau de oxidação das amostras, o índice de TBA, também era inferior para os filetes embalados em AR (4,5 mg malonaldeído/kg) relativamente aos filetes embalados em EV (7,5 mg malonaldeído/kg) e em EAM (17,2 mg malonaldeído/kg). Ainda relativamente ao índice TBA, observou-se que o valor registado para os filetes embalados em EAM era significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores registados nos filetes embalados em AR e EV. Isto pode ter resultado de um maior tempo entre a captura das sardinhas e a chegada ao laboratório, ficando o peixe mais tempo sujeito a oxidação, ou pode também ter havido um mau acondicionamento no transporte, isto é, abuso de temperatura ou o gelo não ter sido suficiente para uma boa conservação, até à utilização das sardinhas.

No que se refere à avaliação sensorial, os provadores atribuíram pontos de demérito muito semelhantes para os três ensaios, tendo sido considerados os filetes dos três lotes de sardinha de muito boa qualidade sensorial e evidenciando-se o lote utilizado para embalagem a vácuo, como o de melhor qualidade (pontos de demérito igual a 0). Apesar dos filetes embalados em EAM apresentarem um maior grau de oxidação, evidenciado pelo valor de índice TBA elevado, os provadores não consideraram que esta amostra apresentasse um cheiro desagradável a ranço.

2 dias de armazenagem

Após dois dias de armazenagem dos filetes a $2 \pm 1^\circ\text{C}$, observou-se a manutenção da boa qualidade microbiológica destes para os três tipos de embalagem.

Os parâmetros químicos no entanto sofreram alterações, indicando a perda de frescura dos filetes de sardinha, como seria de esperar. O valor do índice K aumentou nos três ensaios, no entanto, não foram observadas diferenças assinaláveis, nos valores registados entre amostras ou entre ensaios. Pode-se ainda observar que até ao fim dos ensaios este parâmetro aumentou de forma linear, apesar de alguma flutuações, para todas as amostras dos três ensaios, sem que houvesse o destaque de alguma amostra. Relativamente ao índice TBA, verificou-se um aumento neste parâmetro nas amostras embaladas em AR e EAM, sendo alcançados valores entre 17,1 e 21,3 mg malonaldeído/kg e entre 22,1 e 27,2 mg malonaldeído/kg respectivamente, no entanto, o aumento registado nas amostras embaladas em AR foi muito superior ao aumento nas amostra em EAM. Por outro lado, as amostras embaladas em EV não registaram qualquer aumento assinalável deste parâmetro, mantendo-se os valores do índice TBA entre 5,7 e 8,1 mg malonaldeído/kg.

Em termos sensoriais, os filetes embalados em AR apresentaram todavia, uma pontuação ligeiramente inferior à pontuação apresentada pelas amostras embaladas em EV e estas por sua vez uma pontuação ligeiramente inferior à apresentada pelos filetes embalados em EAM. Apesar das diferenças na análise sensorial entre filetes embalados em ar e filetes embalados em EV, estas não são significativas ($p > 0,05$), pelo que se pode considerar que estes filetes apresentam igualmente uma boa qualidade sensorial. Quanto aos filetes embalados em EAM, os que tiveram tratamento SGS de 15 e 30 min, apresentaram valores de pontos de demérito de 6,0 e 5,8, já próximos do limite de aceitação 7,0, mas ainda apresentavam uma qualidade sensorial aceitável.

5 dias de armazenagem

Após cinco dias de armazenagem a qualidade microbiológica manteve-se boa, isto é, todas as amostras apresentavam valores de CVT semelhantes entre si e sem alterações significativas ($p > 0,05$) relativamente ao 2º dia de amostragem.

Relativamente ao parâmetro químico que mede o grau de oxidação, observou-se um aumento dos valores do índice TBA para todos os filetes, indicando portanto um aumento do grau de oxidação. Os filetes embalados em EV, ao apresentarem valores do índice TBA entre 22,1 e 23,4 mg malonaldeído/kg, mostram ter tido um aumento significativamente mais acentuado ($p < 0,05$) neste parâmetro, atingindo apenas ao fim de 5 dias de conservação, valores de TBA semelhantes aos apresentados pelas amostras embaladas, em AR (22,2 a 32,3 mg malonaldeído/kg) e em EAM (27,2 a 28,4 mg malonaldeído/kg).

Neste dia de amostragem, os filetes utilizados nos três tipos de embalagem, assemelharam-se ainda mais em termos sensoriais e apesar da cotação de demérito dos filetes embalados em AR ter sido ligeiramente inferior à registada para os filetes embalados em EV e EAM, estas diferenças não são significativas ($p > 0,05$). Pode-se considerar que os filetes apresentavam ainda qualidade sensorial aceitável e apesar dos filetes em EV com tratamento e os filetes em EAM terem atingido valores próximos do limite de aceitação, ainda estavam próprios para consumo, com excepção dos filetes com tratamento SGS 15 min em EAM que ao apresentarem o valor de 7,5 estavam acima do limite de aceitação 7,0, sendo por isso considerados impróprios para consumo.

8 dias de armazenagem

No 8º dia de amostragem já se observou uma alteração na qualidade microbiológica, ou seja, a amostra controlo embalada em AR, apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nas CVT de 2 ciclos log, apresentando neste dia um valor de 4,9 log ufc/g, significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores apresentados pelas amostras com tratamento SGS embaladas em AR. No entanto, os filetes em EV e EAM, não apresentaram alterações na qualidade microbiológica, mantendo-se esta boa. Isto deve-se ao facto, das embalagens dos filetes com tratamento SGS em AR apresentarem um conteúdo em CO₂ no seu interior (22 a 23%), significativamente superior ($p < 0,05$) ao apresentado pelo interior da embalagem dos filetes controlo em AR (3%), revelando a existência de um efeito inibidor do crescimento bacteriano, devido à concentração elevada de CO₂.

Relativamente aos valores do índice TBA, apenas se verificou um aumento assinalável deste índice para os filetes embalados em EAM.

A avaliação sensorial, está de acordo com o registado na evolução do índice TBA dos filetes em EAM. Estes, atingiram neste dia valores de pontos de demérito entre 9,5 e 10,3, muito acima do limite de aceitação, ou seja, as amostras neste dia apresentavam um cheiro a ranço desagradável, para além de outros atributos desagradáveis, como a cor da carne ligeiramente descorada e castanha, sendo por isso, consideradas impróprias para consumo. As amostras embaladas em ar também apresentaram valores de pontos de demérito entre 8,1 e 8,7, portanto acima do limite de aceitação, e também apresentavam cheiro a ranço desagradável, portanto, também foram consideradas impróprias para consumo. No entanto, as amostras embaladas em vácuo com tratamento SGS ainda apresentaram valores de pontos de demérito dentro do limite de aceitação (6,7 e 6,9), pelo que ainda se consideraram próprias para consumo. O mesmo já não aconteceu com a amostra controlo embalada em vácuo, que ultrapassou o limite de aceitação e foi considerada imprópria para consumo.

12 dias de armazenagem

No último dia de amostragem, os filetes controlo embalados em AR e EV apresentaram uma qualidade microbiológica significativamente inferior ($p < 0,05$) à qualidade apresentada pelos filetes com tratamento SGS embalados em AR e EV, bem como relativamente aos filetes embalados em EAM. Mais uma vez se verificou o efeito inibidor do crescimento bacteriano, exercido pela concentração elevada de CO_2 no interior das embalagens em que houve tratamento SGS ou com EAM. Apenas ao fim de 12 dias de armazenagem, as amostras controlo embaladas em AR, atingiram o limite de microorganismos totais para produtos da pesca não processados de 10^7 ufc/g (IFST 1999).

Neste dia as amostras já apresentavam um grau de oxidação lipídica muito elevado. O valor do índice TBA nas amostras embaladas em EV diminuiu ligeiramente, provavelmente devido à formação de produtos terciários a partir do malonaldeído. Por outro lado, nas amostras embaladas em AR ainda se registou um aumento deste índice e nos filetes embalados em EAM verificou-se um ligeiro aumento na amostra SGS 15 min, uma diminuição na amostra SGS 30 min e a manutenção do valor na amostra controlo.

Neste dia, todas as amostras ultrapassaram o limite de aceitação, em termos sensoriais, apresentando um cheiro a ranço muito desagradável e a cor da carne castanha, sendo por isso consideradas impróprias para consumo.

5. CONCLUSÕES

As sardinhas utilizadas para os três ensaios de conservação apresentavam ao início uma boa qualidade sensorial, química e microbiológica.

Os três lotes de sardinha apresentavam uma composição química bastante diferente, principalmente no que se refere ao teor de gordura, verificando-se que as sardinhas utilizadas para a embalagem em vácuo registaram um teor de gordura bastante elevado de 13,6% e as sardinhas utilizadas para embalagem em ar e atmosfera modificada um valor do teor de gordura relativamente mais baixo de 2,8 e 5,0%, respectivamente.

Relativamente ao parâmetro que mede a oxidação da gordura, índice TBA, observa-se que no início o valor registado para os filetes embalados em EAM é significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores registados nos filetes embalados em AR e EV.

Apesar dos filetes utilizados na EAM apresentarem um maior grau de oxidação ao início, os provadores não consideraram que esta amostra apresentasse um cheiro desagradável a ranço. Os provadores não atribuíram pontos de demérito muito diferentes para os filetes utilizados nos três ensaios, tendo sido considerados de muito boa qualidade sensorial ao início e evidenciando-se o lote utilizado para embalagem a vácuo, como o de melhor qualidade (pontos de demérito igual a 0).

As amostras controlo, embaladas em EAM (5%O₂:35%CO₂:60%N₂), registaram uma quantidade de CO₂ no interior da embalagem significativamente semelhante ($p < 0,05$) ao registado no interior das embalagens AR de filetes com tratamento SGS, sendo para os dois casos a quantidade de CO₂ atingida no interior da embalagem na ordem dos 22 a 24%.

Em relação à avaliação da qualidade dos produtos da pesca, não é possível impor regras para decidir que valores de índices de frescura devem ser considerados como indicadores de algum estado particular de degradação ou aceitabilidade. Há diferenças entre espécies de pescado, os tipos das bactérias que causam a degradação pode variar e o operador pode influenciar os resultados. Idealmente, a relação entre a frescura medida pela avaliação sensorial e os vários índices de frescura descritos deve ser determinada para a espécie de interesse, utilizando métodos bem definidos, e correspondentes procedimentos de manipulação.

No caso dos filetes de sardinha, se considerarmos apenas o parâmetro microbiológico, os filetes com tratamento SGS de 15 min e 30 min, embalados em AR, e os filetes embalados em EV e EAM, independentemente de terem tratamento SGS, apresentaram um período de vida útil de 12 dias. Por outro lado, os filetes controlo embalados em AR

tiveram um período de vida útil de apenas 8 dias. Observou-se ainda que, durante o período de armazenagem, independentemente do método de embalagem, o crescimento dos microorganismos foi evitado em todas as amostras que receberam tratamento SGS. Este facto, evidencia que a aplicação de 100% de CO₂ a 2 bar aos filetes, resulta num efeito bacteriostático eficaz, que contribui para uma melhoria da qualidade microbiológica destes.

No entanto, na avaliação da qualidade não podemos desprezar a avaliação sensorial, que para esta espécie de peixe, se revela extremamente importante, pois sendo a sardinha uma espécie rica em ácidos gordos polinsaturados, que facilmente sofrem autoxidação, este fenómeno provoca o aparecimento do cheiro a ranço, o que limita, por isso, o seu estado de frescura. Assim sendo e considerando a análise sensorial, os filetes de sardinha embalados em ar e em atmosfera modificada tiveram um período de vida útil de 5 dias e as sardinhas embaladas em vácuo com tratamento SGS (15 e 30 min) tiveram um período de vida útil de 8 dias. A análise dos dados sensoriais em conjunto com os alguns parâmetros químicos permite concluir que os filetes foram rejeitados quando apresentaram valores de índice TBA acima de 20 mg malonaldeído/kg sendo caracterizados como tendo um cheiro ligeiramente desagradável a ranço e quando apresentaram valores de índice K superiores a 30%.

No que se refere aos tempos de 15 e 30 minutos utilizados para o tratamento SGS, a observação dos resultados sensoriais, químicos e microbiológicos indica que 15 min de aplicação de 100% de CO₂ a 2 bar, permite a obtenção de um conteúdo em CO₂ dissolvido no músculo e na atmosfera da embalagem, suficientes para a conservação dos filetes.

O enriquecimento da atmosfera da embalagem com CO₂, obtido pelo tratamento SGS, reduz eficazmente a deterioração causada pelos microorganismos, mas não evita a deterioração química, principalmente a oxidação lipídica.

A utilização da atmosfera modificada, em que se utilizou 5% de O₂, 35% de CO₂ e 60% de N₂, possibilitou a oxidação de gordura, devido à presença de oxigénio no interior da embalagem, e o conseqüente aparecimento de cheiro a ranço. Este facto não permitiu que os filetes em EAM apresentassem um período de vida útil superior ao dos filetes embalados em AR.

A utilização da embalagem a vácuo em conjunto com o tratamento SGS, proporcionou um aumento de 3 dias no período de vida útil dos filetes de sardinha, relativamente ao período de vida útil apresentado pelos filetes embalados em ar e atmosfera modificada.

Para finalizar, pode-se concluir que os objectivos propostos no início do estudo foram atingidos, ou seja:

- Foi possível obter um produto minimamente processado, que permite a comercialização de sardinha nos meses em que o teor de gordura é baixo, com um período de vida útil de 5 dias quando embalada em ar ou em atmosfera modificada, ou com um período de vida útil de 8 dias quando embalada em vácuo.
- Ao processar a sardinha sob a forma de filetes, é proporcionado durante todo o ano aos consumidores a possibilidade de uma confecção culinária, diferente da tradicional sardinha assada, tal como filetes de sardinha fritos, caldeirada de sardinhas, canapés de sardinha, papas de sardinha à algarvia, lombinhos de sardinha marinados, arroz de sardinha, etc.
- Utilizando a embalagem a vácuo e o tratamento SGS foi possível obter um produto com um período de vida útil igual a 8 dias, superior ao período de vida útil de 3 a 5 dias no caso de sardinhas frescas inteiras.
- De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a comercialização de sardinhas frescas, sob a forma de filetes, com pré-tratamento SGS e embalados a vácuo, poderá contribuir para uma diminuição dos desperdícios no consumo de sardinha.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como referido anteriormente a sardinha contém um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados que facilmente sofrem autooxidação, pelo que em atmosferas com oxigénio ao ocorrer a oxidação da gordura, este produto desenvolve, em pouco tempo, um cheiro desagradável a ranço.

De modo a evitar a rancificação dos filetes de sardinha, poderia utilizar-se uma embalagem com atmosfera modificada contendo uma mistura de gases sem oxigénio, constituída por exemplo, por 40% de CO₂ e 60% de N₂. Mas neste caso, por uma questão de segurança, deveriam ser utilizados indicadores de temperatura, pois na ausência de O₂, caso exista abuso de temperatura, isto é, para temperaturas superiores a 3°C, o microorganismo patogénico *Clostridium botulinum* tipo E, poderá crescer e produzir a respectiva toxina.

Outro modo de evitar o aparecimento do cheiro a ranço, seria a utilização de antioxidantes, como por exemplo o ácido ascórbico, que poderia ser pulverizado sobre os filetes após o tratamento com SGS, antes de serem colocados na embalagem com ar ou vácuo.

Uma vez que o tratamento SGS e a embalagem em EAM exercem o mesmo efeito no que se refere à inibição do crescimento microbiano, seria conveniente a realização de um estudo económico sobre a viabilidade de utilizar SGS ou atmosfera modificada.

Uma vez que os três lotes de sardinha utilizados neste estudo apresentaram uma composição química bastante heterogénea, um novo ensaio poderia ser realizado utilizando sardinha do mesmo lote para os três tipos de embalagem. Tendo em conta os resultados obtidos, comparar-se-ia apenas a amostra com tratamento SGS 15 min relativamente à amostra controlo, para cada tipo de embalagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ababouch, L.H.; Souibri,L.; Rhaliby,K.; Ouahdi, O.; Battal, M. and Busta, F.F., 1996. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiology*, 13: 123–132.
- Anónimo. Non-sensory assessment of fish quality. Torry Research Station Series title: Torry Advisory Notes. No. 92
- Aubourg, S.P.; Sotelo, C.G. and Gallardo, J.M., 1997. Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science*. Volume 62, No. 2: 295-304.
- Bandarra, N.M.; Batista, I. e Nunes, M.L., 2001. O Óleo de Sardinha e a Saúde. IPIMAR-Divulgação, n.º 18.
- Bandarra, N.M.; Batista, I.; Nunes, M.L.; Empis, J.M. and Christie, W.W., 1997. Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of Food Science*. Volume 62, No. 1: 40-42.
- Bandarra, N.M; Calhau, M.A.; Oliveira, L.; Ramos M.; Dias, M.G.; Bártole H.; Faria, M.R.; Fonseca, M.C.; Gonçalves, J.; Batista, I. e Nunes, M.L., 2004. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, No. 11
- Beirão, L.H.; Teixeira, E.; Meinert, E.M. e Espírito Santo, M.L.P., 2002. Processamento e Industrialização de Moluscos. *Instituto de Tecnologia de Alimentos*.
- Berset, C. et Cuvelier, M.E., 1996. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des Aliments*, 16: 219-245.
- Bexiga, S., 2005. Governo toma posição face à captura da sardinha. In: portalimentar.com
- Bligh, E. and Dyer, W.V., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Bremner, H.A.; Olley. J. and Vail, A.M.A., 1987. Estimating time-temperature effects by a rapid systematic sensory method. In: *Seafood Quality Determination*. Eds: D. Kramer and J. Liston. Elsevier Science Publishers, 413–435.
- Campos, R.M.; Batista, I. e Nunes, M.L., 1990. Aproveitamento e Valorização da Sardinha (*Sardina pilchardus*). Textos das comunicações do 6º Congresso do Algarve.
- Camposa, C.A.; Rodríguez, Ó.; Losada, V.; Aubourg, S.P. and Barros-Velázquez, J., 2005. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of

- sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*, 103:121–130
- Carroll, J.J.; Slupsky, J.D. and Mather, A.E., 1991. The solubility of carbon dioxide in water at low pressure. *J Phys Chem Ref Data*, 20(6): 1201-1209.
- Castilho, M.C., 2003. Bromatologia e análises bromatológicas. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- Chaijan, M.; Benjakul, S.; Visessanguan, W. and Faustman, C., 2005. Changes of pigments and colour in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 83: 607–617.
- Chen, H.H., 2003. Effect of cold storage on the stability of chub and horse mackerel myoglobins. *Journal of Food Science*, 68: 1416–1419.
- Cho, S.; Endo, Y.; Fujimoto, K. and Kaneda, T., 1989. Oxidative deterioration of lipids in salted and dried sardines during storage at 5 °C. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 541-544.
- Christie, W.W., 1987. The lipid composition of animal tissues. In *HPLC and Lipids: A Practical Guide*, W.W. Christie (Ed.). Pergamon Press., Oxford, UK. p. 55
- Cobb, B.F.; Alaniz, I and Thompson, Jr. C.A., 1973. Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. *J. Food Sci.*, 38. 431-436
- Crovetto, R., 1991. Evaluation of Solubility Data of the System CO₂-H₂O from 273 K to the Critical Point of Water. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 20(3): 575-589
- Decisão 95/149/CE, 1995. Valores limites de azoto básico volátil total (ABVT) para determinadas categorias de produtos da pesca e os métodos de análise a utilizar. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N.º L 097 de 29.04.95.:84-87
- Delbarre-Ladrat, C.; Chéret, R.; Taylor R. and Verrez-Bagnis, V., 2006. Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*; Volume 46 (5): 409-421.
- Devlieghere, F. and Debevere, J., 2000. Influence of Dissolved Carbon Dioxide on the Growth of Spoilage Bacteria. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 33: 531-537.
- Devlieghere, F.; Debevere, J. and Van Impe, J., 1998. Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 43: 105–113.
- Devlieghere, F.; Debevere, J. and Van Impe, J., 1998. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 231-238.

- Dobarganes, C.; Márquez-Ruiz, G.; Velasco, J., 2000. Interactions between fat and food during deep-frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 521–528.
- Eder, K., 1999. The effects of dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. *Lipids*, V. 4, N. 7: 717-723.
- Ehira, S., 1976. Biochemical study on the freshness of fish. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 88:1-5.
- Ehira, S. and Uchiyama, H., 1986. Determination of fish freshness using the K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. In: "Seafood quality determination". D.E. Kramer and J. Liston (Eds.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam. p. 185-193.
- Erkan, N.; Özden, Ö.; Alakavuk, D.Ü.; Yildirim, Ş.Y. and İnuğur, M., 2006. Spoilage and shelf life of sardines (*Sardina pilchardus*) packed in modified atmosphere. *Eur. Food Res. Technol.*, 222: 667–673.
- FAO 2004. Yearbooks of Fishery Statistics. Summary tables of Fishery Statistics. Capture - Aquaculture - Commodities.
- FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistic Unit. Fishstat Plus: Universal Software for fishery statistical time series. Version 2.3. 2000.
- Farber, J.M., 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packing technology -A review. *Journal of Food Protection*, 54(1): 58–70.
- Gennari, M and Tomaselli, S., 1988. Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *Int J Food Microbiol.* Jun; 6, (4): 341-7.
- Gill, C.O. and Penney, N., 1988. The effect of the initial gas volume to meat ratio on the storage life of chilled beef packaged under carbon dioxide. *Meat Sci.*, 22:53-63.
- Gill, C.O., 1988. The solubility of carbon dioxide in meat. *Meat Sci.*, 22: 65–71.
- Goulas, A.E. and Kontominas, M.G., 2007. Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on the shelf-life of refrigerated chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Eur. Food Res. Technol.*, 224: 545–553
- Guillen, M.D. and Ruiz, A., 2004. Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Study of the oxidative stability of salted and unsalted salmon fillets by ¹H nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 86: 297–304.
- Hamilton, R.J.; Rossell, J.B.; Hudson, B.J.F. and Lölinger, J., 1983. In: Rancidity in Foods; Allen J. C., Hamilton R. J., Ed.; Applied Science Publishers LTD.; London, p. 1.

- Han, D.; Mcmillin, K.W. and Godber, J.S., 1994. Hemoglobin, myoglobin, and total pigments in beef and chicken muscles: chromatographic determination. *Journal of Food Science*, 59: 1279–1282.
- Hanan, T. and Shaklai, N., 1995. Peroxidative interaction of myoglobin and myoglobin and myosin. *European Journal of Biochemistry*, 233: 930–936.
- Hardy, R. and Keay, J.N., 1972. Seasonal variations in the chemical composition of Cornish mackerel, *Scomber scombrus* (L.) with detailed reference to the lipids. *J. Fd. Technol.*, 7: 125–137.
- Hoz, L.; López-Gálvez, D.E.; Fernández, M.; Hierro, E. and Ordóñez, J.A., 2000. Use of carbon dioxide enriched atmospheres in the refrigerated storage (2°C) of salmon (*Salmo salar*) steaks. *Eur. Food Res. Technol.*, 210: 179–188.
- http://www.ff.uc.pt/~mccast/bromatologia/material/teorico/lipidos_cores.pdf
- Huss, H. H., 1997. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. *FAO Fisheries Technical Papers*, 176p.
- Hyytiä, E; Hielm, S.; Björkroth, J. and Korkeala, H., 1999. Biodiversity of Clostridium botulinum Type E Strains Isolated from Fish and Fishery Products. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 5: 2057-2064.
- IFST, 1999. Development and use of microbiological criteria for foods. Institute of Food Science and Technology , London, 79p.
- Jakobsen, M. and Bertelsen, G., 2006. Solubility of carbon dioxide in fat and muscle tissue. *Journal of Muscle Foods*, 17: 9–19.
- Karube, I.; Matsuoka, H.; Suzuki, S., Watanabe, E. and Toyama, T., 1984. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 314-319.
- Kinsella, J.E.; Frankel, E.; German, B. and Kanner, J., 1993. Possible mechanisms for the role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, V. 47, N. 4: 85-89.
- Kisia, S. M., 1996. Structure of fish locomotory muscle. In J. S. D. Munshi & H. M. Dutta (Eds.), *Fish morphology: Horizon of new research* (pp. 169–178). USA: Science Publishers, Inc..
- Livingston, D.J. and Brown, W.D., 1981. The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 25(3): 244–252.
- Love, J.D., 1983. The role of heme iron in the oxidation of lipids in red meats. *Food Technology*, 12(4): 117–120.

- Masniyom, P.; Benjakul, S. and Visessanguan, W., 2002. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *J. Sci. Food Agric.*, 82: 873-880.
- McCallum, W.A.; Dyer, W.J.; Curi, S.; Simoncic, J.J.; Kovacevic, M.; Horne, D.C.; McNeill, R.J.; Krvaric, M. and Lisac, H., 1956. Quality of sardines (*Clupea pilchardus*) while held unfrozen prior to canning. *Food Technol.*, 10: 432-438.
- Murray, J. and Burt, J.R., 2001. "The Composition of Fish". A FAO Corporated Document Repository. Torry Advisory Notes. No. 38.
- Norma Portuguesa NP 2930, 1988. Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT). Método de Conway. Instituto Português da Qualidade, 5p.
- Norma Portuguesa NP 3278, 1986. Pescado e derivados. Contagem de microorganismos a 30°C. Instituto Português da Qualidade, 4p.
- Norma Portuguesa NP 3356, 1990. Pescado. Determinação do índice de ácido tiobarbitúrcio (T.B.A). Método espectrofotométrico. Instituto Português da Qualidade, 5p.
- Norma Portuguesa NP 904, 1987. Gordura e óleos comestíveis: Determinação do índice de peróxido. Instituto Português da Qualidade, 6p.
- Nunes, M.L., 1990. Sardine, *Sardina pilchardus*, characterisation: seasonal variation and shelf life during iced storage. In: *Processing and Quality of Foods*. Vol. 3. Chilled foods: The revolution in freshness. Ed.: P. Zenthen, J. C. Cheftel, C. Erikson, T. R. Gormeley, P. Linko, K. Paulus. Elsevier Applied Science, London: 311-326.
- Özogul, F. and Özogul, Y., 2006. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chemistry*, 99: 574-578.
- Özogul, F.; Taylor, K.D.A.; Quantick, P. and Özogul, Y., 2000. Chemical, microbiological and sensory evaluation of Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored in ice, modified atmosphere and vacuum pack. *Food Chemistry*, 71: 267-273.
- Özogul, F; Polat, A. and Özogul, Y., 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 85: 49-57.
- Pacheco-Aguilar, R.; Lugo-Sánchez, M.E. and Robles-Burgueño, M.R., 2000. Postmortem Biochemical and Functional Characteristic of Monterey Sardine Muscle Stored at 0 °C. *Journal of Food Science*, Vol. 65, No. 1: 40-47

- Parry, R.T., 1993. Introduction. In, Principles and application of modified atmosphere packaging of food R. T. Parry (Ed.). Glasgow: Blackie Academic and Professional: 1-17
- Pereira, Á.A.F. e Tenuta-Filho, A., 2005. Avaliação de condições de consumo da sardinha *Sardinella brasiliensis*. *Ciênc. Tecnol. aliment.*, vol.25, no.4: 720-725.
- Postnikova, G.B.; Tselikova, S.V.; Kolaeva, S.G. and Solomonov, N.G., 1999. Myoglobin content in skeletal muscles of hibernating ground squirrels rises in autumn and winter. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B*, 124: 35-37.
- Presa-Owens, S.M.; Lopez-Sabater, C. and Rivero-Urgell, M., 1995. Shelf-Life Prediction of an Infant Formula Using an Accelerated Stability Test (Rancimat). *J. Agric. Food Chem.*, 43(11): 2879-2882.
- Prost, C.; Hallier, A.; Cardinal, M.; Serot, T. and Courcoux, P., 2004. Effect of Storage Time on Raw Sardine (*Sardina pilchardus*) Flavor and Aroma Quality. *Journal of Food Science*, Vol. 69, No. 5: 198-204.
- Ramalho, V. C. e Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos - Revisão. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4: 755-760.
- Ravesi, E.M., Licciardello, J.J., Tuhkunen, B.E., and Lundstrom, R.C., 1985. The effect of handling or processing treatments on storage characteristics of fresh spiny dogfish. *Marine fisheries review* 47: 1 48-64.
- Rotabakk, B.T.; Birkeland, S.; Jeksrud, W.K. and Sivertsvik, M., 2006. Effect of Modified Atmosphere Packaging and Soluble Gas Stabilization on the Shelf Life of Skinless Chicken Breast Fillets. *Journal of Food Science*, Vol. 71, No. 2: S124-S131.
- Ruiz-Capillas, C. and Moral, A., 2001. Residual effect of CO₂ on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 413-420.
- Ryder, J.M., 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 678-680.
- Sá, E., 2004. Conservação do pescado. *Aquicultura e Pesca*, Junho, edição 01.
- Saito, T.; Arai, K., and Matsuyoshi, M., 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 24: 749-750.
- Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A. and Burt, J.R., 1990. Postharvest biochemical and microbial changes. In: "Seafood: Resources, nutritional composition, and preservation". Z.E. Sikorski (Ed.), CRC Press. Inc. Boca Raton, Fl. p. 55-75.

- Silva, F.A.M.M.; Borges, F.M. e Ferreira, M.A., 1999. Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. Revisão. *Química Nova*, 22(1): 94-103
- Simic, M.G., and Taylor, K.A., 1987. Free radical mechanisms of oxidation reactions. In A. J. St. Angelo & M. E. Bailey (Eds.), *Warmed-over flavor of meat* (pp. 69–72). Orlando, FL: Academic Press.
- Simpson, R.; Almonacid, S. and Acevedo, C., 2001. Development of a Mathematical Model for EAM Systems Applied to Nonrespiring Foods. *Journal of Food Science*, Vol. 66, No. 4: 561-567.
- Sivertsvik, M., 1999. Use of soluble gas stabilisation to extend shelf-life of salmon. *Proceedings of 29th WEFTA Meeting*. Ed. Georgakis, S.A., Geek Society of Food Hygienist and Technologists, Thessaloniki, Greece.
- Sivertsvik, M., 2003. Solubility and diffusion of CO₂ into fish; and the effect of CO₂ and temperature on the storage quality of fresh Atlantic salmon. Nordic network on advanced sustainable. FOOD MANUFACTURING. Newsletter Issue No 5. 11p
- Sivertsvik, M., Rosnes, J.T., and Jeksrud, W.K., 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 107-127.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J.T., and Jeksrud, W.K., 2004. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. *Journal of Food Engineering*, 63: 451-458.
- Sivertsvik, M.; Jeksrud, W.K.; Vagane, A. and Rosnes, J.T., 2004. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods Part 1: development and validation of experimental apparatus using a manometric method. *Journal of Food Engineering*, 61: 449–458.
- Sivertsvik, M.; Rosnes, J.T.; Vorre, A.; Randell, K.; Ahvenainen, R. and Bergslien, H., 1999. Quality of whole gutted salmon in various bulk packages. *Journal of Food Quality*, 22: 387-401.
- Smith, P.; Ramaaswamy, H. and Simpson, B., 1989. Developments in food packaging technology. II. Storage aspects. *Trends in Food Sci. Tech.*, 11: 111-121.
- Soares, V.F.M.; Vale, S.R.; Junqueira, R.G. e Glória, M.B.A., 1998. Teores de Histamina e Qualidade Físico-Química e Sensorial de Filé de Peixe Congelado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 18 n. 4: 462-470.
- Stammen, K; Gerdes, D and Caporaso F., 1990. Modified atmosphere packaging of seafood. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 29(5): 301-31.

- Takahashi, K; Ichioka, K.; Hatano, M. and Zama, K., 1985. Seasonal variation of sardine (*Sardinops melanosticta*) muscle lipids and other components. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 36: 248–257.
- Undeland, I., 1995. Oxidation of fatty fish during processing and storage — A literature review. SIK Report (614). Goteborg, Sweden. 188p
- Vicetti, R.; Ishitani, T.; Salas, A. and Ayalam, M., 2005. Use of alpha-tocopherol combined with synergists and compared to other antioxidants on the oxidative stability of sardine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 131-137.
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen anstrichm., Leinfelden*, n. 12: 1084-1087
- Wakao, A.W. and Palma-Estrada, J., 1983. Freshness evaluation in sardine and jack mackerel using K value and nitrogenated volatilebases. *Aquaculture*, 76 (1-2):135-143.
- Watabe, S.; Kamal, M. and Hashimoto, K., 1991. Postmortem Changes in ATP, Creatine Phosphate, and Lactate in Sardine Muscle. *Journal of Food Science*, Volume 56, No. 1: 151-171.

ANEXOS

Anexo I - Ficha de prova para a análise sensorial de filetes de sardinha crus

Avaliação do índice de frescura de filetes de sardinha crus

Nome: _____ Data: _____

Amostra: .

Parâmetros	Características	Pontuação			
Aspecto superficial	Prateado brilhante, ligeiro iridiscente	0			
	Prateado menos brilhante, com tom amarelo	1			
	Prateado menos brilhante, bastante amarelo esverdeado	2			
	Opaco, baço	3			
Firmeza da carne	Firme, elástica	0			
	Firme, dura	1			
	Menos elástica	2			
	Mole	3			
Cheiro	Sardinha fresca, neutro	0			
	Sardinha intenso, ligeiramente rançoso	1			
	Acre, rançoso	2			
	Óleo rançoso ou azedo	3			
Cor da carne	Rosa nacarado, brilhante, translúcido	0			
	Rosa/ Creme amarelado, menos brilhante, ligeiramente opaco	1			
	Creme/castanho opaco	2			
	Creme/castanho opaco, com zonas amareladas	3			

Obrigado pela colaboração




Anexo II - Ficha de prova para a análise sensorial de filetes de sardinha cozidos

Avaliação do índice de frescura de filetes de sardinha cozidos

Nome: _____ Data: _____

Amostra: _____

Parâmetros	Características	Pontuação			
Cheiro	Sardinha fresca ligeiro	0			
	Ligeiramente acre ou rançoso	1			
	Acre, rançoso	2			
	Óleo rançoso, ou amoníaco ou azedo	3			
Firmeza da carne	Firme, tenra	0			
	Firme	1			
	Menos firme	2			
	Mole	3			
Suculência da carne	Suculenta	0			
	Pouco succulenta	1			
	Ligeiramente fibrosa	2			
	Fibrosa	3			
sabor	Típico a sardinha	0			
	Neutro, ligeiro a sardinha	1			
	Ligeiro amargo, a outros sabores	2			
	Amargo	3			

Obrigado pela colaboração 

Anexo III - Evolução da contagem de microorganismos viáveis totais durante o período de armazenagem dos filetes de sardinha em AR, EV e EAM.

	dias	controlo	15 min	30 min
AR	0^a	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1
	2^b	3,1 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,5 ± 0,1
	5^b	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,7	2,9 ± 0,1
	8^b	4,8 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,2
	12^b	7,0 ± 0,6	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,3
EV	0^a	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
	2^b	3,3 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
	5^b	3,7 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,3
	8^b	3,9 ± 1,0	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,7
	12^b	6,0 ± 0,1	3,2 ± 0,8	3,3 ± 0,3
EAM	0^a	2,3 ± 0,0	2,3 ± 0,0	2,3 ± 0,0
	2^b	3,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2	4,0 ± 0,1
	5^b	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,1	3,7 ± 0,3
	8^b	3,8 ± 0,0	2,9 ± 0,4	3,7 ± 0,0
	12^b	3,8 ± 0,1	3,2 ± 0,2	3,8 ± 0,2

^a Os valores representam a média de 3 determinações para cada lote ± desv. pad.

^b Os valores representam a média de 4 determinações
(n = 2 embalagens x 2 análises) ± desv. pad.

Anexo IV - Evolução na contagem de microorganismos totais anaeróbios, durante o período de armazenagem dos filetes de sardinha em EV e EAM.

	dias	controlo	15 min	30 min
EV	0^a	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	2^b	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2	0,8 ± 0,9
	5^b	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4
	8^b	1,7 ± 1,1	1,0 ± 1,1	1,6 ± 1,1
	12^b	3,6 ± 0,0	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1
EAM	0^a	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	2^b	2,1 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,0 ± 1,4
	5^b	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,4	2,9 ± 0,1
	8^b	2,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,1 ± 1,3
	12^b	2,7 ± 0,4	1,0 ± 1,1	2,5 ± 0,1

^a Os valores representam a média de 3 determinações para cada lote ± desv. pad.

^b Os valores representam a média de 4 determinações
(n = 2 embalagens x 2 análises) ± desv. pad.

Anexo V - Evolução do índice de peróxidos, durante o período de armazenagem dos filetes de sardinha em AR, EV e EAM.

	dias	controlo	15 min	30 min
AR	0^a	49,1 ± 10,1	49,1 ± 10,1	49,1 ± 10,1
	2^b	98,7 ± 1,5	117,4 ± 25,5	109,2 ± 10,8
	5^b	93,5 ± 39,0	88,2 ± 11,5	105,4 ± 4,9
	8^b	158,3 ± 22,2	221,9 ± 42,9	181,7 ± 21,0
	12^b	244,3 ± 19,5	299,2 ± 54,9	221,1 ± 15,5
EV	0^a	20,6 ± 4,8	20,6 ± 4,8	20,6 ± 4,8
	2^b	49,0 ± 5,2	75,9 ± 25,5	101,0 ± 28,4
	5^b	81,6 ± 4,6	94,5 ± 15,9	113,8 ± 19,6
	8^b	79,0 ± 21,9	70,8 ± 5,5	73,5 ± 30,3
	12^b	84,3 ± 13,6	68,9 ± 5,0	112,3 ± 6,4
EAM	0^a	82,9 ± 20,1	82,9 ± 20,1	82,9 ± 20,1
	2^b	156,2 ± 11,7	52,4 ± 8,9	109,2 ± 10,5
	5^b	155,3 ± 6,1	135,7 ± 14,2	122,2 ± 17,6
	8^b	206,7 ± 25,3	160,9 ± 20,1	157,4 ± 31,5
	12^b	155,7 ± 4,9	125,0 ± 15,4	135,4 ± 3,0

^a Os valores representam a média de 3 determinações para cada lote ± desv. pad.

^b Os valores representam a média de 4 determinações
(n = 2 embalagens x 2 análises) ± desv. pad.

Anexo VI - Evolução do índice TBA, durante o período de armazenagem dos filetes de sardinha em AR, EV e EAM.

	dias	controlo	15 min	30 min
AR	0^a	4,5 ± 0,3	4,5 ± 0,3	4,5 ± 0,3
	2^b	17,7 ± 0,8	21,3 ± 5,4	17,1 ± 3,3
	5^b	22,2 ± 2,1	24,1 ± 2,4	32,3 ± 3,3
	8^b	22,4 ± 0,7	23,9 ± 0,6	24,4 ± 0,8
	12^b	27,0 ± 0,6	27,1 ± 0,7	25,3 ± 1,0
EV	0^a	7,5 ± 1,2	7,5 ± 1,2	7,5 ± 1,2
	2^b	5,7 ± 0,4	7,5 ± 2,2	8,1 ± 0,4
	5^b	22,7 ± 1,7	22,1 ± 1,4	23,4 ± 1,6
	8^b	20,9 ± 1,3	24,0 ± 3,3	20,4 ± 1,6
	12^b	20,4 ± 1,2	18,2 ± 0,5	19,2 ± 1,6
EAM	0^a	17,2 ± 0,2	17,2 ± 0,2	17,2 ± 0,2
	2^b	22,1 ± 2,1	22,1 ± 3,3	27,2 ± 0,4
	5^b	28,4 ± 1,9	27,2 ± 1,1	27,2 ± 0,8
	8^b	35,2 ± 0,9	31,7 ± 9,7	31,2 ± 1,5
	12^b	35,2 ± 1,1	33,7 ± 0,7	30,4 ± 1,9

^a Os valores representam a média de 3 determinações para cada lote ± desv. pad.

^b Os valores representam a média de 4 determinações (n = 2 embalagens x 2 análises) ± desv. pad.